

**Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Biogenese der spleißosomalen U snRNPs:
Charakterisierung eines faktorvermittelten
Zusammenlagerungsprozesses
von RNA-Protein-Komplexen**

**vorgelegt von
Gunter Meister
aus
Hof**

München, 31.8.2002

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 1.12.1999 bis 31.8.2002 in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Fischer am Max Planck Institut für Biochemie angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. T. Bonhoeffer
Max-Planck-Institut für Neurobiologie
Am Klopferspitz 18a
82152 Martinsried

Prof. Dr. S. Jentsch
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18a
82152 Martinsried

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.2002

Grau, teurer Freund,
ist alle Theorie,
Und grün des Lebens
goldner Baum.

Faust

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Einleitung	9
2.1	Das Krankheitsbild der Spinalen Muskelatrophie	9
2.2	Mutationen im „ <i>Survival Motor Neuron</i> “ (SMN)-Protein sind die Ursache der Spinalen Muskelatrophie	10
2.3	Das SMN-Protein	12
2.4	Struktur und Funktion spleißosomaler U snRNPs	13
2.5	Die Biogenese der spleißosomalen U snRNPs	16
2.6	SMN und Gemin2 sind an der Biogenese von U snRNPs beteiligt	18
2.7	Problemstellung und Konzeption	18
3	Material	21
3.1	Chemikalien und Enzyme	21
3.2	Plasmide	21
3.3	Antikörper und Antiseren	21
3.4	Organismen und Zelllinien	22
3.5	Zellkulturmedien	22
3.6	Puffer und Lösungen	24
4	Methoden	28
4.1	Molekularbiologische Methoden	28
4.1.1	Allgemeine Methoden	28
4.1.2	Klonierung von Protein-kodierenden DNA-Fragmenten aus humanen cDNA-Banken	28
4.1.3	<i>In vitro</i> Mutagenese	28
4.1.4	Klonierung der vollständigen cDNAs von Gemin4/GIP1 und p175	30
4.1.5	<i>In vitro</i> Transkription von RNA	30
4.1.6	3'-Endmarkierung von U snRNAs	31
4.2	Zellkulturmethoden	32
4.2.1	Kultivierung von Säugerzellen	32
4.2.2	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen	32
4.2.3	Reduktion der SMN-Expression durch RNA-Interferenz	32
4.2.4	Radioaktive Proteinmarkierung in lebenden HeLa-Zellen	33
4.3	Immunologische und immunbiochemische Methoden	33
4.3.1	Herstellung von polyklonalen Antiseren	33
4.3.2	Affinitätsreinigung von Antikörpern	34
4.3.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	35
4.3.4	Western Blotting	35
4.3.5	Immunpräzipitationsexperimente	36
4.3.6	Immunaффinitätschromatographie	36
4.4	Biochemische Methoden	37
4.4.1	Gel-Systeme	37
4.4.1.1	Denaturierende RNA-Polyacrylamidgelelektrophorese	37

4.4.1.2	Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	38
4.4.1.3	Native Gelelektrophorese zur Analyse von prä-spleißosomalen Komplexen	38
4.4.1.4	Native Gelelektrophorese zur Analyse der U snRNP-Biogenese	38
4.4.2	Proteinexpression	39
4.4.3	Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen	39
4.4.4	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation von Proteinen	39
4.4.5	<i>In vitro</i> Bindungsexperimente	40
4.4.6	Präparation von HeLa-Zellextrakten	40
4.4.6.1	Präparation von nukleären HeLa-Zellextrakten	40
4.4.6.2	Präparation von zytosolischen HeLa-Zellextrakten	41
4.4.6.3	Präparation von Gesamtzellextrakten	41
4.4.6.4	Herstellung von <i>Xenopus laevis</i> Ei-Extrakten	41
4.4.7	Gelfiltrationsanalysen	41
4.4.8	Dichtegradientenzentrifugation	42
4.4.9	Das <i>Xenopus laevis</i> Oozyten-System	43
4.4.9.1	Präparation der Oozyten	43
4.4.9.2	Mikroinjektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	43
4.4.9.3	Manuelle Isolierung von Zellkern und Cytoplasma	43
4.4.9.4	RNA-Extraktion aus Oocyten	44
4.4.10	Experimente zur Analyse der U snRNP-Biogenese	44
4.4.10.1	<i>In vitro</i> Rekonstitution der U snRNP-Biogenese in Extraktssystemen	44
4.4.10.2	<i>In vitro</i> Rekonstitution der U snRNP-Biogenese durch den gereinigten SMN- bzw. SMN/pICln-Komplex	45
4.4.11	Identifikation von Proteinen mittels MALDI	45
4.4.12	<i>In vitro</i> Spleißreaktion	46
4.4.13	Quervernetzung von RNA-Proteinen-Komplexen durch UV-Licht	47
4.4.14	<i>In vitro</i> Methylierungsexperimente	47
4.4.15	Isolierung von Proteinen aus gereinigten U snRNPs (TPs)	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Etablierung eines experimentellen Systems zur Untersuchung der U snRNP-Biogenese	49
5.2	Die Zusammenlagerung von U snRNPs ist ein ATP-verbrauchender Prozess	51
5.3	Für die Zusammenlagerung von U snRNPs <i>in vitro</i> sind zusätzliche zelluläre Faktoren notwendig	53
5.4	Isolierung eines makromolekularen SMN-Komplexes aus HeLa-Kernextrakt	55
5.5	Charakterisierung neuer Komponenten des SMN-Komplexes	56
5.6	Der SMN-Komplex ist essentiell für die U snRNP-Biogenese	59
5.7	Untersuchung der U snRNP-Biogenese in somatischen Zellen	60
5.8	Der SMN-Komplex ist für die Biogenese der Sm-core-Domäne alleine ausreichend	62
5.9	Die Sm-Proteine werden <i>in vivo</i> vom SMN-Komplex auf die U snRNA transferiert	67
5.10	Ein partieller SMN-Komplex, dem die Sm-Proteine B/B' und D3 fehlen, ist nicht mehr in der Lage die Sm-core-Domäne auszubilden	68
5.11	Identifizierung einer cytosolischen Enzymaktivität, die Sm-Proteine symmetrisch dimethyliert	71

5.12	Der pICln-Komplex katalysiert die sDMA-Modifikation der Sm-Proteine.....	73
5.13	pICln interagiert direkt mit der Sm-Domäne von Sm-Proteinen.....	76
5.14	Der pICln-Komplex interagiert direkt mit dem SMN-Komplex und stimuliert dabei seine Aktivität.....	79
5.15	Ein zelluläres Modell zur Analyse der molekularen Mechanismen der Spinalen Muskelatrophie.....	81
5.16	SMNrp: ein neues Tudor-Domänen-Protein.....	84
5.17	SMNrp ist in nukleären Bereichen zu finden, in denen sowohl Transkription, als auch Spleißen stattfindet.....	87
5.18	SMNrp ist eine Komponente des 17S U2 snRNPs.....	90
5.19	SMNrp ist mit den spleißosomalen Komplexen A und B assoziiert.....	92
5.20	SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor.....	93
5.21	SMNrp ist für die Ausbildung des funktionellen Spleißosoms notwendig.....	96
5.22	Zwei Domänen von SMNrp vermitteln essentielle Schritte bei der Zusammenlagerung des Spleißosoms.....	98
5.23	Assoziation von SMNrp mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP <i>in vitro</i>	102
6	Diskussion.....	107
6.1	<i>In vitro</i> Testsysteme zur Analyse der U snRNP-Biogenese.....	107
6.2	Die U snRNP-Biogenese ist ein aktiver Prozess.....	107
6.3	Ein makromolekularer Proteinkomplex wird für die U snRNP-Zusammenlagerung benötigt.....	108
6.4	Der SMN-Komplex überträgt die Sm-Proteine in einem Schritt auf die U snRNA.....	109
6.5	Der pICln-Komplex modifiziert Argininreste der Sm-Proteine B/B', D1 und D3.....	110
6.6	Der SMN-Komplex und der pICln-Komplex kooperieren bei der Zusammenlagerung von U snRNPs.....	112
6.7	Modell der assistierten Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne.....	113
6.8	Der SMN/pICln-Komplex als generelle RNP-Zusammenlagerungsplattform?.....	116
6.9	Spinale Muskelatrophie und die U snRNP-Biogenese.....	118
6.10	SMNrp: ein Tudor-Domänen-Protein, das die Zusammenlagerung des Spleißosoms steuert.....	119
6.11	SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor.....	120
6.12	SMNrp ist mit dem U2 snRNP assoziiert.....	120
6.13	SMNrp interagiert direkt mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP.....	121
6.14	SMNrp besitzt verschiedene funktionelle Sequenzabschnitte.....	123
6.15	SMNrp ist für die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms notwendig.....	124
6.16	Ausblick.....	125
7	Literaturverzeichnis.....	126
8	Anhang.....	138
8.1	Aminosäuresequenzen.....	138
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	146
8.3	Buchstabensymbole der Aminosäuren und Nukleotide.....	145
8.4	Publikationen.....	146
8.5	Danksagung.....	145
8.6	Lebenslauf.....	148
8.7	Erklärung.....	149

1 Zusammenfassung

Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) sind Komplexe aus RNA und Proteinen, die entscheidende Funktionen bei Prozessen wie Translation, Telomer-Synthese, Protein-Import in das endoplasmatische Retikulum oder RNA-Prozessierung übernehmen. Solche RNPs müssen in der Zelle aus ihren Einzelkomponenten – RNAs und Proteine – zu funktionsfähigen Gebilden zusammengelagert werden. Wie dieser Prozess *in vivo* abläuft ist noch weitgehend unklar, Studien *in vitro* haben aber gezeigt, dass sich RNPs spontan ausbilden und dieser Vorgang keine weiteren Faktoren benötigt. Daraus war die Hypothese abgeleitet worden, dass dies möglicherweise auch der Situation *in vivo* entsprechen könnte.

Unerwartete Einblicke in die Biogenese von RNPs lieferten schliesslich Studien zum "survival motor neurons"-Protein (SMN), dem Krankheitsgenprodukt der spinalen Muskelatrophie. Antikörper gegen SMN und seinem Bindungspartner Gemin2 inhibierten in *Xenopus laevis*-Oocyten die Ausformung von RNP-Untereinheiten des Spleißosoms - den U snRNPs - und nährten den Verdacht, dass diese Proteine Hilfsfaktoren der U snRNP-Biogenese sein könnten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, mechanistische Details über die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* zu ermitteln und die Rolle von SMN und Gemin2 zu untersuchen. Die wesentlichen Schritte der Biogenese von U snRNPs können experimentell in *X. laevis*-Oocyten verfolgt werden. Nach dem Export der U snRNAs U1, U2, U4 und U5 in das Cytosol lagern sich dort jeweils sieben sogenannte Sm-Protein an ein gemeinsames Motiv der U snRNAs an und formen so die Grundstruktur jedes U snRNPs, die Sm-Core-Domäne. Hierauf folgen die Hypermethylierung der U snRNA-Kappe und der Import der Sm-Core-Domäne in den Zellkern, wo sich U snRNP-spezifische Proteine anlagern, ehe die reifen snRNPs am Spleißprozess teilnehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein zellfreies System entwickelt, durch das die Zusammenlagerung von U snRNPs in der Komplexität des Cytosols untersucht werden konnte. Unter Verwendung von Extrakten aus *Xenopus laevis*-Eiern oder HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der Sm-Core-Domäne, entgegen bisheriger Vermutungen, nicht spontan erfolgt, sondern Energie in Form von ATP benötigt. Aus Depletionsversuchen wurde deutlich, dass SMN unter diesen zellähnlichen Bedingungen für die snRNP-Biogenese unbedingt erforderlich ist. SMN, dies zeigten immunbiochemische Reinigungen, ist in der Zelle mit 17 verschiedenen Proteinen assoziiert, die hier erstmals

vollständig identifiziert wurden. Dieser SMN-Komplex enthält bereits alle Sm-Proteine, jedoch keine U snRNAs. Anhand direkter Sm-Protein-Transferstudien wurde klar, dass der SMN-Komplex nicht nur notwendig sondern auch hinreichend für die Ausbildung der Sm-Core-Domäne ist. Dennoch konnte mit dem pICln-Komplex ein Proteinkomplex entdeckt werden, der mit dem SMN-Komplex interagiert und dessen Aktivität erheblich steigert. Der pICln-Komplex enthält eine neuartige Methyltransferase, die Arginylreste in den Sm-Proteinen B/B', D1 und D3 zu symmetrischen Dimethylargininen modifiziert. Es ist bekannt, dass hierdurch die Bindung von Sm-Proteinen an SMN verstärkt wird. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass SMN- und pICln-Komplexe eine funktionelle Einheit bilden, in der Modifikation und Transfer der Sm-Proteine koordiniert ablaufen. Erste Erkenntnisse aus Versuchen mit HeLa-Zellen und Patientenzelllinien deuten an, dass reduzierte Menge des SMN-Komplexes mit einer reduzierten U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität einhergehen, und dass dies einen biochemischen Defekt bei der Entstehung der Spinaler Muskelatrophie darstellen könnte.

In einem weiteren Projekt wurde mit Hilfe von Datenbankanalysen und biochemischen Strategien das SMN-homologe Protein SMNrp identifiziert und charakterisiert. Biochemische Studien zeigten, dass SMNrp eine Komponente des U2 snRNPs ist und eine essentielle Rolle beim Spleißen ausführt. Kernextrakte die kein SMNrp enthalten wiesen einen Defekt der Spleißosomen-Zusammenlagerung auf der Stufe des „prä-Spleißosoms“ auf. SMNrp ist demnach ein Zusammenlagerungsfaktor des Spleißosoms und bezüglich dieser Funktion dem U snRNP-Zusammenlagerungsfaktor SMN ähnlich.

2 Einleitung

Eine Vielzahl von zellulären Prozessen wird massgeblich durch Komplexe aus RNA und Proteinen, den sogenannten Ribonukleoprotein-Partikeln (RNPs), ermöglicht. Einige der am besten untersuchten Beispiele hierfür sind die Translation durch das Ribosom, die Protein-Translokation in das Endoplasmatische Retikulum durch das „Signal Recognition Particle“ (SRP), die Telomer-Synthese durch die Telomerase und die Prozessierung von RNA-Molekülen durch U snRNPs und snoRNPs (Gesteland *et al.* 1999, Will and Luhrmann 2001). RNPs werden durch die Zusammenlagerung von RNA- und Proteinkomponenten gebildet, ein Prozess, der auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst bzw. reguliert werden kann. Zunächst muss durch eine ausgewogene Synthese der einzelnen Komponenten sichergestellt werden, dass alle Faktoren des RNPs in ausreichenden Mengen vorliegen. Da die RNA im Zellkern, die Proteine jedoch im Cytosol gebildet werden, müssen weiterhin Transportsysteme gewährleisten, dass die Einzelkomponenten der RNPs an den Ort der Zusammenlagerung gelangen können. Schließlich muss die Ausbildung des RNPs selbst so gesteuert werden, dass funktionelle Partikel entstehen können.

Während in den letzten Jahren eine Vielzahl von Faktoren identifiziert wurde, die Synthese und Transport von RNP-Komponenten sicherstellen, ist über den Prozess der RNP-Zusammenlagerung *in vivo* nur sehr wenig bekannt. *In vitro*-Studien am Ribosom, am SRP und an spleißosomalen U snRNPs haben aber gezeigt, dass sich diese RNPs spontan und ohne die Hilfe von anderen Faktoren aus deren Einzelkomponenten ausbilden können (Will and Luhrmann, 2001). Ob derartige „self-assembly“-Prozesse ebenfalls die RNP-Bildung *in vivo* gewährleisten, ist aber weitgehend unklar. Unerwartete Einsichten in die Biogenese von RNPs lieferte kürzlich die Analyse der zellulären Ursachen der Spinalen Muskelatrophie (SMA). In diesen Studien konnte erstmals gezeigt werden, dass das Krankheitsgenprodukt der SMA an der Zusammenlagerung von RNPs des prä-mRNA prozessierenden Systems (U snRNPs) *in vivo* beteiligt ist (Fischer *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

2.1 Das Krankheitsbild der Spinalen Muskelatrophie

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine genetisch bedingte, neuromuskuläre Erkrankung des Menschen, die in vielen Fällen tödlich verläuft (Pearn, 1978; Roberts *et al.*, 1970). Sie äußert sich in einer fortschreitenden Degeneration von α -Motorneuronen in den anterioren Hörnern der grauen Substanz des Rückenmarks. Die Folge dieser Nervenzerstörung ist eine progressive Muskelatrophie der Gliedmaßen und des Rumpfes, wobei die proximale

Muskulatur oft stärker betroffen ist als die distale. Mit einer geschätzten Häufigkeit von einem Krankheitsfall unter 6000 Neugeborenen ist SMA nach Cystischer Fibrose die zweithäufigste autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit Todesfolge bei Neugeborenen (Schmalbruch and Haase, 2001; Sendtner, 2001).

Aufgrund der verschiedenen starken Ausprägungen und des Zeitpunktes des Auftretens der ersten Krankheitssymptome werden drei verschiedene Formen der SMA unterschieden. Patienten mit Typ-I-SMA (auch: Werdnig-Hofmann-Krankheit), zeigen bereits Lähmungssymptome innerhalb der ersten sechs Lebensmonate. Sie lernen nie das Sitzen oder Gehen und sterben häufig bereits vor dem 4. Lebensjahr an Ateminsuffizienz. Typ-II-SMA-Patienten zeigen beginnende Krankheitsanzeichen innerhalb der ersten 18 Lebensmonate. Die betroffenen Kinder erlernen meist das Sitzen, können aber ohne fremde Hilfe weder stehen noch gehen und sterben in der Regel vor Erreichen des zehnten Lebensjahres. Bei Patienten, die an Typ-III-SMA leiden (auch: Kugelberg-Welander-Krankheit), entwickeln sich die Patienten während der ersten 18 Lebensmonate normal und zeigen erst im fortgeschrittenen Alter unterschiedlich ausgeprägt Lähmungserscheinungen. Viele dieser Patienten können selbstständig sitzen und gehen. Eine Therapie, die zur Heilung oder Behandlung der SMA führen könnte, ist derzeit nicht bekannt (Schmalbruch and Haase, 2001).

2.2 Mutationen im „*Survival Motor Neuron*“ (SMN)-Protein sind die Ursache der Spinalen Muskelatrophie

Trotz der Heterogenität im Krankheitsbild ließen sich alle SMA-Typen auf Mutationen im Locus q13 des Chromosoms 5 eingrenzen (Brzustowicz *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1990). Durch positionelles Klonieren wurde 1995 in diesem Bereich mit dem „*survival motor neuron*“ (*SMN*)-Gen das SMA-Krankheitsgen identifiziert (Lefebvre *et al.*, 1995). *SMN* liegt in diesem Abschnitt in zwei Genkopien in invertierter Orientierung vor, die als *SMN1* und *SMN2* bezeichnet werden (Abb.: 2.1). Beide Gene umfassen neun Exons (Exon 1, 2a, 2b, 3-8) und sind auf DNA-Ebene zu 99% identisch. In über 95% aller SMA-Patienten findet man homozygote Deletionen im *SMN1*-Gen, unabhängig von welcher Form der Krankheit sie betroffen sind. In 4% aller Fälle führen Punktmutationen in einer Kopie des *SMN1*-Gens zur Erkrankung, wenn die andere Kopie eine Deletion aufweist (Lefebvre *et al.*, 1995). Mutationen im *SMN2*-Genlocus sind hingegen klinisch unauffällig (Wirth, 2000).

Die Sequenz der beiden *SMN*-Kopien unterscheidet sich lediglich in fünf Nukleotiden, wovon vier in Intron-Bereichen oder der 3'-untranslatierten Region liegen. Die einzige Mutation

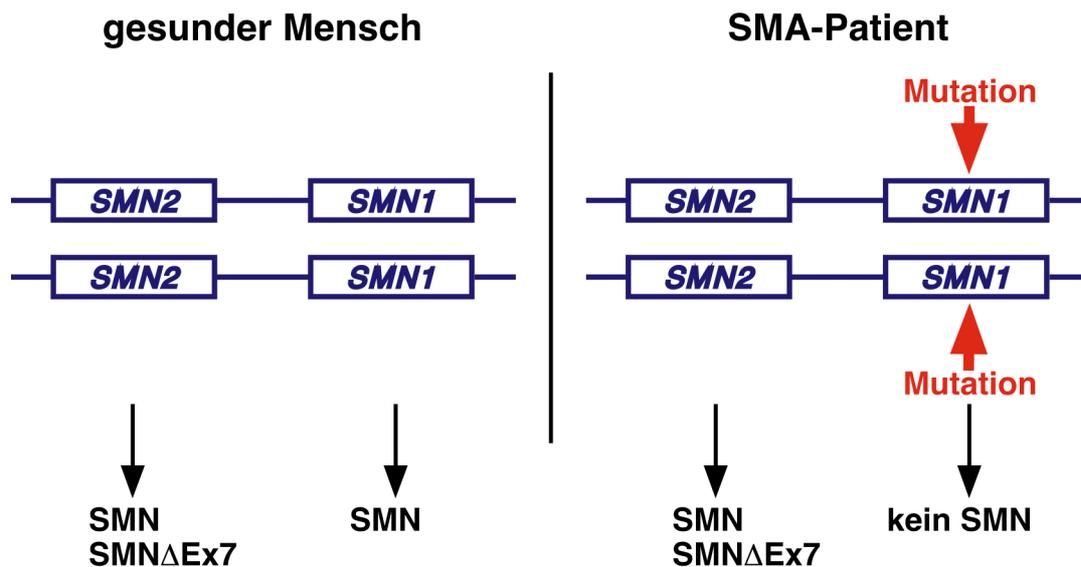


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der genetischen Situation bei gesunden Menschen und bei SMA-Patienten

innerhalb des offenen Leserahmens ist eine C-T-Substitution im Exon 7 von *SMN2*. Dieser Basenaustausch verändert nicht die Aminosäurezusammensetzung des resultierenden Proteins, sondern liegt innerhalb eines sogenannten „Exonic Splicing Enhancer“ (ESE). Dieses Sequenzmotiv ist an der Regulation des prä-mRNA-Spleißens beteiligt, und für die Inklusion des Exons 7 von *SMN* zwingend notwendig. Der C-T-Austausch inaktiviert diesen ESE, so dass aus der *SMN2*-prä-mRNA überwiegend ein verkürztes Transkript entsteht, dem das Exon 7 fehlt. Die Translation dieser mRNA führt zu einem C-terminal verkürzten *SMN*-Protein, das instabil und nicht funktionell ist (Lefebvre *et al.*, 1997; Lorson and Androphy, 2000; Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999). Die SMA-verursachenden Mutationen in *SMN1* bewirken demnach, dass nur noch sehr geringe Mengen an funktionellem *SMN*-Protein in den Zellen der Patienten zur Verfügung stehen.

Um die Pathogenese der SMA auf genetischer Ebene besser verstehen zu können, wurden Maus-Modelle für diese Krankheit entwickelt. Im Gegensatz zum Menschen, findet man im Mausgenom nur eine *Smn*-Kopie, die der humanen *SMN1*-Kopie entspricht. Die Inaktivierung dieses Gens führt zu einem frühen Absterben des Mausembryos was darauf hindeutet, dass *SMN* eine essentielle zelluläre Funktion ausübt (Schrank *et al.*, 1997). Um die genetische Situation der SMA-Patienten im Maus-Modell reflektieren zu können, wurden Mäuse hergestellt, die das humane *SMN2*-Gen vor dem *Smn*^{-/-}-Hintergrund trugen. In der Tat entwickeln diese Tiere einen SMA-Phänotyp, wobei die Schwere der Erkrankung invers mit der Anzahl der *SMN2*-Kopien, die in die Maus eingebracht wurden, korreliert (Frugier *et al.*,

2000; Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieses Mausmodells konnte erstmals direkt nachgewiesen werden, dass der Phänotyp der Spinalen Muskelatrophie durch einen Gen-Dosis-Effekt, d.h. durch eine Verminderung, nicht aber durch den vollständigen Verlust von funktionellem SMN, hervorgerufen wird. Die beschriebenen Mausmodelle dienen heute als wichtige Testsysteme für Therapeutika, die das Absterben der Motorneuronen verhindern oder zumindest hinauszögern können (Andreassi *et al.*, 2001).

2.3 Das SMN-Protein

Mit der Identifizierung von *SMN* wurde die Analyse der zellulären Funktion des SMN-Proteins und damit auch der molekularen Ursachen der Spinalen Muskelatrophie ermöglicht. Initiale experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass SMN ein ubiquitär exprimiertes Protein ist und somit vermutlich generelle zelluläre Funktionen ausübt (Liu and Dreyfuss, 1996). SMN ist ein neuartiges Protein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, dessen einziges Charakteristikum eine sogenannte Tudor-Domäne ist. Dieses ca. 50 Aminosäuren umfassende Motiv ist evolutionär konserviert und kommt in einigen putativen RNA-bindenden Proteinen vor (Ponting, 1997). Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass SMN in somatischen Zellen sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, wo es in definierten subnukleären Strukturen, den sogenannten „Gems“ (Gemini of Cajal bodies), konzentriert ist (Abb.: 2.2) (Liu and Dreyfuss, 1996). Gems finden sich in unmittelbarer Nachbarschaft von anderen Kernstrukturen, den „Cajal Bodies“, die reich an mRNA-Prozessierungsfaktoren und Transkriptionsfaktoren sind, und können in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand der Zelle mit diesen verschmelzen (Carvalho *et al.*, 1999; Liu and Dreyfuss, 1996).

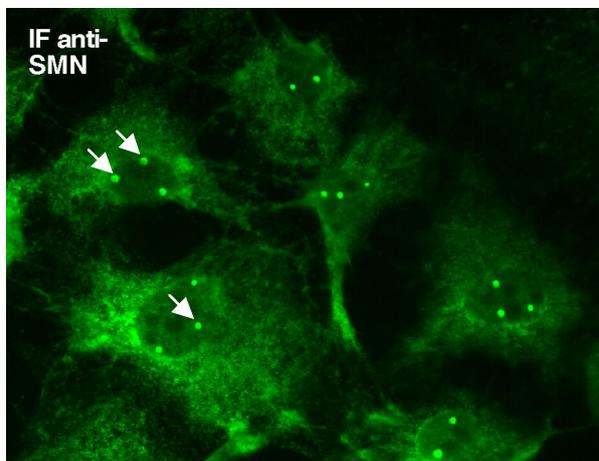


Abbildung 2.2: Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit anti-SMN Antikörpern. SMN lokalisiert sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern, wo es in neuartigen Strukturen, den sogenannten Gems (mit Pfeilen markiert), konzentriert ist.

Durch Interaktionsstudien in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein SMN-interagierendes Protein (SIP1 oder Gemin2) identifiziert. SMN und Gemin2 binden mit sehr hoher Affinität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aneinander und kolokalisieren im Cytoplasma sowie in Gems (Liu *et al.*, 1997). Erste funktionelle Studien in der *Xenopus laevis*-Oocyte und in HeLa-Zellextrakten brachten Hinweise auf eine mögliche zelluläre Funktion von SMN und Gemin2. Beide Proteine sind Teil eines oder mehrerer makromolekularer Komplexe, die Sm-Proteinen und U snRNAs, d.h. Komponenten der spleißosomalen U snRNPs, enthalten (Fischer *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Diese Experimente deuteten erstmals auf eine Rolle von SMN und Gemin2 im Metabolismus dieser essentiellen Spleißfaktoren hin.

2.4 Struktur und Funktion spleißosomaler U snRNPs

Ein grundlegender Schritt bei der Expression genetischer Information in Eukaryonten ist die Prozessierung von mRNA-Vorläufermolekülen (prä-mRNA) durch Spleißen. Hierbei werden nicht-codierende Abschnitte (Introns) aus der prä-mRNA entfernt und die codierenden Abschnitte (Exons) zu einer reifen mRNA verknüpft. Die Spleißreaktion wird durch das Spleißosom, einem makromolekularen Gebilde aus über 100 Einzelkomponenten, katalysiert. Hauptbestandteile des Spleißosoms sind die spleißosomalen U snRNPs (zusammengefasst in Burge *et al.* 1999).

Vier U snRNPs, nach ihrer Uridylsäure-reichen RNA als U1, U2, U4/U6 und U5 bezeichnet, können als Komponenten des Spleißosoms unterschieden werden. Die spleißosomalen U snRNAs höherer Eukaryonten haben eine Länge von ca. 100-250 Nukleotiden und weisen eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf (Abb.: 2.3) (Will and Luhrmann, 2001). Mit Ausnahme von U6 besitzen diese U snRNAs zwei charakteristische Strukturmerkmale: zum einen ist dies eine 5'-terminale Struktur, die Trimethylguanosin ($m_3^{2,2,7}G$) enthält und als m_3G -Cap bezeichnet wird (Mattaj, 1986). Zum anderen besitzen diese RNAs eine einzelsträngige, Uridylsäure-reiche Sequenz, die stets von zwei Haarnadelstrukturen flankiert ist und als Sm-Bindungsstelle bezeichnet wird (Branlant *et al.*, 1982).

Die Proteine, die an diese U snRNAs binden, lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen unterteilen (Abb.: 2.4). Eine Gruppe umfaßt die U snRNP-spezifischen Proteine, die nur mit einem Partikel assoziiert sind. Diese Faktoren sind in vielen Fällen an Partikel-spezifischen Funktionen im Spleißprozess beteiligt (Will and Luhrmann, 2001). Darüber hinaus besitzen alle vier U snRNPs einen gemeinsamen Satz an Sm-Proteinen, die als B/B', D1, D2, D3, E, F,

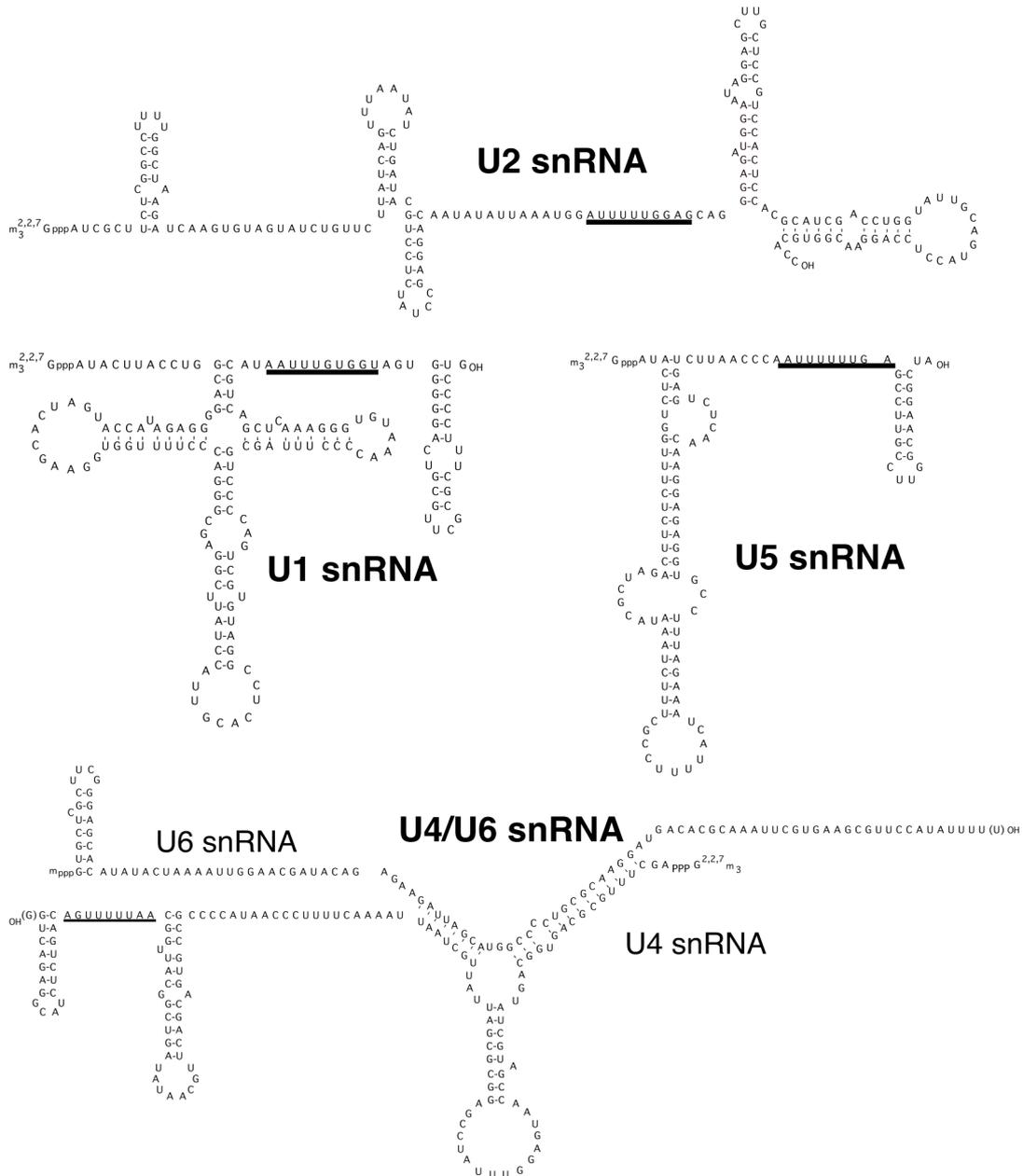


Abbildung 2.3: Spleißosomale U snRNAs des Menschen. Dargestellt sind die Sekundärstrukturen der U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA, sowie die Interaktion der U4 und U6 snRNAs (nach Will und Lührmann, 2001). Die Sm-Bindungsstellen der einzelnen U snRNAs sind unterstrichen.

und G bezeichnet werden (B und B' entstehen durch alternatives Spleißen derselben prä-mRNA und unterscheiden sich nur geringfügig am C-Terminus). Allen Sm-Proteinen ist eine N-terminale Sm-Domäne gemeinsam, die durch die zwei konservierten Sequenzabschnitte Sm1 und Sm2, charakterisiert ist (Hermann *et al.*, 1995; Seraphin, 1995). Darüber hinaus tragen die Sm-Proteine B/B', D1 und D3 einen C-terminalen Bereich, der sich wiederholende Arginin-Glycin-Dipeptidsequenzen enthält (engl.: RG-tail). Kürzlich konnten Brahms *et al.*

zeigen, dass sämtliche Arginine in diesen Bereichen posttranslational zu symmetrischen Dimethylargininen modifiziert werden (Brahms *et al.*, 2000).

In vitro Bindungsstudien haben gezeigt, dass Sm Proteine über die Sm-Domäne miteinander in spezifischer Weise interagieren. So lagern sich in Abwesenheit von RNA die Sm Proteine zu den heterooligomeren Komplexen B/B'.D3, D1.D2 und E.F.G zusammen. Vor kurzem ist es gelungen die Struktur der Sm-Proteinkomplexe B/B'.D3 und D1.D2 durch Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Auf der Grundlage dieser Strukturen und elektronenmikroskopischer Studien am isolierten U1 snRNP ist ein Strukturmodell für die Sm-core-Domäne vorgeschlagen worden (Abb.: 2.5) (Kambach *et al.*, 1999; Stark *et al.*, 2001). Nach diesem Modell lagern sich die heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe zu einem heptameren Ring an der Sm-Bindungsstelle der U snRNA zusammen. Die Sm-Bindungsstelle verläuft dabei durch die zentrale Öffnung dieses Rings und wechselwirkt mit der positiv geladenen Oberfläche auf dessen Innenseite. Die C-Termini der Sm-Proteine B/B', D1 und D3 ragen dabei aus der Ringstruktur nach außen (Kambach *et al.*, 1999). Durch Quervernetzungsexperimente mit ultravioletter Strahlung konnte gezeigt werden, dass die Sm-Proteine B/B' und G mit den Uridylsäureresten der U snRNA in Kontakt treten (Urlaub *et al.*, 2001).

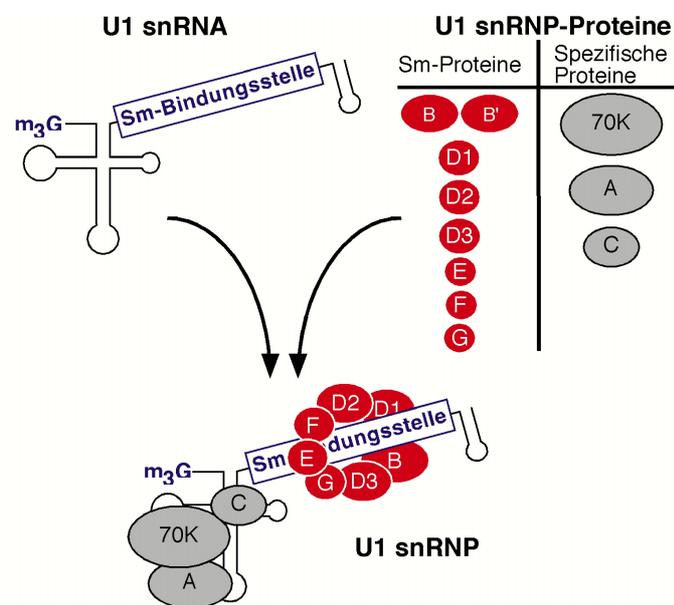


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des U1 snRNPs. Gezeigt ist die U1 snRNA mit dem 5'-terminalen m_3G -cap und der Sm-Bindungsstelle. Die Sm-Proteine binden in Form eines heptameren Ringes an die Sm-Bindungsstelle, während die U1-spezifischen Proteine mit anderen Bereichen der U1 snRNA assoziieren.

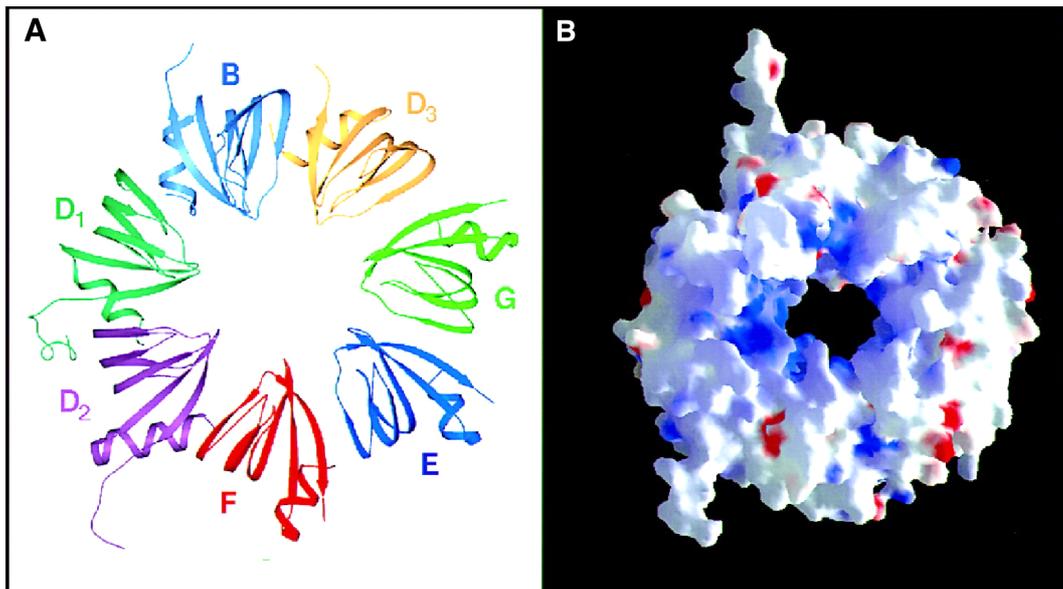


Abbildung 2.5: Strukturmodell der Sm-core-Domäne. (A) Die Assoziation der sieben Sm-Proteine führt zur Ausbildung eines heptameren Ringes. Die Sm-Proteine assoziieren über die N-terminalen Sm-Motive, während die C-Termini wahrscheinlich aus der Ringstruktur herausragen. Durch die innere Ringöffnung verläuft die U snRNA und interagiert mit den Sm-Proteinen G und B/B'. (B) Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Sm-core-Domäne. Positive Ladungsbereiche sind blau, negative Ladungsbereiche rot dargestellt (übernommen aus Kambach *et al.* 1999).

Das U6 snRNP unterscheidet sich sowohl hinsichtlich der snRNA als auch der Proteinzusammensetzung von den anderen spleißosomalen U snRNPs. Die U6 snRNA enthält am 5'-Ende keine m₃G-Cap-Stuktur, sondern ist an der γ -Phosphatgruppe methyliert („ γ -me-Cap“) (Singh and Reddy, 1989). Darüber hinaus besitzt sie keine Sm-Bindungsstelle und somit auch keine Sm-Core-Domäne. Interessanterweise haben aber biochemische Studien kürzlich zeigen können, dass mit der U6 snRNA ein Satz von sieben sogenannten „Like-Sm“-Proteinen (LSm2-8) assoziiert ist (Achsel *et al.*, 1999). Wie die Sm-Proteine enthalten die LSm-Proteine eine Sm-Domäne und bilden am Uridin-reichen 3'-Ende der U6 snRNA einen heptameren Ring aus, der der Sm-Core-Domäne strukturell sehr ähnlich ist (Salgado-Garrido *et al.*, 1999; Toro *et al.*, 2001).

2.5 Die Biogenese der spleißosomalen U snRNPs

Experimentelle Studien, die hauptsächlich in der *Xenopus laevis*-Oocyte durchgeführt wurden haben gezeigt, dass die Biogenese von U snRNPs in Teilen im Cytoplasma abläuft (Abb.: 2.6) (Mattaj, 1988). Hierbei wird die neu transkribierte und am 5'-Ende mit einem m⁷G-Cap

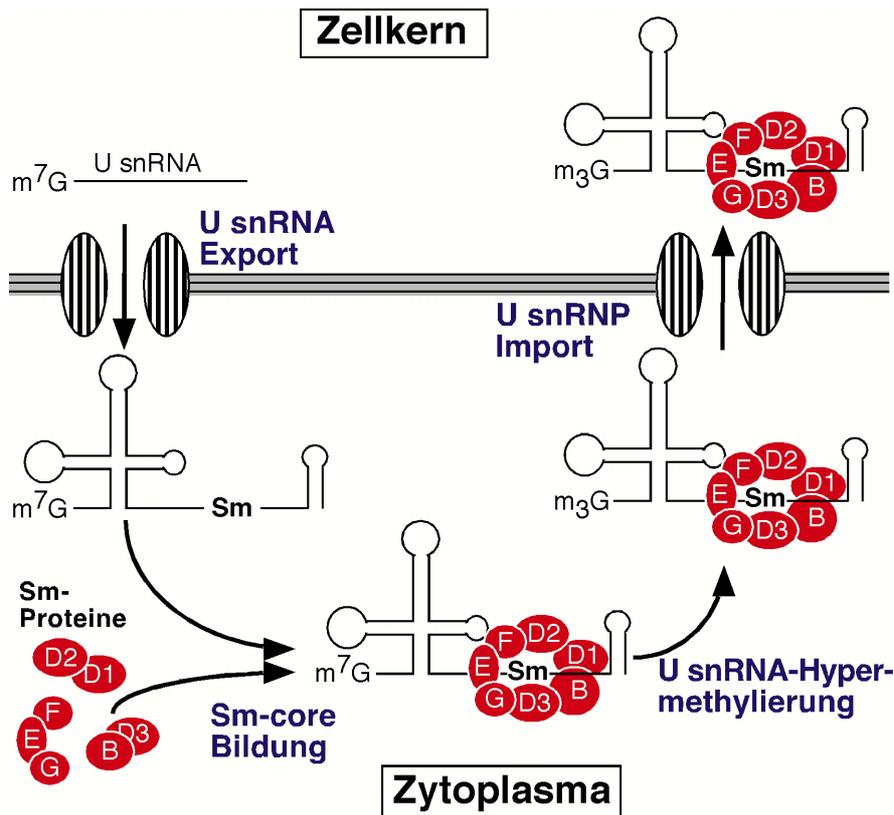


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Biogenesezyklus spleißosomaler U snRNPs. Im Zellkern transkribierte U snRNA wird ins Cytoplasma transportiert, wo sie mit den Sm-Proteinen assoziiert und was zur Ausbildung der Sm-core-Domäne führt. Anschließend wird das m⁷G-cap zum m₃G-cap hypermethyliert und das reife Partikel in den Zellkern transportiert. Wann die spezifischen Proteine mit dem Partikel assoziieren ist bislang unklar und daher im Modell nicht gezeigt.

versehene U snRNA zunächst vom Zellkern ins Cytoplasma transportiert. Dort befinden sich die Sm-Proteine, die unter Ausbildung der Sm-core-Domäne mit der U snRNA assoziieren. Die Zusammenlagerung der Sm-Core-Domäne ist eine Voraussetzung für die Hypermethylierung der m⁷G-Cap-Struktur zum m₃G-Cap (Mattaj, 1986; Yang *et al.*, 1992). Diese Hypermethylierung wird durch eine spezifische RNA-Methyltransferase (in der Hefe als Tgs1p bezeichnet (Mouaikel *et al.*, 2002)) katalysiert, die durch Bindung an die Sm-Core-Domäne an das Partikel rekrutiert wird. Das zusammengelagerte Partikel wird anschließend durch spezifische Transportrezeptoren, die sowohl das m₃G-Cap als auch die Sm-core-Domäne erkennen, in den Zellkern transportiert (Fischer *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 2002). Zu welchem Zeitpunkt die Partikel-spezifischen Proteine die individuellen U snRNPs vervollständigen, ist in vielen Fällen unklar. Über die Biogenese des U6-Partikels ist

gegenwärtig sehr wenig bekannt. Sie findet vermutlich ausschließlich im Zellkern statt (Boelens *et al.*, 1995; Terns *et al.*, 1993).

2.6 SMN und Gemin2 sind an der Biogenese von U snRNPs beteiligt

Die Zusammenlagerung der U snRNPs, und hier speziell der Sm-core-Domäne, ist in den letzten Jahren primär *in vitro* mit gereinigten Komponenten (d.h. U snRNA und U snRNP Proteine) untersucht worden. Diese Studien zeigten, dass sich die Sm-core-Domäne spontan ausbilden kann, jedoch über ein Zusammenlagerungs-Intermediat gebildet wird (Raker *et al.*, 1999; 1996). So lagern sich zunächst die heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe E.F.G und D1.D2 an der Sm-Bindungsstelle der U snRNA zu einem stabilen „Subcore“ zusammen. Durch die Addition des B/B'.D3 Heterodimers erfolgt dann die Umwandlung zur reifen Sm-core-Domäne. Es stellte sich nun die Frage, ob U snRNPs *in vivo* ebenfalls spontan zusammengelagert werden, oder ob hier andere Mechanismen greifen. In der Tat zeigten Mikroinjektionsstudien in *Xenopus laevis* Oocyten, dass Antikörper, die gegen SMN oder Gemin2 gerichtet waren, die Ausbildung der Sm-core-Domäne einiger U snRNPs verhindern. Diese Daten deuteten daher erstmals die Möglichkeit an, dass die Biogenese der spleißosomalen U snRNPs *in vivo* durch spezifische Faktoren reguliert oder sogar aktiv katalysiert werden könnte (Fischer *et al.*, 1997).

2.7 Problemstellung und Konzeption

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Datenlage war es ein Ziel dieser Arbeit, den Mechanismus der U snRNP-Zusammenlagerung unter *in vivo* Bedingungen auf molekularer Ebene zu verstehen. Mehrere Modelle, wie SMN und Gemin2 an der Biogenese von U snRNPs beteiligt sein könnte, erschienen denkbar:

- Die im Zellkern gebildete und anschließend ins Cytoplasma transportierte U snRNA ist möglicherweise mit Proteinen assoziiert, die im reifen U snRNP fehlen. Dies impliziert, dass der eigentlichen Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne ein Lösen der mit der U snRNA assoziierten Proteine vorausgeht. Es ist denkbar, dass SMN und Gemin2 die Dissoziation von U snRNA-assoziierten Proteine nach dem Export aus dem Kern fördern und somit die Ausbildung der Sm-core-Domäne einleitet.
- SMN und Gemin2 könnten bei der Faltung der U snRNA in ihren nativen Zustand eine wichtige Rolle spielen. In diesem Fall hätten diese Proteine die Funktion von RNA-Chaperonen.

- Weiterhin ist es denkbar, dass SMN und Gemin2 die Sm-Proteine für die U snRNP-Zusammenlagerung „aktivieren“. Dies erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass die Sm-Proteine im Cytoplasma möglicherweise in hochmolekularen Aggregaten vorliegen. Die „Aktivierung“ könnte durch Dissoziation dieser Aggregate und Freisetzung der Sm-Proteine erfolgen.
- Vermutlich bilden die Sm-Proteine zunächst untereinander spezifische Proteinkomplexe aus, bevor sie sich an die U snRNA anlagern. SMN und Gemin2 könnten auch bei der Zusammenlagerung dieser heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe mitwirken und so an der U snRNP-Biogenese beteiligt sein. Da SMN und Gemin2 mit Sm-Proteinen *in vivo* assoziiert sind, ist es in diesem Zusammenhang auch denkbar, dass diese beiden Proteine direkt am Transfer der Sm-Proteine auf die U snRNA und somit an der Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne beteiligt sind.
- Während die bis hierher diskutierten Modelle davon ausgehen, dass SMN und Gemin2 als Zusammenlagerungshilfen wirken, ist ebenso eine negative „Kontrollfunktion“ bei der U snRNP-Biogenese denkbar. Die Sm-Bindungsstelle ist sehr kurz (ca. 9 Nukleotide) und kommt auch in vielen nicht der U snRNA-Familie zugehörigen RNA-Spezies vor. Da die Sm-Proteine aber ausschließlich an die U snRNAs binden, könnte SMN und Gemin2 die Aufgabe zufallen, zwischen „falschen“ und „richtigen“ RNA-Spezies zu unterscheiden.

Die oben aufgeführten Modelle wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines zu diesem Zweck entwickelten *in vitro* Zusammenlagerungssystems untersucht. Mit diesem experimentellen Testsystem sollten im ersten Teil dieser Arbeit Einblicke in die Mechanismen der U snRNP-Biogenese und die Beteiligung von SMN und Gemin2 an diesem Prozess erhalten werden. Durch affinitätschromatographische Strategien sollten darüber hinaus weitere SMN-assoziierte Faktoren, die an der Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne beteiligt sind, identifiziert werden.

Ausgangspunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass einige Sm-Proteine (SmB/B', D1 und D3) symmetrische Dimethylarginine (sDMA) tragen und diese Modifikation die Voraussetzung für die Interaktion mit SMN ist. Es sollten auch hier experimentelle Testsysteme entwickelt werden, die es erlauben, den Enzymkomplex, der die sDMA in den Sm-Proteinen erzeugt, zu identifizieren. Die funktionelle Charakterisierung dieser Proteine sollte darüber hinaus weitere Einblicke in die Biogenese von U snRNPs liefern.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob es neben SMN noch weitere zelluläre Faktoren mit struktureller oder funktioneller Ähnlichkeit gibt. Unter diesen Gesichtspunkten wurde SMNrp, ein neuartiges SMN-homologes Protein, funktionell charakterisiert.

3 Material

3.1 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen *Biorad, Roche, Fluka, Gibco BRL, Merck, Roth* und *Sigma* bezogen. Radiochemikalien stammten von der Firma *Amersham-Pharmacia*, Enzyme von den Firmen *MBI, Promega* und *New England Biolabs*.

3.2 Plasmide

pET21a	trägt die kodierende Sequenz für C-terminalen His-Tag (Novagen)
pET28a	trägt die kodierenden Sequenzen für N- und C-terminalen His-Tag (Novagen)
pGEX6P-1	trägt die kodierenden Sequenzen für N-terminalen GST-Tag (Amersham-Pharmacia)
pHAcDNA3	trägt die kodierenden Sequenzen für N-terminalen HA-Tag
pBluescript II KS (-)	Stratagene

3.3 Antikörper und Antiseren

Im folgenden sind die verwendeten Antikörper und Antiseren angegeben. Auf die Herstellung und Reinigung von Antiseren wird im Methodenteil eingegangen. Sekundäre Antikörper für Western Blots und Immunfluoreszenzmikroskopie wurden von der Firma Sigma bezogen.

Tabelle 3.1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper.

Name	Antigen	Herkunft	Referenz/Hersteller	Zustand
7B10	SMN-His	Maus, monoklonal	(Meister <i>et al.</i> , 2000)	affinitätsgereinigt
anti-SMN		Kaninchen, polyklonal	Transduction labs	affinitätsgereinigt
anti-SIP1	His-SIP1	Kaninchen, polyklonal	(Jablonka <i>et al.</i> , 2001)	affinitätsgereinigt
anti-p175	His-p175	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-Gemin4/GIP1	GST-Gemin4/GIP1	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
Y12	Sm-Proteine	Maus, monoklonal	Lerner <i>et al.</i> , 2001	Ascites
anti-HA	Ha-tag	Maus, monoklonal		affinitätsgereinigt
H20	m ₃ /m ⁷ G	Maus- monoklonal	Bringmann <i>et al.</i> 1986	affinitätsgereinigt
R1131	m ₃ G	Kaninchen, polyklonal	Fischer <i>et al.</i> 1990	affinitätsgereinigt
anti-SmB.D3	SmB/B', D3	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-SmD1.D2	SmD1, D2	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt

anti-E.F.G	SmE, F, G	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-pICln	GST-pICln	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-PRMT5	GST-PRMT5	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti GST	GST	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-SMNrp	GST-SMNrp	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-SMNrp(N)	GST-SMNrp(N)	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-SMNrp(Tu)	Peptid (s. 4.4.1)	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigt
anti-Hsc70		Kaninchen, polyklonal	F. U. Hartl	Serum
anti-Maus IgG Peroxidase-konju.		Ziege, polyklonal	Sigma	gereinigte IgG- Fraktion
anti-Kaninchen IgG Peroxidase-konj.		Ziege, polyklonal	Sigma	gereinigte IgG- Fraktion
anti-Maus IgG FITC-konj.		Ziege, polyklonal	Sigma	gereinigte IgG- Fraktion
anti-Maus IgG TRITC-konj.		Ziege, polyklonal	Sigma	gereinigte IgG- Fraktion
anti-Kaninchen FITC-konj.		Ziege, polyklonal	Sigma	gereinigte IgG- Fraktion
anti-Kaninchen TRITC-konj.		Ziege, polyklonal	Sigma	gereinigte IgG- Fraktion

3.4 Organismen und Zelllinien

E. coli Stämme: BL-21(DE3), DH5 α

Zelllinie HeLa S3

Zelllinie COS-1

SMA-Typ-I-Fibroblasten

Xenopus laevis Oocyten/Eier

3.5 Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der oben aufgeführten Zelllinien, sowie für „pulse-chase“-Experimente wurden folgende Medien verwendet:

Normalmedium :	500 ml	DMEM (GIBCO-BRL)
	10%	Fetal Calf Serum (GIBCO-BRL)
	1%	200 mM L-Glutamin (Sigma)
	1%	Penicillin/Streptomycin (Sigma)

Hunger-Medium: 40 ml Medium (Nr. 11970, GIBCO-BRL)

	10%	Foetales Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL)
	1%	200 mM L-Glutamin (Sigma)
	1%	Penicillin/Streptomycin
	560µl	2M HEPES-KOH, pH 7.4
„chase“-Medium:	40ml	Medium (high glucose, GIBCO-BRL)
	10%	Foetales Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL)
	1%	200 mM L-Glutamin (Sigma)
	1%	Penicillin/Streptomycin (Sigma)
	180µl	Methionin (25 mg/ml)
	216µl	Cystein (25 mg/ml)

3.6 Puffer und Lösungen

RNA-Probenpuffer (denaturierend)	90% (v/v) Formamid 0,025% (w/v) Xylencyanol 0,025% Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer (nativ)	16% (v/v) Glycerin 10 mg/ml Heparin 0,025% (w/v) Xylencyanol 0,025% (w/v) Bromphenolblau
AES-Puffer	300 mM Na ⁺ -Acetat (pH 5,2) 2 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS
PBS (phosphate buffered saline)	130mM NaCl 77.4ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22.6ml 1M NaH ₂ PO ₄ ad 1l ddH ₂ O
Proteinprobenpuffer:	100mM Tris/HCl pH 6.8 2.5mM EDTA 0.1% Bromphenolblau 50% Glycerin 100mM DTE (Dithioerythrol)
TBT-Puffer	0,1 % Tween 20 0,2 % BSA in PBS (pH 7,4)
IP-Puffer	300 mM NaCl 25 mM Tris/HCl (pH 7,5) 5 mM MgCl ₂ 0,01 % Nonidet P-40
1x TBE-Puffer:	89mM Tris/HCl pH 8.3 89mM Borsäure

	2.5mM EDTA
5%ige Sammelgellösung:	1.5ml Acrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad: 37.5:1) 1.5ml 500mM Tris/HCl pH 6.8 (Sammelgelpuffer) 6.8ml ddH ₂ O 50µl 20% SDS 5µl N,N,N',N'-Tetramethylethylen-Diamin (TEMED) 100µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)
12%ige Trenngellösung:	4ml Acrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad: 37.5:1) 2ml 2M Tris/HCl pH 8 (Trenngelpuffer) 3.8ml ddH ₂ O 50µl 20% SDS 4µl TEMED 100µl 10% APS
Lyse-Puffer	500 mM NaCl 25 mM Tris/HCl (pH 7,5) 5 mM MgCl ₂
Wasch-Puffer	300 mM NaCl 25 mM Tris/HCl (pH 8,5) 5 mM MgCl ₂
Roeder A-Puffer	10 mM KCl 10 mM Hepes/KOH (pH 7.9) 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT 0,5 mM PMSF
Roeder C-Puffer	420 mM KCl 10 mM Hepes/KOH (pH 7.9) 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT

	0,2 mM EDTA
	5 % (v/v) Glyzerin
	0,5 mM PMSF
Roeder D-Puffer	100 mM KCl
	20 mM Hepes/KOH (pH 7.9)
	1,5 mM MgCl ₂
	0,5 mM DTT
	20 % (v/v) Glyzerin
	0,5 mM PMSF
Barth-Puffer	88 mM NaCl
	1 mM KCl
	15 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	1,4 mM NaHCO ₃
	0,3 mM Ca(NO ₃) ₂
	0,41 mM CaCl ₂
	0,82 mM MgSO ₄
5:1 Puffer:	83mM KCl
	17mM NaCl
	10mM Tris/HCl pH 7.2-7.4
Homo-Puffer:	10mM Tris/HCl pH 7.4
	10mM NaCl
	1.5mM MgCl ₂
	1% SDS
10x Methylierungspuffer:	500mM Tris-HCl (pH 7.4)
	20mM EDTA
	20mM EGTA
DE-53 Waschpuffer:	150 mM Kac, pH 5.5
	140 mM NaCl

	5 mM EDTA
	0.5 mM DTE
	0,5 mM PMSF
DE-53 Elutionspuffer:	225 mM KAc, pH5.5
	7.5 mM EDTA
	0.5 mM DTE
	0.5 mM PMSF
Aufschlusspuffer:	150 mM KCl
	50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
	2 mM EDTA
	0.5mM DTT
	0.1% Nonidet P40
Dissoziationspuffer:	350mM NaCl
	50mM Tris-HCl pH 7.4
	5mM MgCl ₂

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Allgemeine Methoden

Alle nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden (DNA/RNA-Gelelektrophorese, -Extraktion, -Präzipitation und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren etc., PCR) wurden nach (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. gemäß den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der nicht näher beschriebenen Puffer und Lösungen.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „Mini-“ bzw. „Maxi-Plasmid-Purification-Kit“ der Firma Qiagen. Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Qiaquick-Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

Transformationen von Plasmid-DNA in die *E. coli* Stämme DH5 α und BL21(DE3) erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.2 Klonierung von Protein-kodierenden DNA-Fragmenten aus humanen cDNA-Banken

Die cDNAs für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) aus der „Marathon cDNA“-Bank der Firma Clontech, die aus humanen, fötalen Gehirnen isoliert wurden, amplifiziert. Für die Amplifikation wurden für das jeweilige Protein spezifische, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (engl.: Primer) verwendet, die an ihren 5'- bzw. 3'-Enden die Schnittstellen für die während der Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen enthielten. Die cDNAs wurden in Vektoren kloniert, die die Expression und *in vitro* Translation der Proteine erlaubten. Deletionsfragmente wurden ausgehend von diesen Konstrukten in analoger Vorgehensweise kloniert. In der Tabelle 4.1 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgelistet.

4.1.3 *In vitro* Mutagenese

Die Herstellung von SMNrp-Konstrukten mit Mutationen in der Tudor-Domäne (SMNrpmu1, SMNrpmu2) sowie Punktmutationen in SmD1 (SmD1M58/60) erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Schritte. Der 5'-Primer der ersten

Tabelle 4.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidkonstrukte.

Protein	AS	Konstrukt	Plasmid	5´-/3´-RS	Mutation
SMN	1-294	pET21a-SMN	pET21a	BamHI/HindIII	WT
		SMN-His	pET28a	BamHI/HindIII	WT
		GST-SMN	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	WT
	1-160	GST-SMN-1/160	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	AS 1-160
		SMN-1/160-His	pET28a	EcoRI/XhoI	AS 1-160
Gemin2	1-280	pET21a-Gemin2	pET21a	BamHI/HindIII	WT
		His-Gemin2	pET28a	BamHI/HindIII	WT
unrip	1-351	pET21a-unrip	pET21a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-unrip	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	WT
		HA-unrip	pHAcDNA3	EcoRI/XhoI	WT
Gemin3	1-824	pET21a-Gemin3	pET21a	Sall/NotI	WT
		GST-Gemin3	pGEX6P-1	Sall/NotI	WT
		His-gemin3	pET28a	Sall/NotI	WT
Gemin4/ GIP1	1-1059	His-Gemin4/GIP1	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-Gemin4/GIP1	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	WT
p175	1-1509	pET21a-p175	pET21a	NotI	WT
	1-695	GST-p175-NterII	pGEX6P-1	BamHI	AS 1-695
	1307- 1509	GST-p175-Cter	pGEX6P-1	EcoRI/NotI	AS 1307- 1509
Gemin6	1-166	His-Gemin6	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-Gemin6	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT
Smb/B´	1-231	pBlue-Smb	pBluescript II KS	EcoRI/HindIII	WT
Smd1	1-119	pBlue-Smd1	pBluescript II KS	EcoRI/Sall	WT
	68-119	GST-Smd1-RG	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	AS 68-119
	1-119	Smd1M58/60	pGex6P1-1	EcoRI/XhoI	siehe 4.2.3
Smd2	1-118	pBlue-Smd2	pBluescript II KS	EcoRI/Sall	WT
Smd3	1-126	pBlue-Smd3	pBluescript II KS	EcoRI/Sall	WT
	72-126	GST-Smd3-RG	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	AS 72-126
SmE	1-92	pBlue-SmE	pBluescript II KS	EcoRI/HindIII	WT
SmF	1-86	pBlue-SmF	pBluescript II KS	EcoRI/XhoI	WT
SmG	1-76	pBlue-SmG	pBluescript II KS	EcoRI/XhoI	WT
pICln	1-236	pICln-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-pICln	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT
PRMT5	1-637	PRMT5-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-PRMT5	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT
WD45	1-342	WD45-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-WD45	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT
SMNrp	1-238	SMNrp-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-SMNrp	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT
		SMNrpmu1-His	pET25a	EcoRI/XhoI	siehe 4.2.3
		GST-SMNrpmu1	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	siehe 4.2.3
		SMNrpmu2-His	pET28a	EcoRI/XhoI	siehe 4.2.3
		GST-SMNrpmu2	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	siehe 4.2.3
		70-238	SMNrpΔN-His	pET28a	EcoRI/XhoI
	GST-SMNrpΔN	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	AS 70-238	
U4/U6- 90kDa	1-682	90kDa-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-90kDa	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT
U4/U6- 60kDa	1-522	60kDa-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-60kDa	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT

AS: Aminosäure, RS: Restriktionsschnittstelle, WT: wild-typ

PCR war zum 5´-Ende von SMNrp komplementär und trug zusätzlich die Sequenz für EcoRI. Die Sequenzen der verschiedenen 3´-Primer enthielt an den entsprechenden Positionen Punktmutationen, die zum gewünschten Aminosäureaustausch führten. Mit diesen Primer-Paaren und einer SMNrp-Wildtyp-Sequenz als Matrize wurden DNA-Fragmente von ca. 400-

450 bp amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden gereinigt und als 5'-Primer in der zweiten PCR verwendet. Der 3'-Primer der zweiten PCR war zum 3'-Ende von SMNrp komplementär und trug eine XhoI-Schnittstelle. Als Matrize wurde wieder die SMNrp-Wildtyp-Sequenz verwendet. Die resultierenden 800 bp DNA-Fragmente wurden über EcoRI/XhoI in pET21a kloniert und anschließend sequenziert. Konstrukte, welche die gewünschten Mutationen enthielten, wurden in pGEX6P-1 und pET28a subkloniert. Die Klonierung von SmD1M58/60 erfolgte in analoger Weise.

4.1.4 Klonierung der vollständigen cDNAs von Gemin4/GIP1 und p175

Zum Zeitpunkt der Identifizierung von Gemin4/GIP1 und p175 waren nur partielle cDNA Sequenzen in der NCBI-Datenbank vorhanden. Der vollständige 5'-Terminus der kodierenden Sequenzen von Gemin4/GIP1 und p175 wurde mittels des „5'-RACE-Marathon-cDNA-Kit“ (RACE: rapid amplification of cDNA ends) der Firma Clontech gemäß den Herstellerangaben ermittelt. In einer ersten PCR mit Vektor-spezifischen 5'-Primern und Gen-spezifischen 3'-Primern wurden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe der „Marathon cDNA Bank“ amplifiziert. Mit diesen Produkten als Matrize wurden in einer zweiten Reaktion mit weiter intern gelegenen Vektor-spezifischen 5'-Primern und Gen-spezifischen 3'-Primern DNA-Fragmente der Größen 500 kb (Gemin4/GIP1) und 600 kb (p175) amplifiziert („nested PCR“). Diese Fragmente wurden sequenziert. Im Falle von p175 konnten mittels der Sequenzinformationen zwei weitere partielle cDNA-Klone (GenBank Accession No.: AL039604 und AW500256) in der Datenbank identifiziert werden, was die Konstruktion einer kompletten cDNA erlaubte.

4.1.5 *In vitro* Transkription von RNA

Zur *in vitro* Transkription von RNAs wurde der Transkriptionskit der Firma Promega verwendet. Als Matrize dienten linearisierte Plasmide, die in 5'-Richtung der zu transkribierenden Sequenz einen geeigneten Promoter für die entsprechende RNA-Polymerase aufwiesen (T7- oder SP6-Promoter). Die für die Transkription verwendeten Konstrukte (U1, U2, U4, U5 snRNAs, U1ΔSm, pAD48) sind in Fischer et al. (1995) und (Hamm, 1990) beschrieben. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

2 μ l	linearisiertes Plasmid (1 μ g/ μ l)
3 μ l	10x Transkriptionspuffer
5 μ l	10x Ribonukleotidmix (5 mM ATP, CTP, GTP; 1 mM UTP)

1 μ l	GpppG (25 mM)
2,5 μ l	0,1 M DTE
8 μ l	H ₂ O
1 μ l	BSA (1 μ g/ μ l, Rnase-frei)
3 μ l	α -[³² P]-UTP (3000 Ci/mmol)
2 μ l	RNA-Polymerase (10 U/ μ l)

Die Reaktion wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Zur Reinigung der *in vitro* transkribierten RNAs wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 1/5 vol. RNA-Probenpuffer gemischt und durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 4%igen Polyacrylamidgel (4 % Polyacrylamid [Acrylamid/N,N'-Methylen Bisacrylamid, 19:1 (w/w)], 8M Harnstoff in 0,5x TBE) getrennt. Die durch Autoradiographie sichtbar gemachte Bande der entsprechenden Größe wurde ausgeschnitten, mit 400 μ l AES-Puffer versetzt und über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Rotor inkubiert. Anschließend wurde die extrahierte RNA gefällt, getrocknet und in sterilem ddH₂O aufgenommen.

4.1.6 3'-Endmarkierung von U snRNAs

Zur radioaktiven Markierung isolierter U snRNAs wurde das 3'-Ende der RNA mit [³²P]-pCp mittels T4-RNA-Ligase markiert. Folgender Ansatz wurde hierfür verwendet:

100 ng	RNA
2,5 μ l	DMSO (Sigma)
1 μ l	10x Puffer für T4 RNA-Ligase (MBI)
1 μ l	T4 RNA-Ligase (10U/ μ l, MBI)
1 μ l	[³² P]-pCp (10mCi/ml, Amersham-Pharmacia)
ad 10 μ l	H ₂ O

Die Reaktion erfolgte für 2h bei 4°C. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die RNA-Präzipitate wurden direkt in 50 μ l RNA-Probenpuffer aufgenommen und durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese analysiert.

4.2 Zellkulturmethoden

4.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Säugerzelllinien (HeLa-, COS-1-, 293-Zellen, SMA-Typ-I-Fibroblasten) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco BRL) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen (Ø10 cm, Falcon) kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS, Gibco BRL) sowie 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin (Gibco BRL) und wurde alle zwei Tage gewechselt. Vor Erreichen von 100% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zunächst mit PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 1% Trypsin in PBS (pH 7,4) von der Kulturschale abgelöst und in einer 1:10 Verdünnung auf neuen Kulturschalen ausgesät.

4.2.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Die Expression von HA-unrip, HA-SMN sowie HA in Säugerzellen erfolgte durch transiente Transfektion der jeweiligen Plasmid-Konstrukte in 293-Zellen. Dazu wurden jeweils 12 µg Plasmid-DNA in 210 µl ddH₂O gelöst und mit 70 µl Lipofectamin (Gibco BRL) gemischt. Diese Mischung wurde 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 293-Zellen von 30-50% Konfluenz in Serum-freiem Medium gewaschen und die Lipofectamin-DNA-Mischung auf die Zellen pipettiert. Nach 8h Inkubation unter Standardbedingungen wurde FCS zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) zugegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht inkubiert und nach erneutem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) in 2 ml 0,5% Triton X-100 in PBS (pH 7,4) für 20 min auf Eis. Nach der Zentrifugation der Extrakte (10 min, 13000g, 4°C) wurden die Überstände für Immunpräzipitationen herangezogen.

4.2.3 Reduktion der SMN-Expression durch RNA-Interferenz

Durch die spezifische Degradation der mRNA kann die Expression eines Proteins *in vivo* unterbunden werden. Diese Degradation wird dabei durch kleine komplementäre, doppelsträngige RNAs (siRNAs) induziert (Elbashir *et al.*, 2001). Um die SMN-Expression zu inhibieren, wurde ein 21 Nukleotide langes doppelsträngiges RNA-Oligo (dsRNA) hergestellt, dass zur Position 183 bis 205 der SMN-mRNA komplementär war. Zur Transfektion wurden HeLa-Zellen, die in 6-Kavitäten-Platten (Gibco) zu einer 20%iger Konfluenz gewachsen waren, verwendet. Dazu wurde zunächst zwei Lösungen hergestellt. In Lösung A wurden 10µl dsRNA (20µM) mit 175 µl Opti-MEM-Medium (Gibco) gemischt.

Lösung B bestand aus 11µl Opti-MEM-Medium und 4µl Oligofectamin (Invitrogen). Die Lösungen A und B wurden anschließend gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 800µl Opti-MEM-Medium wurde die resultierende Lösung auf eine Kavität der 6-Kavitäten-Platte gegeben und für 6 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 500µl Vollmedium (Opti-MEM, 30% FCS, Penicillin/Streptomycin) dazugegeben und für 24 bis 96h bei 37°C inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Abkratzen in 150µl Aufschlußpuffer. Nach dem Abzentrifugieren der Zellfragmente (14000 rpm, 10min) wurde der Überstand für Western Blot-Analysen verwendet. Zur Untersuchung der Zusammenlagerungsaktivität von U snRNPs wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst, in PBS (pH 7,4) gewaschen und wie in 4.5.6.2 beschrieben aufgeschlossen.

4.2.4 Radioaktive Proteinmarkierung in lebenden HeLa-Zellen

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen *in vivo* wurden sog. „pulse-chase“ Experimente durchgeführt. Zunächst wurden HeLa-Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 75% in 75 ml Zellkulturflaschen herangezogen. Um ein Austreten der Radioaktivität zu vermeiden wurden hierfür Flaschen verwendet, die keine Filter aufwiesen. Die Zellen wurden anschließend für 45 min in 5 ml Hungermedium inkubiert um den Verbrauch der endogen gespeicherten Aminosäuren zu gewährleisten. Danach wurde 1 mCi Promix (Mischung aus [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein; Amersham) pro Flasche zugegeben und erneut für 1.5 h bei 37°C inkubiert (engl.: pulse). Nach dieser Inkubation wurde das Medium abgenommen, 8 ml „chase“-Medium dazugegeben und für 1h, 5h bzw. 18h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Aufschlußpuffer durch Abkratzen geerntet. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert und die Überstände für Immunpräzipitationen herangezogen.

4.3 Immunologische und immunbiochemische Methoden

Sämtliche nicht näher beschriebenen Standard-Methoden wurden wie in (Harlow and Lane, 1988) beschrieben durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen aller nicht näher beschriebenen Puffer.

4.3.1 Herstellung von polyklonalen Antisera

Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen SMN, SIP1, Gemin4/GIP1, unrip, p175, pICln, PRMT5, SmB/B'.D3, SmD1.D2, SmE.F.G, SMNrp, SMNrp-Tudor

(gegen die Tudor-Domäne von SMNrp) und SMNrp-N-Terminus (gegen den N-Terminus von SMNrp) hergestellt. Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine bzw. Proteinfragmente als GST-Fusionen rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte im 2 Wochen Abstand über einen Zeitraum von 2 Monaten. Dazu wurde jeweils eine 1:1 Mischung aus dem jeweiligen GST-Fusionsprotein (Konzentration 1 mg/ml) und kompletten Freundschens Adjuvans (Sigma) subkutan injiziert. Zur Herstellung eines Antiserums, das spezifisch die Tudor-Domäne von SMNrp erkennt, wurde die Aminosäuren 110 bis 125 als Peptid synthetisiert und in Kaninchen immunisiert. Das gewonnene Blut wurde zur Gerinnung 2h bei 37°C inkubiert und anschließend 25 min bei 10000g abzentrifugiert. Die Überstände wurden entweder affinitätsgereinigt oder direkt für Western Blots, Immunpräzipitationen, Immunfluoreszenzen, Oozyten-Injektionsstudien und Antikörperinhibitionsstudien verwendet.

4.3.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Affinitätsreinigung von Antikörpern wurden 1-2 mg der rekombinant exprimierten und gereinigten Antigene kovalent an CnBr-aktivierte Sepharose (Amersham-Pharmacia) gemäß den Herstellerangaben gekoppelt. Tabelle 4.2 zeigt welche Affinitätsmatrix zur Reinigung welcher Antikörper benutzt wurde:

Tabelle 4.2: Affinitätsmatrices zur Reinigung von Antikörpern

Antikörper/Antiserum	Immunisiertes Antigen	zur Reinigung gekoppeltes Antigen
7B10	SMN-His	GST-SMN-1/160
anti-SIP1	GST-SIP1	SIP1-His
anti-unrip	GST-unrip	His-unrip
anti-Gemin4/GIP1	GST-Gemin4/GIP1	His-Gemin4/GIP1
anti-p175	GST-p175	His-p175
anti-pICln	GST-pICln	His-pICln
anti-PRMT5	GST-PRMT5	His-PRMT5
anti-SmB/B'.D3	His-SmB/B'.D3	His-SmB/B'.D3
anti-SmD1.D2	His-SmD1.D2	His-SmD1.D2
anti-E.F.G	His-SmE.F.G	His-SmE.F.G
anti-SMNrp	GST-SMNrp	His-SMNrp
anti-SMNrp(N)	GST-SMNrp(N-term)	His-SMNrp(N-term)
anti-SMNrp (Tu)	SMNrp(Tudor)-Peptid	His-SMNrp
anti-GST	GST	GST

Zur Reinigung wurden 10 ml des jeweiligen Antiserums mit 1ml (gekoppeltes Antigen: 1mg/ml) der entsprechenden Säulenmatrix inkubiert. Nach aufeinanderfolgenden Waschschritten mit PBS (pH 7,4) und 10 mM Tris (pH 8,0) wurden die gebundenen Antikörper mit 100 mM Glycin (pH 2,3) eluiert und sofort in 10 % (v/v) 2 M Tris/HCl (pH 8,8) aufgenommen. Die Lagerung der Affinitätssäulen erfolgte bei 4°C in PBS (pH 7,4) in Anwesenheit von 0.05% Natriumazid.

4.3.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendeten COS-1- und HeLa-Zellen wurden auf sterile Deckgläschen in 24 Kavitäten Platten (Costar, Gibco BRL) ausgesät und bis 60% Konfluenz kultiviert. Die einzelnen Kavitäten wurden mit PBS (pH 7,4) gewaschen (alle Waschschrritte: 500 μ l/Kavität) und mit 3 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) für exakt 7 min fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 10 min mit 0,2 % Triton-X-100 in PBS (pH 7,4). Anschließend wurde zweimal mit 100 mM Glycin in PBS (pH 7,4) sowie einmal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und die Zellen dann mit 3 % Rinderserum-Albumin (BSA) in PBS (pH 7,4) für 45 min abgeblockt. Nach fünfmaligem Waschen mit TBP-Puffer wurden die Zellen entweder mit affinitätsgereinigtem monoklonalem anti-SMN-Antikörper 7B10 oder polyklonalem anti-SmB/B'.D3, anti-SmE.F.G und anti-SMNr ρ Antikörpern (Verdünnung jeweils 1:500 in TBP-Puffer) für 1h bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschrritten mit TBP-Puffer wurden die Zellen dann mit TRITC-konjugiertem anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:200) und FITC-konjugiertem anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:200) für 1h im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen dreimal mit TBP-Puffer, zweimal mit ddH₂O gewaschen und in einem Tropfen DABCO-Mowiol (1 ml Mowiol + 0,05 g DABCO) eingedeckt. Die gefärbten Zellen wurden sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) als auch unter dem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss) analysiert.

4.3.4 Western Blotting

Für Western Blot-Analysen wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, und mit Hilfe einer „semi-dry“ Blotapparatur auf eine Nitro-Cellulose-Membran (Amersham) transferiert. Dazu wurden zunächst je 4 Lagen Whatman-Filterpapier auf die Blotapparatur gelegt. Anschließend folgte die Membran, das Gel und weitere 4 Lagen Filterpapier. Alle Lagen wurden ausgiebig mit Transfer-Puffer (Lämmli-Puffer + 20% Methanol) befeuchtet. Die Proteine wurden bei Raumtemperatur 2h auf die Membran geblottet. Die Berechnung der

benötigten Stromstärke erfolgte dabei nach folgender Formel: Fläche der Membran \cdot 0.8 = x mA. Die Membran wurde in TBS-Puffer (engl.: Tris-buffered saline; Sambrook et al., 1989, B14), der 5% (w/v) Magermilchpulver und 0.5% (v/v) Tween-20 (Roth) enthielt (TBT-Puffer), für 1 h geblockt. Nach 1-2 h Inkubation mit dem primären Antikörper der 1:500 in TBT-Puffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver verdünnt wurde, folgte viermaliges Waschen mit TBT-Puffer für je 15 min. Schließlich wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (anti-Kaninchen oder anti-Maus; Sigma) ebenfalls 1 h inkubiert und anschließend erneut viermal mit TBT-Puffer gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit dem *enhanced chemiluminescence system* (ECL) wie folgt sichtbar gemacht. 10 ml 1.25 mM Luminol (gelöst in 100 mM Tris/HCl pH 8.5), 150 μ l 6.8 mM p-Coumaric Acid (gelöst in DMSO) und 4 % (v/v) H₂O₂ wurden gemischt und die Membran 1-2 min darin inkubiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilms erfolgte schließlich die Entwicklung

4.3.5 Immunpräzipitationsexperimente

Um im kleinen Maßstab zu untersuchen, ob Faktoren *in vivo* miteinander interagieren, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden 1-2 μ g der entsprechenden Antikörper an 50 μ l ProteinG-Sepharose (Amersham-Pharmacia) für 1h bei RT gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer wurde 1 ml des entsprechenden Extraktes zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 4°C am Rad inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen und Wechseln des Reaktionsgefäßes wurde gebundenes Antigen mit 50 μ l SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Gebundene RNAs wurden mit Phenol extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und am 3'-Ende mit [³²P]-pCp markiert.

Immunpräzipitationen, die zur Depletion des entsprechenden Proteins führten, wurden in analoger Weise durchgeführt. Die Überstände wurden anschließend durch Western Blot-Analysen untersucht.

4.3.6 Immunaffinitätschromatographie

Die Immunaffinitätschromatographie zur Reinigung von SMN-Komplexen folgte dem Prinzip der Immunpräzipitation. Allerdings wurde in diesem Fall affinitätsgereinigter Antikörper eingesetzt (monoklonaler anti-SMN Antikörper 7B10, polyklonaler anti-pICln Antikörper). Die Antikörper wurden zunächst an Protein-G-Sepharose (Amersham-Pharmacia) gebunden und anschließend mittels Dimethylpimelimidate (DMP, Sigma) kovalent vernetzt (2 mg Antikörper/1 ml Sepharose). Die Reaktion wurde wie in (Harlow and Lane, 1988)

beschrieben durchgeführt. Für die Affinitätsreinigung von SMN-Komplexen bzw. pICln-Komplexen wurden Zellextrakte mehrfach über die entsprechende Säule geladen und anschließend mehrfach mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Gebundene Komplexe wurden mit 100 mM Glycine (pH 2,3) eluiert und mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Nach zweifachem Waschen in TCA-Waschpuffer wurden die präzipitierten Proteine in 50 μ l SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. Für eine Kontrollsäule wurde monoklonaler anti-Flag-Antikörper M2 (Sigma) oder polyklonale anti-GST Antikörper ebenfalls mittels DMP kovalent an ProteinG-Sepharose gekoppelt (2 mg Antikörper/1 ml Sepharose).

Zur Reinigung des SMN/pICln-Komplexes wurde eine anti-pICln-Affinitätschromatographie durchgeführt. Zur Dissoziation des SMN-Komplexes von der anti-pICln-Matrix wurde die beladene Säule mit Dissoziationspuffer gewaschen.

Zur Gewinnung des SMN Δ SmB/B'.D3-Komplexes wurde die anti-SMN-Säulenmatrix nach dem Beladen intensiv mit 850mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit PBS (pH 7,4) und der Komplex wurde für *in vitro* U snRNP-Rekonstitutionsstudien herangezogen. Das Beladen diese Komplexes mit den Sm-Proteinen erfolgte durch die Inkubation mit 50 μ g gereinigter Sm-Proteine (TPs). Anschließend wurde die Säulenmatrix intensiv mit PBS (pH 7,4) gewaschen und für U snRNP-Zusammenlagerungsstudien herangezogen.

4.4 Biochemische Methoden

Alle Protein-biochemischen Standardmethoden (Coomassie- bzw. Silberfärbung von Proteingelen und RNA-gelen, TCA-Präzipitation, Aceton-Präzipitation etc.) wurden wie in Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzung der nicht näher beschriebenen Puffer.

4.4.1 Gel-Systeme

4.4.1.1 Denaturierende RNA-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die in dieser Arbeit untersuchten RNA-Spezies (snRNAs, prä-mRNA) wurden durch denaturierende RNA-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Die Acrylamidkonzentration betrug dabei 5% und der Vernetzungsgrad 19:1 (Acrylamid : Bisacrylamid). Als Puffersubstanz wurde 0.5 x TBE verwendet, und als denaturierendes Agens diente 7.5 M Harnstoff. Nach der Zugabe von 0.5 ml APS und 50 μ l TEMED pro 100ml Gellösung wurde der Ansatz zwischen zwei mit Klebeband abgedichtete Glasplatten gegossen und mit einem Kamm zur Aussparung der Probestaschen versehen. Das RNA-Gel wurde vor dem Auftragen

der Proben 1h bei 250 V vorlaufen lassen. Vor dem Auftragen wurden die Ansätze mit 1/10 Volumen denaturierendem RNA-Proben-Puffer versehen und 5 min bei 100°C gekocht. Die Taschen des Gels wurden anschließend mit 0.5 x TBE gespült. Nach dem Auftragen erfolgte der Gellauf zunächst 30 min bei 250 V und wurde anschließend auf 400-650 V erhöht.

4.4.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Zunächst wurden zwei Gelplatten mit 2% Agarose abgedichtet. Diese Vorrichtung wurde anschließend zu 4/5 mit 12%iger Trenngellösung gefüllt und mit 1ml Ethanol (100%) überschichtet. Nach 30 min wurde der Ethanol abgegossen und das Trenngel mit einer 5%igen Sammelgellösung überschichtet, in die der Kamm zur Aussparung der Taschen platziert wurde. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Alle Proteine wurden 5 min bei 100°C gekocht und bei 65mA aufgetrennt.

4.4.1.3 Native Gelelektrophorese zur Analyse von prä-spleißosomalen Komplexen

Die bei der *in vitro* Spleißreaktion entstehenden prä-spleißosomalen Komplexe wurden durch native Gelelektrophorese (Composit-Gel) analysiert. Es wurden zunächst folgende Lösungen zusammenpipettiert: 12.6 ml 20% Acrylamidlösung (Acrylamid:methylen-bis-acrylamid=80:1 (w/v)), 8.3 ml Glycerin (87%), 2.2 ml 10x TBE, 0.96 ml 10% APS und 11.9 ml H₂O. Zu dieser Lösung wurden 36 ml einer 1%igen Agaroselösung heiß und 35µl TEMED dazugegeben, gut gemischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Vor dem Beladen lief das Gel in 0.3x TBE bei 35mA für ca. 30 min vor. Die Proben wurden vor dem Laden mit 1/10 vol Heparin (5mg/ml) und 1/10 vol Glycerin (87%) gemischt. Der Gellauf erfolgte in 0.3x TBE bei Raumtemperatur für 3-5 h.

4.4.1.4 Native Gelelektrophorese zur Analyse der U snRNP-Biogenese

Die Analyse der U snRNP-Biogenese erfolgte durch native Gelelektrophorese. Zum Gießen des Gels wurde eine Gellösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 5% Polyacrylamid-Lösung (Acrylamid/N/N'-methylen-bisacrylamid im Verhältnis 80:1), 4% Glycerin und 0.5 x TBE, 300 µl APS und 30µl TEMED. Als Laufpuffer für dieses Gelsystem wurde 0.5 x TBE verwendet und der Gellauf erfolgte bei einer Stromstärke von 30mA und bei 4°C. Vor dem Beladen der Gele liefen sie zunächst für 30 min unter den beschriebenen Bedingungen vor. Vor dem Beladen wurden die Proben mit 0.5 – 1 Vol. nativem RNA-Probenpuffer versetzt.

4.4.2 Proteinexpression

Zur Expression von rekombinanten Proteinen oder Proteinfragmenten wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte entweder in die *E. coli* Stämme DH5 α (bei Konstrukten, die sich von pGEX6P-1 ableiten) oder BL21(DE3) (bei Konstrukten, die sich von pET-Vektoren ableiten) transformiert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die 1,5 l Kulturen mit 0,2 mM IPTG (pGEX6P-1-Konstrukte) oder 1 mM IPTG (pET28a-Konstrukte) induziert und für 5h bei 25°C inkubiert. Das Ernten der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min). Zum Zellaufschluß wurden die Pellets zunächst in Lyse-Puffer resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach erneutem Zentrifugieren (25000 g, 1h, 4°C) wurden die Überstände wie in 4.5.3 beschrieben aufgearbeitet.

4.4.3 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen

Zur Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen bzw. Proteinfragmenten wurden die jeweiligen *E. coli* Extrakte mit Glutathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia) für 2h bei 4°C inkubiert. Die Waschschrte erfolgten mit Waschpuffer und die Elution mit 10 mM Glutathion in 100 mM Tris/HCl (pH 8). Die eluierten Proteine wurden gegen 200 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ dialysiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Reinigung von His-Fusionsproteinen wurden die jeweiligen *E. coli* Extrakte mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen) für 4h bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen mit Waschpuffer wurden die gebundenen Proteine mit 150 mM Imidazol in Waschpuffer eluiert, gegen 200 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ dialysiert und in N₂ eingefroren. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

4.4.4 Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation von Proteinen

Zur gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation von SMN, SIP1, dp103/Gemin3, Gemin4/GIP, unrip, p175 dem 90K-Protein und dem 60K-Protein wurde das „TNT-T7 coupled Transcription/Translation Assay“ der Firma Promega herangezogen. Die zur Translation verwendeten Konstrukte enthielten alle einen T7 Promoter und leiteten sich von pET21a, pET28a oder pBluescriptII KS(-) ab. Zur radioaktiven Markierung wurde [³⁵S]-Methionin verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1 μ l	Plasmid-DNA (0,1-1 μ g/ μ l)
1 μ l	[³⁵ S]-Methionin (10 μ Ci/ μ l)
0,5 μ l	Rnasin (Promega)

45 μ l TNT-T7 Quick Reticulocyte Lysate (Promega)

Die Reaktion wurde für 2h bei 30°C inkubiert und in N₂ eingefroren. Um die radioaktive Markierung zu überprüfen wurden zunächst 0.5 μ l der Reaktion durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert.

4.4.5 *In vitro* Bindungsexperimente

Für Bindungsexperimente wurden eine Komponente jeweils rekombinant als GST-Fusion exprimiert und immobilisiert, während die anderen Komponenten in Form von *in vitro* translatierten Proteinen zugegeben wurden. In Bindungsexperimenten, in denen eine direkte Bindung zweier Proteine untersucht wurde, wurden anstatt *in vitro* translatierten Proteinen, bakteriell exprimierte und His-fusionierte Proteine verwendet. 1-2 μ g des jeweiligen mit GST fusionierten Polypeptides wurden dazu mit 30 μ l Glutathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia) für 1h bei RT am Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und Zugabe der *in vitro* translatierten (5 μ l) bzw. der bakteriell exprimierten Proteine (15 μ g) wurde die Reaktion für 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Bindungspuffer und Wechseln des Reaktionsgefäßes wurden gebundene Proteine mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie. Die direkte Interaktion zweier Proteine wurde durch Coomassie-Färbung analysiert.

4.4.6 Präparation von HeLa-Zellextrakten

Die Herstellung von zytosolischen und nukleären HeLa-Zellextrakten wurde in Anlehnung an ein Protokoll von (Dignam *et al.*, 1983) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen.

4.4.6.1 Präparation von nukleären HeLa-Zellextrakten

5x10⁹ HeLa Zellen (Celltech) wurden in PBS (pH 7,4) gewaschen und pelletiert. Nach Resuspension im fünffachen Pelletvolumen mit Roeder-A-Puffer wurden die Zellen für 10 min gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im zweifachen Pelletvolumen Roeder A Puffer erfolgte der Zellaufschluß durch 10 Pistillstöße in einem Glashomogenisator (Douncer). Die Kerne wurden vom Zytoplasma durch Zentrifugation in einem Ausschwingrotor bei 1000 g für 10 min (4°C) getrennt. Nach Resuspension des Pellets (Kerne) in Roeder C Puffer wurden die Kerne durch 15 Pistillstöße im Douncer

aufgeschlossen. Diese Suspension wurde dann für 30 min auf Eis gerührt und zentrifugiert (25000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde 2,5 h gegen Roeder D Puffer dialysiert und in N₂ eingefroren.

4.4.6.2 Präparation von zytosolischen HeLa-Zellextrakten

In der vorliegenden Arbeit wurden 3 unterschiedliche Cytoplasmaextrakte aus HeLa-Zellen hergestellt. Die Zellen wurden dabei wie in 4.5.6.1 beschrieben unter verschiedenen Pufferbedingungen aufgeschlossen. *In vitro* Methylierungsexperimente wurden ebenfalls in cytosolischen Extrakten durchgeführt. Der Roeder A-Puffer enthielt dabei 20 mM KCl. Aus diesem Extrakt wurde der im Ergebnisteil beschriebene pICln-Komplex gereinigt. Alle anderen Komplexreinigungen, sowie die Analysen zur U snRNP-Biogenese wurden in Cytoplasmaextrakten durchgeführt, die unter PBS-Puffer Bedingungen aufgeschlossen wurden.

4.4.6.3 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Totalextrakten wurden HeLa-Zellen pelletiert, mit PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 0,2 % Triton X-100 in PBS (pH 7,4) für 10 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (15000 g, 15 min, 4°C) wurden die Überstände für Immunpräzipitationen verwendet. HeLa-Totalextrakte für Western-Blot-Analysen wurden durch Kochen der Zellen in SDS-PAGE-Probenpuffer hergestellt.

4.4.6.4 Herstellung von *Xenopus laevis* Ei-Extrakten

Die verwendeten *Xenopus laevis* Ei-Extrakte wurden in Zusammenarbeit mit O. Kelm (Arbeitsgruppe von Dr. Erich Nigg; Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) hergestellt. Es handelte sich dabei um Interphase-Extrakte, die nach einem Protokoll von (Murray, 1991) hergestellt wurden.

4.4.7 Gelfiltrationsanalysen

Für die Fraktionierung von zytosolischem HeLa-Zellextrakt mittels Gefiltration wurde eine Superose 6 HR 10/30 Säule (Säulenvolumen: 1 ml, Flußrate: 0,3 ml/min) verwendet. Diese Säulenmatrix erlaubt die Trennung von Protein-Komplexen im Bereich von 1×10^4 - 1×10^6 Da. Es wurden jeweils 250 μ l Extrakt auf die Säule geladen. Die Equilibrierungs- bzw. Elutionsschritte erfolgten entweder mit entgastem PBS (pH 7,4) oder Roeder-A Puffer (20mM KCl). Es wurden insgesamt 30 Fraktionen (je 0.5 ml) gesammelt. Die einzelnen

Fractionen wurden Western Blot-Analysen, für *in vitro* Methylierungsexperimente oder für U snRNP-Rekonstitutionsexperimente verwendet.

Die Bestimmung der molekularen Größen der einzelnen Komplexe erfolgte anhand eines parallelen Säulenlaufes, indem ein Mischung bekannter Proteine verschiedener Größe (High Molecular Weight Standard, Amersham-Pharmacia) unter identischen Bedingungen fraktioniert wurde.

4.4.8 Dichtegradientenzentrifugation

Die Fraktionierung von HeLa-Kernextrakten erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Der verwendete Gradient reichte von 15-45 % Saccharose (w/v) in 150 KCl, 50 Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, hatte ein Volumen von 10 ml und wurde mit einem Gradientenmischer entsprechend der Herstellerangaben hergestellt. Die Präparation der HeLa Zellkernextrakte erfolgte wie in 4.5.6.1 beschrieben, außer dass gegen Roeder D Puffer ohne Glycerin dialysiert wurde. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW41 Ti Rotor (Beckman) für 18 h bei 4°C und 40000 rpm. Nach Beendigung des Laufes wurden 400 µl Aliquots abgenommen, TCA präzipitiert und in SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließendem Western Blotten. Zur Analyse der U snRNAs wurden die einzelnen Fraktionen mit 1 Vol. Phenol extrahiert, die wässrige Phase durch Ethanol präzipitiert und durch denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Die RNAs wurden durch Silberfärbung (analog der Proteinfärbung) sichtbar gemacht.

Zur Untersuchung der Assoziation von rekombinantem SMNrp mit dem 17S U2 snRNPs wurde SMNrp-depletierter HeLa-Kernextrakt zunächst mit 100 ng His-SMNrp, His-SMNrpΔN, His-SMNrpmu1 und His-SMNrpmu2 für 20 min bei 37°C inkubiert. Dichtegradienten wurden mit diesen Extrakten wie oben beschrieben durchgeführt. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte durch Western Blotting mit Antikörper, die gegen den His-Fusionsanteil gerichtet waren.

Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurde ein Referenzgradient durchgeführt, der mit 300 µl einer Proteinmischung aus Cytochrom C (2S), IgG (7S), Catalase (11S), β-Galactosidase (20S) beladen wurde. Die Analyse dieses Gradienten erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung.

4.4.9 Das *Xenopus laevis* Oozyten-System

Weibliche Frösche der Art *Xenopus laevis* produzieren Oozyten, die sich aufgrund ihrer Größe, Stabilität und leichten Zugänglichkeit hervorragend für Injektionsexperimente zur *in vivo* Analyse zellulärer Prozesse eignen.

4.4.9.1 Präparation der Oozyten

Zur Entnahme der Oozyten wurden Frösche durch Unterkühlung auf Eis für 45 min narkotisiert. Dann wurden nacheinander die Bauchhaut und die darunter liegende Muskelschicht durch zwei ca. 0,5–1 cm lange Schnitte durchtrennt und der Bauchraum damit geöffnet. Das freiliegende Ovar konnte mit einer Pinzette aus dem Bauchraum gezogen werden und wurde an gewünschter Stelle mit einer Schere abgeschnitten. Die Operationswunde wurde mit 2-3 Stichen vernäht.

Für Injektionsstudien ist es notwendig, dass das die Oozyten umgebende Bindegewebe entfernt wird. Dazu wurde das Ovar in einer Kollagenase-Lösung (2 mg Kollagenase/ml Barth-Puffer ohne Ca^{2+} für 6h leicht geschwenkt. Anschließend wurde einmal mit Barth-Puffer gewaschen.

4.4.9.2 Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Mikroinjektion wurden 50 μl Injektionskapillaren (Blaubrand) mit Hilfe eines Kapillarziehgeräts (Sutter Instruments Co., Modell P97) gezogen. Die geschlossene Kapillare wurde durch Abbrechen eines kleinen Stückes ihrer Spitze geöffnet. Anschließend wurde die fertige Kapillare in die Kapillarhalterung einer Injektionsapparatur eingespannt. Die genaue Funktionsweise dieses Gerätes ist vom Hersteller beschrieben (Medical Systems corp., Modell PLI100).

Für den Injektionsvorgang wurden die Oozyten auf einer rautenförmigen Schuhsohle fixiert und mit Barth-Puffer bedeckt. Die Injektion erfolgte dann unter einem Binokular unter einem Anstechwinkel von 40° . Für die Injektion in den Zellkern wurde die animale (dunkle) Seite, für Injektionen ins Zytoplasma die vegetative (helle) Seite angestochen und 20 nl (Kern) bzw. 50-70 nl (Zytoplasma) injiziert.

4.4.9.3 Manuelle Isolierung von Zellkern und Cytoplasma

Die Trennung von Kern und Cytoplasma erfolgte unter dem Binokular unter Verwendung zweier Pinzetten in 5:1 Puffer. Mit der einen Pinzette wurden die Oocyte fixiert, während mit der anderen in die animale Seite ein Loch gebohrt wurde. Durch leichtes Drücken an der

vegetativen Hälfte, wurde der Kern aus dem Loch gepreßt. Die Kerne wurden mit einer gelben Spitze direkt in 100% Ethanol pipettiert, während das Cytoplasma in ein Eppendorf-Gefäß mit 5:1 Puffer transferiert wurde.

Im allgemeinen sollte die Isolierung von Kern und Cytoplasma möglichst rasch ablaufen, um Diffusion einzelner Bestandteile zu vermeiden.

4.4.9.4 RNA-Extraktion aus Oocyten

Zur RNA-Extraktion wurden die zu untersuchenden Fraktionen mit Hilfe einer gelben Spitze in Homo-Puffer homogenisiert und mit Proteinase K (1mg/ml) 30-60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Phenol extrahiert und die wässrige Phase mit Ethanol präzipiziert. Die RNA wurde durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese analysiert.

4.4.10 Experimente zur Analyse der U snRNP-Biogenese

4.4.10.1 In vitro Rekonstitution der U snRNP-Biogenese in Extraktsystemen

Für die *in vitro* Rekonstitution der Zusammenlagerung der Sm-core Domäne wurde U1 snRNA *in vitro* transkribiert und mit α -[³²P]-UTP markiert (4.2.5). Die gereinigte RNA wurde in ddH₂O zu einer spezifischen Radioaktivität von 10000 cps/ μ l resuspendiert. Folgende Rekonstitutionsansätze wurden für 30 min bei 20°C im Falle von Ei-Extrakt und 37°C im Falle von HeLa-Extrakt inkubiert:

- 1 μ l U1 snRNA (10000 cpm/ μ l)
- 2 μ l *Xenopus laevis* Eiextrakt bzw. HeLa-Cytoplasmaextrakt
- 1 μ l *E. coli* tRNA (1 μ g/ μ l)
- 1 μ l RNasin (Promega)
- ad 10 μ l PBS

Um die Proteinkomposition der gebildeten RNA-Protein Komplexe zu analysieren („Supershift-Analyse“), wurden die Rekonstitutionsansätze wie beschrieben inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l der jeweiligen Antikörper (1 μ g/ μ l) zugegeben und für weitere 10 min bei 4°C inkubiert. In Antikörperinhibitionsexperimenten wurden die Reaktionsansätze mit 2 μ l anti-SMN (polyklonaler Antikörper der Firma Transduction labs), anti-Gemin2, anti-Gemin4/GIP1 bzw. anti-FLAG Antikörper als Kontrolle (je 1 μ g/ μ l) für 10 min bei 20°C prä-inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe der RNA gestartet. Die Reaktionen

wurden durch native RNA-Gelelektrophorese, wie in 4.5.1.4 beschrieben, analysiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

In Experimenten zur Energieabhängigkeit der U snRNP-Biogenese wurde der *X. laevis* Ei-Extrakt zunächst für 24h gegen PBS (pH 7,4) dialysiert und anschließend in die oben beschriebenen Reaktionen eingesetzt. Dieser ATP-depletierte Extrakt wurde mit 5mM ATP, 2mM MgCl₂ und 10mM Kreatinphosphat rekonstituiert. Zur Analyse der ATP-Hydrolyse wurden 10 mM ATPγS eingesetzt.

4.4.10.2 *In vitro* Rekonstitution der U snRNP-Biogenese durch den gereinigten SMN- bzw. SMN/pICln-Komplex

Zur Analyse der U snRNP-Zusammenlagerung durch den gereinigten SMN- bzw. SMN/pICln-Komplex wurden 20 µl ProteinG-Matrix mit gebundenem SMN- bzw. SMN/pICln-Komplex verwendet. Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl U1 snRNA (10000 cpm/µl)
- 20 µl SMN- bzw. SMN/pICln-Komplex
- 2 µl *E. coli* tRNA (1 µg/µl)
- 2 µl RNasin (Promega)
- 2 µl ATP (100 mM)
- 2 µl MgCl₂
- ad 35 µl PBS

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10µl des Überstandes abgenommen mit 0.5 Vol. nativem RNA-Probenpuffer versetzt und der native Gelelektrophorese analysiert. Bei der Untersuchung der Energieabhängigkeit erfolgte die Inkubation bei 4°C. Antikörperinhibitionsstudien wurden wie in 4.5.10.1 beschrieben durchgeführt.

4.4.11 Identifikation von Proteinen mittels MALDI

Zur Identifikation von Proteinen wurden die entsprechenden Banden aus Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gelen ausgeschnitten und direkt im Gel mit Trypsin oder LysC nach (Eckerskorn and Lottspeich, 1989) verdaut. Die massenspektroskopische Analyse der Peptidfragmente erfolgte mittels eines „Bruker Reflex III MALDI – time of flight“ Massen-Spektrometer (Bruker-Franzen, Bremen) und wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Lottspeich

(MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Die ermittelten Peptidmassen wurden dann für Datenbankanalysen mit dem Programm MSFIT (<http://prospector.ucsf.edu>) verwendet.

4.4.12 *In vitro* Spleißreaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Version des Adenovirus „major late 2“ als prä-mRNA verwendet, deren Intron durch Insertion des rev-response element (RRE) verlängert worden war (pAD48 (Fischer *et al.*, 1995)). Das Plasmid wurde durch die Restriktionsendonuklease BamHI linearisiert und mit α -[^{32}P]-UTP und T7-Polymerase transkribiert (siehe 4.2.5). Nach der Isolierung aus einem denaturierenden 5% Polyacrylamid-Gel wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert und das getrocknete Pellet in H_2O aufgenommen. In einem Gesamtvolumen von 12.5 μl wurden folgende Komponenten bei 30°C inkubiert:

30%	(v/v) spleißaktiver Zellkernextrakt
2.5mM	MgCl_2
40mM	KCl
9mM	Hepes-KOH pH 7.9
2mM	ATP
10mM	Kreatin-Phosphat (Sigma)
$3 \cdot 10^4\text{cpm}$	pAD48-Transkript
ad ddH ₂ O 12.5 μl (finales Volumen)	

Nach 55 min Reaktionszeit wurden 237.5 μl PBS und 250 μl Phenol (Roth) zugegeben und für 30 min geschüttelt. Die wässrige Phase wurde anschließend abgenommen, mit Ethanol präzipitiert und in RNA-Probenpuffer resuspendiert. Die entstandenen RNA-Intermediate wurden durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese analysiert.

Zur Analyse der prä-spleißosomalen Komplexe wurden Spleißreaktionen über verschiedene Zeiträume (10-60 min) inkubiert, anschließend mit 1.25 μl Heparin (5mg/ml, Sigma) und 1.25 μl Glycerin (87%, Roth) versetzt und durch native Gelelektrophorese analysiert.

In Antikörperinhibitionsexperimenten wurde die Antikörperlösung gegen Roeder D-Puffer dialysiert und anschließend 3-10 μg Antikörper in die *in vitro* Spleißreaktion eingesetzt. Zu beachten war dabei, dass die KCl-Konzentration nicht über 40mM stieg. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C vorinkubiert bevor die radioaktiv markierte prä-mRNA dazugegeben wurde. Die Proben wurden wie oben beschrieben analysiert.

In Spleißreaktionen in denen transdominante Effekte von mutierten SMNrp-Varianten untersucht wurden, wurde genauso verfahren wie in Antikörperinhibitionsstudien. Hierbei wurden 0.5-5µg rekombinantes His-SMNrp, His-SMNrpΔN, His-SMNrpmu1 und His-SMNrpmu2 eingesetzt.

In Spleißreaktionen, mit depletierten Kernextrakten wurden 50% des SMNrp- bzw. mock-depletierten-Extraktes verwendet. Der SMNrp-depletierte Kernextrakt wurde durch 1 – 5 µg His-SMNrp rekonstituiert.

4.4.13 Quervernetzung von RNA-Proteinen-Komplexen durch UV-Licht

Die Interaktion von RNA und Proteinen kann durch Quervernetzung mit UV-Licht untersucht werden. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit, die vom SMN-Komplex *in vitro* assemblierte Sm-core-Domäne (siehe 4.5.10.2) als Tropfen auf Parafilm (Pechiney) plaziert. Dieser Parafilmstreifen wurde nun für 20 min mit 840 mJ UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (Stratalinker der Firma Stratagene). Die vernetzten RNA-Protein-Komplexe wurden anschließend durch 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt, getrocknet und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.4.14 *In vitro* Methylierungsexperimente

Zur Untersuchung der Methylierung von Sm-Proteinen wurden *in vitro* Methylierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde entweder durch Gelfiltration fraktionierter oder unfraktionierter HeLa-Cytoplasmaextrakt verwendet. Ein typischer Methylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10µl Extrakt (ca. 20µg/µl)
1µCi [³H]-S-adenosyl-Methionin (SAM, Amersham)
0.5µg Substrat-Protein
2µl 10x Methylierungspuffer
ad. 20µl ddH₂O

Als Substrat-Proteine wurden GST-SmD3-RG, SmB(1-168).D3, SmD1.D2, SmE.F.D, GST-Fusionsanteil, Histon H2A (Sigma) verwendet. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

In Experimenten, in denen die Methylierungsaktivität des pICln-Komplexes untersucht wurde, wurde statt Extrakt anti-pICln-Affinitätssäulenmatrix mit gebundenem pICln-

Komplex verwendet. Der Überstand wurde durch SDS-PAGE analysiert. In Antikörperinhibitionsstudien wurde die Matrix vorher mit 20 µg anti-PRMT5 Antikörper inkubiert.

4.4.15 Isolierung von Proteinen aus gereinigten U snRNPs (TPs)

Vorgequollene DEAE-Cellulose (DE-53) wurde in einem 10fachen Volumen einer 4M Kaliumacetatlösung suspendiert und anschließend 1 min bei 5000 rpm pelletiert. Die DEAE-Zellulose wurde dann ebenso mit einem 10fachen Volumen ddH₂O behandelt. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt bevor die DEAE-Cellulose mit einem 10fachen Volumen an DE-53 Waschlösung gewaschen wurde. Zur Isolierung der Proteine wurden 2 mg affinitätsgereinigte U snRNPs (Bringmann and Luhrmann, 1986) in 5 ml Roeder C-Puffer mit 10 ml DE-53 Elutionspuffer gemischt (finale Salzkonzentration: 150 mM KAc und 140 mM NaCl) und auf 5 ml vorbehandelte DEAE-Cellulose in einem 30 ml Corexröhrchen gegeben. Unter gelegentlichem, vorsichtigem Aufschütteln erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 4°C und anschließend weitere 15 min bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 4°C und 10000 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge (Rotor: SS34) zentrifugiert. Der Proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und auf Eis gestellt. Zur Nachelution wurde die DEAE-Cellulose in einem Vol. Waschlösung resuspendiert, 15 min bei 37°C inkubiert und abzentrifugiert. Die Überstände aus beiden Zentrifugationen wurden vereinigt. Zur Konzentrierung der Proteine wurden Centicon-Röhrchen der Firma Micon verwendet. Hierbei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Untersuchung der U snRNP-Biogenese

Die detaillierte Analyse der U snRNP Biogenese setzt ein geeignetes Testsystem hierfür voraus. Zu Beginn dieser Arbeit ließ sich dieser Vorgang nur durch Mikroinjektionsexperimente im *Xenopus laevis* Oocyten-System analysieren (Fischer *et al.*, 1997). Da das Oocyten-System keine detaillierten biochemischen Analysen erlaubt, sollte zunächst ein zellfreies Testsystem zur Untersuchung der U snRNP-Zusammenlagerung etabliert werden.

Um zu testen, ob sich die U snRNP-Ausbildung *in vitro* nachvollziehen lässt, wurde *X. laevis* Eiextrakt zusammen mit einer radioaktiv markierten U1 snRNA über verschiedene Zeiträume inkubiert (Abb.: 5.1). Um unspezifische Wechselwirkungen der U snRNA mit Extraktproteinen zu reduzieren, wurde zum Rekonstitutionsansatz ein zehnfacher molarer Überschuss an tRNA und Heparin gegeben. Die ausgebildeten Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) wurden anschließend durch native Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie in Abbildung 5.1A zu sehen ist, wurde die U1 snRNA effizient in drei Komplexe inkorporiert, die als R1 (RNP1), R2 (RNP2) und M („mature“ RNP) bezeichnet wurden (Spur 1-5). Durch die Steigerung der Extraktmenge im Reaktionsansatz ließ sich die gesamte U1 snRNA in den M-Komplex verschieben, was andeutet, dass die Komplexe R1 und R2 Intermediate bei der Ausbildung des M-Komplexes sind (Abb.: 5.1B, Spur 2).

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob sich die beschriebenen Komplexe spezifisch an der U1 snRNA bilden. In diesem Fall sollte nicht markierte U1 snRNA kompetitiv wirken und die U snRNP-Zusammenlagerung in diesem System blockieren. In der Tat inhibiert die Addition eines 100fachen Überschusses nicht markierter U1 snRNA die Entstehung der Komplexe R1, R2 und M während die gleiche Menge tRNA keinen Einfluss hatte. Alle drei RNP-Komplexe entstehen daher spezifisch an der U1 snRNA (Abb.: 5.1A, Spuren 12-14).

Als nächstes wurde untersucht, welche U1-Proteine im Eiextrakt mit der U1 snRNA assoziieren. Zunächst wurde die Ausbildung der Sm-core-Domäne, d.h. die Anlagerung der Sm-Proteine an die U snRNA untersucht. Hierzu wurde die beschriebene *in vitro* Zusammenlagerungsreaktion durchgeführt und anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Sm-Proteine B/B' und D1 (anti-Sm-Antikörpern Y12 (Lerner *et al.*, 1981)) inkubiert. Wie in Spur 15 zu erkennen ist, ließen sich durch Y12 die Komplexe R2 und

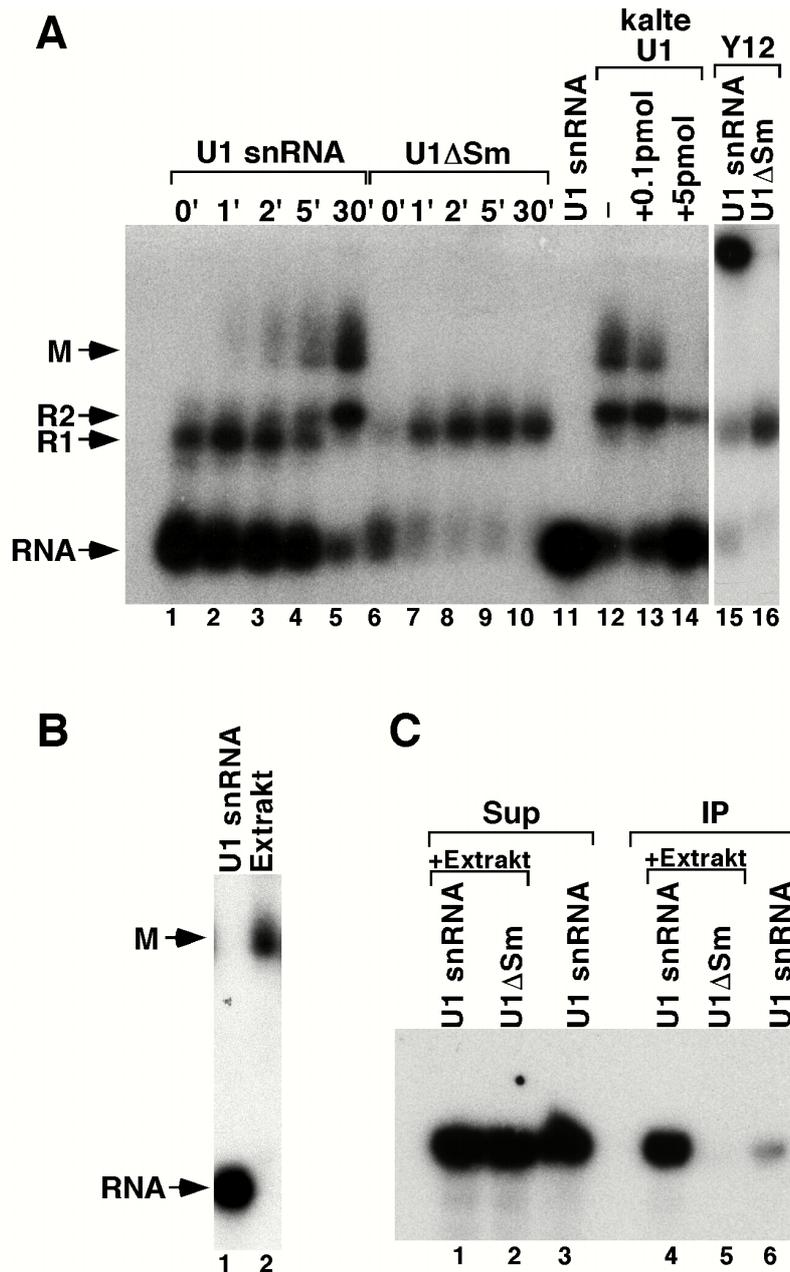


Abbildung 5.1: *In vitro* Zusammenlagerung des U1 snRNPs in *Xenopus laevis* Ei-Extrakt. (A) [^{32}P]-markierte U1 snRNA (Spuren 1-5) bzw. U1 Δ Sm (Spuren 6-10) wurden zusammen mit *X.laevis* Ei-Extrakt bei 20°C während der angegebenen Zeiträume inkubiert. Die entstandenen RNA-Protein-Komplexe wurden durch native Gelelektrophorese voneinander getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 11 zeigt die U1 snRNA alleine. Die Ausbildung des U1 snRNPs in Anwesenheit von steigenden Mengen nicht markierter U1 snRNA ist in den Spuren 13 und 14 dargestellt, während die Reaktion in Spur 12 keine unmarkierte U1 snRNA enthält. Die Spuren 15 und 16 zeigen Assemblierungsreaktionen mit radioaktiv markierter U1 snRNA bzw. U1 Δ Sm, die nach 30 minütiger Inkubationszeit mit monoklonalen Antikörpern (Y12) gegen die Sm-Proteine inkubiert wurden. (B) Die U1 snRNP-Zusammenlagerungsreaktion wurde mit einem Überschuss *X.laevis* Ei-Extrakt durchgeführt (Spur 1). Die Reaktionen wurden durch native Gelelektrophorese analysiert. Spur 1 zeigt die freie U1 snRNA. (C) Radioaktiv markierte und m 7 G-gecappte U1 snRNA bzw. U1 Δ Sm wurden wie in (A) beschrieben zu RNPs zusammengelagert. Die RNAs wurden anschließend mit dem m 2,2,7 G-cap spezifischen Antikörper R1131 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate sind in den Spuren 4 und 5, die dazugehörigen Überstände in 1 und 2 dargestellt. Als Kontrolle wurde freie m 7 G-gecappte U1 snRNA für die Immunpräzipitation herangezogen (Spuren 3 und 6). Alle RNAs wurden durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese analysiert.

M, nicht aber R1 in Aggregate höherer Molarität verschieben (engl.: supershift), was andeutet, dass beide Komplexe Sm-Proteine enthalten.

Um diese Befunde weiter zu erhärten, wurde die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne an einer U1 snRNA getestet, deren Sm-Bindungsstelle (engl.: Sm-site) mutiert war und daher nicht mit Sm-Proteinen in Wechselwirkung treten kann (U1 Δ Sm) (Abb.: 5.1A, Spuren 6-10). In der Tat konnte U1 Δ Sm nur R1, nicht aber R2 oder M ausbilden, was beweist, dass letztere Komplexe Sm-Proteine enthalten, die an die Sm-Bindungsstelle der U1 snRNA gebunden sind. Weitere Zusammenlagerungsstudien an mutierten U1 snRNAs zeigten darüber hinaus, dass der M-Komplex neben den Sm-Proteinen auch die U1 spezifischen Proteine A und 70K enthält, wohingegen R1 nur das A-Protein gebunden hat (nicht gezeigt).

Als nächstes galt es zu klären, ob sich die vollständige Sm-core-Domäne an der U snRNA *in vitro* ausbildet, oder ob es sich bei den beobachteten Komplexen (R2 und M) lediglich um Zusammenlagerungsintermediate handelt. Als Kriterium für die reife Sm-core-Domäne wurde die Hypermethylierung des m⁷G-caps zur charakteristischen m₃G-cap-Struktur herangezogen, da in früheren Arbeiten gezeigt worden war, dass diese Modifikation die vollständig ausgebildete Sm-core-Domäne voraussetzt (Plessel *et al.*, 1994). Um dies zu prüfen, wurde durch *in vitro* Transkription [³²P]-markierte U1 snRNA und U1 Δ Sm hergestellt und kotranskriptional mit einem m⁷G-cap versehen. Diese m⁷G-cap enthaltenden snRNAs wurde dann unter Rekonstitutionsbedingungen mit einem Überschuss an *X. laevis* Ei-Extrakt inkubiert, um eine quantitative Zusammenlagerung des M-Komplexes an der wild-typ-Form der U1 snRNA zu erhalten. Anschließend wurde die U1 snRNA extrahiert und mit dem m₃G-cap spezifischen Antikörper R1131 (Fischer and Luhrmann, 1990) immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 5.1C zu sehen ist, wurde die radioaktiv markierte U1 snRNA, nicht aber U1 Δ Sm, hypermethyliert und daher effizient durch das R1131-Serum immunpräzipitiert (Spur 4).

Die oben dargestellten Experimente lassen daher den Schluss zu, dass sich im *Xenopus laevis* Ei-Extrakt die Zusammenlagerung der funktionellen Sm-core-Domäne rekapitulieren läßt. Mit der Verfügbarkeit dieses Systems wurde die Voraussetzung für eine detaillierte biochemische Analyse des U snRNP-Biogeneseweges geschaffen.

5.2 Die Zusammenlagerung von U snRNPs ist ein ATP-verbrauchender Prozess

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass isolierte Sm-Proteine spontan (d.h. bei 4°C und in Abwesenheit von ATP und assistierenden Faktoren) die Sm-core-Domäne an einer Sm-Bindungsstelle ausbilden können (Raker *et al.*, 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob im *X.*

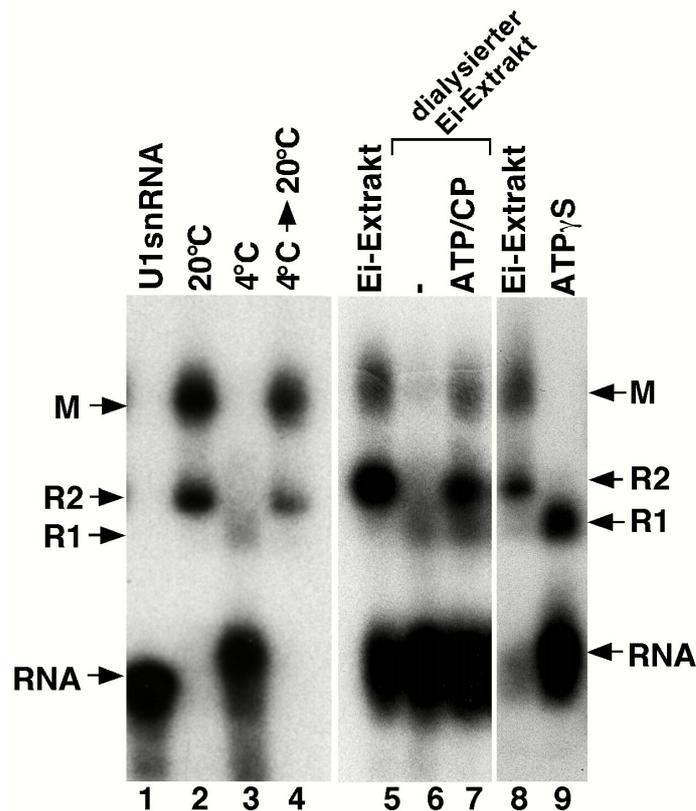


Abbildung 5.2: ATP-abhängige U1 snRNP-Zusammenlagerung im *X.laevis* Ei-Extrakt. [^{32}P]-markierte U1 snRNA wurde mit *X.laevis* Ei-Extrakt bei 20°C (Spur 2), 4°C (Spur 3) und 4°C mit anschließender Inkubation bei 20°C (Spur 4) inkubiert. In den Spuren 5-7 sind Assemblierungsreaktionen mit unbehandeltem Extrakt (Spur 5), dialysiertem Extrakt (Spur 6) und dialysiertem Extrakt, der durch 2mM ATP, 10mM Kreatinphosphat und 5mM MgCl_2 komplementiert worden war (Spur 7). Zusammenlagerungsreaktionen in unbehandeltem Extrakt und Extrakt, der mit 10mM $\text{ATP}\gamma\text{S}$ präinkubiert worden war, sind in den Spuren 8 und 9 dargestellt. Alle dargestellten Reaktionen wurden durch native Gelelektrophorese analysiert.

laevis Ei-Extrakt die Sm-Proteine ebenfalls spontan an die U1 snRNA binden können. Um einen ersten Hinweis darüber zu erhalten, wurde die Zusammenlagerung des U1-Partikels bei 4°C untersucht. Interessanterweise ist unter diesen Bedingungen die Ausbildung der Komplexe R2 und M nicht möglich, wohingegen der Komplex R1, der keine Sm-Proteine enthält, gebildet werden kann (Abb.: 5.2, Spur 3). Diese Inhibition ist reversibel, da durch Aufheizen der Reaktion auf Raumtemperatur die Komplexe R2 und M gebildet werden können (Spur 4). Bereits diese initialen Experimente ließen vermuten, dass die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne im Ei-Extrakt mechanistisch anders abläuft als die spontane Zusammenlagerung mit isolierten Komponenten. Die Temperaturabhängigkeit der Zusammenlagerungsreaktion deutete an, dass es sich hierbei um einen energieabhängigen Prozess handeln könnte. Tatsächlich führte die Depletion von ATP (und anderen kleinen Molekülen) aus dem Ei-Extrakt zu einer starken Verminderung der U snRNP-

Zusammenlagerungsaktivität (Spur 6). Um auszuschließen, dass die Verminderung dieser Aktivität auf den Verlust anderer Faktoren zurückzuführen war, wurde der dialysierte Ei-Extrakt im nächsten Experiment mit ATP komplementiert. Diese Vorgehensweise führte zu einer signifikanten Zunahme der Assemblierungsaktivität (vergleiche Spuren 6 und 7). Diese Daten zeigten daher, dass die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne nur in Anwesenheit von ATP ablaufen kann.

In nächsten Versuch wurde analysiert, ob ATP während der Ausbildung der Sm-core-Domäne hydrolysiert wird, oder ob das Nukleotid lediglich als Kofaktor gebraucht wird. Eine Möglichkeit dies nachzuweisen, besteht darin die Reaktion durch die Zugabe von ATP γ S, einem nur sehr langsam hydrolysierbaren ATP-Analogon, zu blockieren. Dazu wurde unbehandelter Ei-Extrakt mit [³²P]-markierter U1 snRNA in Anwesenheit eines Überschusses ATP γ S inkubiert. Wie in Abbildung 5.2 zu erkennen ist, wurde durch diese Vorgehensweise die Ausbildung der Komplexe R2 und M blockiert (Spur 9).

Die hier beschriebenen Studien lassen den Schluss zu, dass die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne im *X. laevis* Ei-Extrakt ein aktiver Prozess ist, der Energie in Form von ATP verbraucht.

5.3 Für die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vitro* sind zusätzliche zelluläre Faktoren notwendig

Antikörper-Injektionsexperimente in *Xenopus laevis* Oocyten lieferten einen ersten Hinweis auf eine Beteiligung von SMN und Gemin2 an der Biogenese von U snRNPs wobei deren Funktion bei diesem Prozess weitgehend unklar blieb (Buhler *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 1997). Das zellfreie Rekonstitutionssystem im Eiextrakt bot nun die Möglichkeit die Beteiligung von SMN und Gemin2 (und möglicher weiterer Faktoren) an der Zusammenlagerung von U snRNPs im Detail zu untersuchen.

Zunächst sollte geklärt werden, ob die U1 snRNP-Zusammenlagerung, ähnlich wie in *X. laevis* Oocyten, durch Antikörper gegen Komponenten des SMN-Komplexes inhibiert werden kann (Abb.: 5.3). Dazu wurde Eiextrakt mit Antikörper gegen SMN, Gemin2 bzw. Gemin4/GIP präinkubiert und anschließend die Zusammenlagerung des U1 snRNPs untersucht. In der Tat konnte beobachtet werden, dass alle drei Antikörper die Ausbildung der Komplexe R2 und M und damit der Sm-core-Domäne blockierten (Spuren 1, 3 und 5). Das *in vitro* Rekonstitutionssystem zeigt daher eine ähnliche Abhängigkeit der U snRNP-Biogenese wie zuvor in *X. laevis* Oocyten beobachtet wurde.

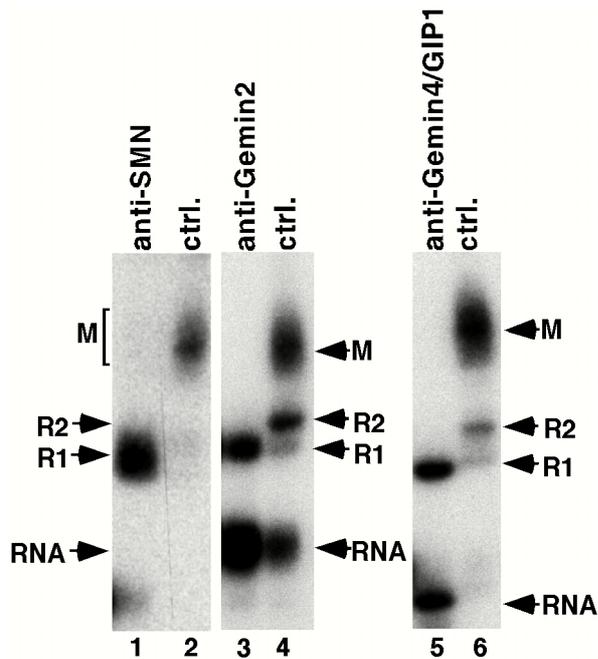


Abbildung 5.3: Antikörper gegen SMN, Gemin2 und Gemin4/GIP1 inhibieren die U1 snRNP-Ausbildung *in vitro*. Affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper gegen SMN (Spur 1), Gemin2 (Spur 3), Gemin4/GIP1 (Spur 5) und gegen ein nicht verwandtes Protein (Spuren 2, 4 und 6) wurden zusammen mit *X.laevis* Ei-Extrakt für 15 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde [³²P]-markierte U1 snRNA zugegeben, für 30 Minuten inkubiert und die RNA-Protein-Komplexe durch native Gelelektrophorese analysiert.

In den folgenden Experimenten wurden nun SMN und Gemin2 aus dem Ei-Extrakt immundepletiert um eine direkte Beteiligung dieser Komponenten an der U snRNP-Biogenese nachzuweisen. Hierzu wurde Ei-Extrakt mit einer Protein-G-Matrix inkubiert, an die Antikörper gegen SMN und Gemin2 gekoppelt waren. Diese Prozedur führte zu einer nahezu vollständigen Immundepletion beider Proteine während in Extrakten, die mit einer Kontrollmatrix (anti-Glutathion-S-Transferase; GST) inkubiert wurden, die Mengen der beiden Proteine nicht verändert war (Abb.: 5.4A, vergleiche Spuren 1, 2 mit 3, 4). Obwohl frühere Studien gezeigt hatten, dass SMN mit Sm-Proteinen assoziiert ist, führte die Depletion von SMN und Gemin2 nur zu einer marginalen Reduzierung von SmB/B' und D1 (Spuren 1-4). Dies deutete an, dass im Ei-Extrakt die Hauptmenge der Sm-Proteine nicht an SMN gebunden vorliegt. Interessanterweise erlaubte der SMN/Gemin2-depletierte Extrakt die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne an der U1 snRNA nicht mehr, obwohl noch große Mengen an Sm-Proteinen vorhanden waren. Dies war auf die spezifische Depletion von SMN und Gemin2 zurückzuführen, da der Kontroll-depletierte Extrakt die Entstehung der Komplexe R1, R2 und M erlaubte (Abb.: 5.4B, Spuren 1 und 2). In beiden Extrakten konnte sich aber der Komplex R1, der keine Sm-Proteine enthält, ausbilden (Spuren 1 und 2).

Um auszuschließen, dass der Verlust dieser Aktivität auf die Kodepletion anderer Proteine des Extraktes zurückzuführen war, wurde der depletierte Extrakt durch rekombinantes SMN und Gemin2 komplementiert (Abb.: 5.4B). Erstaunlicherweise ließ sich die Zusammenlagerung jedoch weder durch die Zugabe von rekombinantem Gemin2 noch durch einen Komplex aus

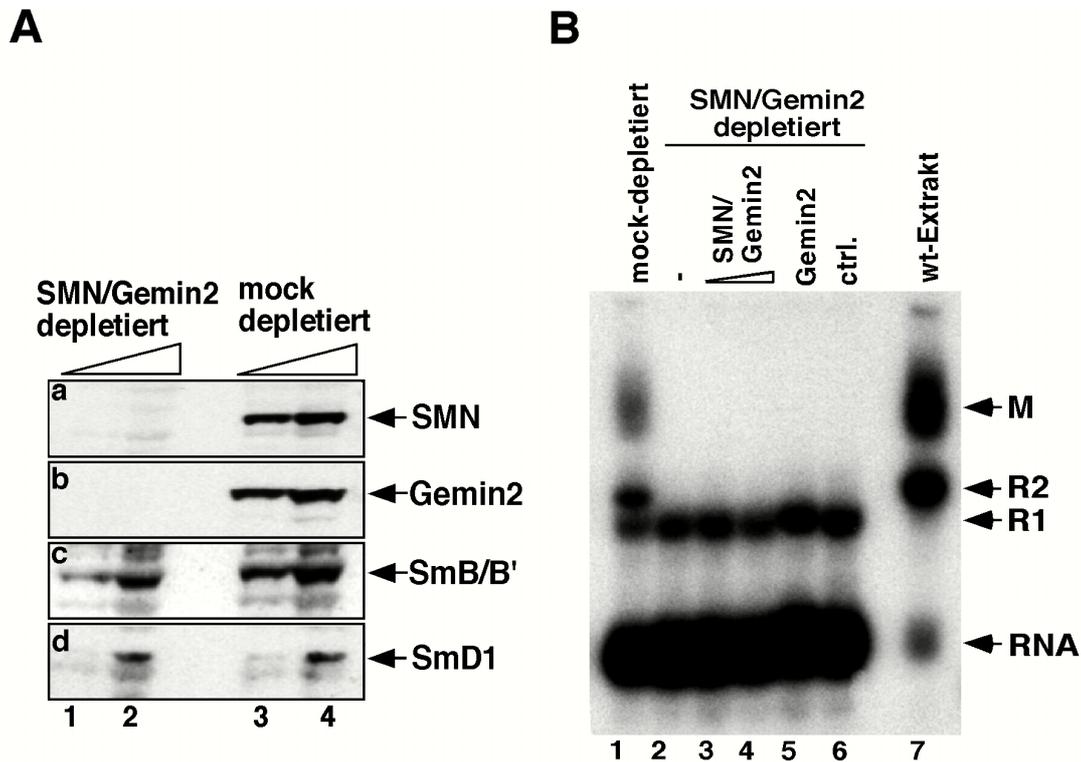


Abbildung 5.4: Immunodepletion von SMN und Gemin2 aus *X.laevis* Ei-Extrakt inhibiert die U snRNP-Biogenese. (A) Eine Mischung aus polyklonalen Antikörpern gegen SMN und Gemin2 wurden an Protein-G-Sepharose gekoppelt und anschließend mit *X.laevis* Ei-Extrakt inkubiert. Der Kontrollextrakt wurde nur mit Protein-G-Sepharose behandelt. 5 (Spuren 1 und 3) bzw. 10 μ l (Spuren 2 und 4) wurden durch Western Blotting mit Antikörpern gegen SMN (Teilabb.: a), Gemin2 (Teilabb.: b), SmB/B'/B' (Teilabb.: c) und SmD1 (Teilabb.: d) analysiert. (B) Immunodepletion von SMN und Gemin2 verhindert die U snRNP-Zusammenlagerung. Der in (A) beschriebene SMN-Gemin2-depletierter Extrakt (Spuren 2-6) sowie der Kontroll-depletierter Extrakt (Spur 1) wurden zusammen mit [³²P]-markierte U1 snRNA inkubiert. Der SMN-Gemin2-depletierter Extrakt wurde mit 5 (Spur 3) bzw. 10 μ g (Spur 4) rekombinanten SMN/Gemin2-Komplex, 5 μ g rekombinantes Gemin2 (Spur 5) und 5 μ g Rinderserumalbumin (Spur 6) komplementiert. In Spur 7 ist eine Assemblierungsreaktion mit unbehandeltem Extrakt dargestellt. Die Komplexbildung wurde durch native Gelelektrophorese analysiert

rekombinanten SMN und Gemin2 rekonstituieren (Spuren 3-6). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass noch weitere Faktoren, die für die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne wichtig sind, zusammen mit SMN und Gemin2 aus dem Ei-Extrakt kodepletiert wurden.

5.4 Isolierung eines makromolekularen SMN-Komplexes aus HeLa-Kernextrakt

Die obigen Ergebnisse deuteten an, dass neben SMN und Gemin2 noch weitere Proteine an der Biogenese von U snRNPs beteiligt sind. In der Tat wurde in früheren Arbeiten festgestellt, dass SMN *in vivo* makromolekulare Komplexe ausbildet. Darüber hinaus zeigten Sedimentationsstudien (nicht gezeigt), dass SMN Teil eines makromolekularen Protein-

Komplexes ist, der bei ca. 20S sedimentiert. Es stellte sich nun die Frage, ob der Verlust dieses Komplexes mit dem Verlust der oben beschriebenen U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität einhergeht. Ziel der folgenden Experimente war es deshalb SMN-Komplexe und damit assoziierte Proteine zu isolieren und zu charakterisieren.

Der monoklonale anti-SMN Antikörper 7B10 (Meister *et al.*, 2000) wurde dazu kovalent an Protein-G-Sepharose gebunden und anschließend mit cytosolischem bzw. nukleärem HeLa-Extrakt inkubiert. Nachdem die Säule intensiv gewaschen worden war, erfolgte die Elution der gebundenen Komponenten durch pH-Schock und die Analyse der eluierten Proteine durch SDS-PAGE. Wie in Abbildung 5.5A ersichtlich, konnten durch diese Vorgehensweise 17 prominente Proteinbanden eluiert werden (Spur 3). Die einzelnen Proteine wurden entweder durch Western Blot-Analysen oder in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) durch MALDI-TOF identifiziert. Unter ihnen befanden sich neben SMN die bereits bekannten SMN assoziierten Proteine Gemin2 und dp103/Gemin3 (Campbell *et al.*, 2000; Charroux *et al.*, 1999; Grundhoff *et al.*, 1999) sowie alle kanonischen Sm-Proteine (SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G). Darüber hinaus wurden in dieser Aufreinigung fünf weitere Proteine identifiziert, die zuvor nicht mit SMN in Verbindung standen: das unr interacting protein (unrip), für das eine Funktion bei der cap-unabhängigen Translation viraler mRNAs vorgeschlagen wurde (Hunt *et al.*, 1998), drei bisher unbeschriebene Proteine der Größen 175kDa (p175), 99kDa (p99; Gemin4/GIP1) und 18kDa (Gemin6) sowie das Hitzeschock Protein hsc70. Interessanterweise zeigte der nukleäre SMN-Komplex das gleiche Proteinprofil wie ein SMN-Komplex, der aus cytosolischem HeLa-Extrakt gereinigt wurde (nicht gezeigt).

5.5 Charakterisierung neuer Komponenten des SMN-Komplexes

Um zu überprüfen, ob die neu identifizierten Proteine p175, p99, p18, hsc70 und unrip spezifische Komponenten des SMN-Komplexes sind, wurden zunächst die vollständigen cDNAs dieser Proteine identifiziert (siehe Anhang) und anschließend sowohl durch Bindungsstudien als auch durch ko-Immünpräzipitationen die Assoziation mit dem SMN-Komplex genauer untersucht.

Es stellte sich zunächst die Frage, ob p175, Hsc70 und unrip tatsächlich spezifisch von der 7B10 Säule eluieren und *in vivo* mit SMN assoziiert sind. Deswegen wurde untersucht, ob mit Antikörpern, die für diese Proteine spezifisch sind, SMN aus HeLa-Zellextrakten ko-immunpräzipitiert werden kann (Abb.: 5.5B). Der Nachweis von ko-präzipitiertem SMN erfolgte durch Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen anti-SMN Antikörper 7B10.

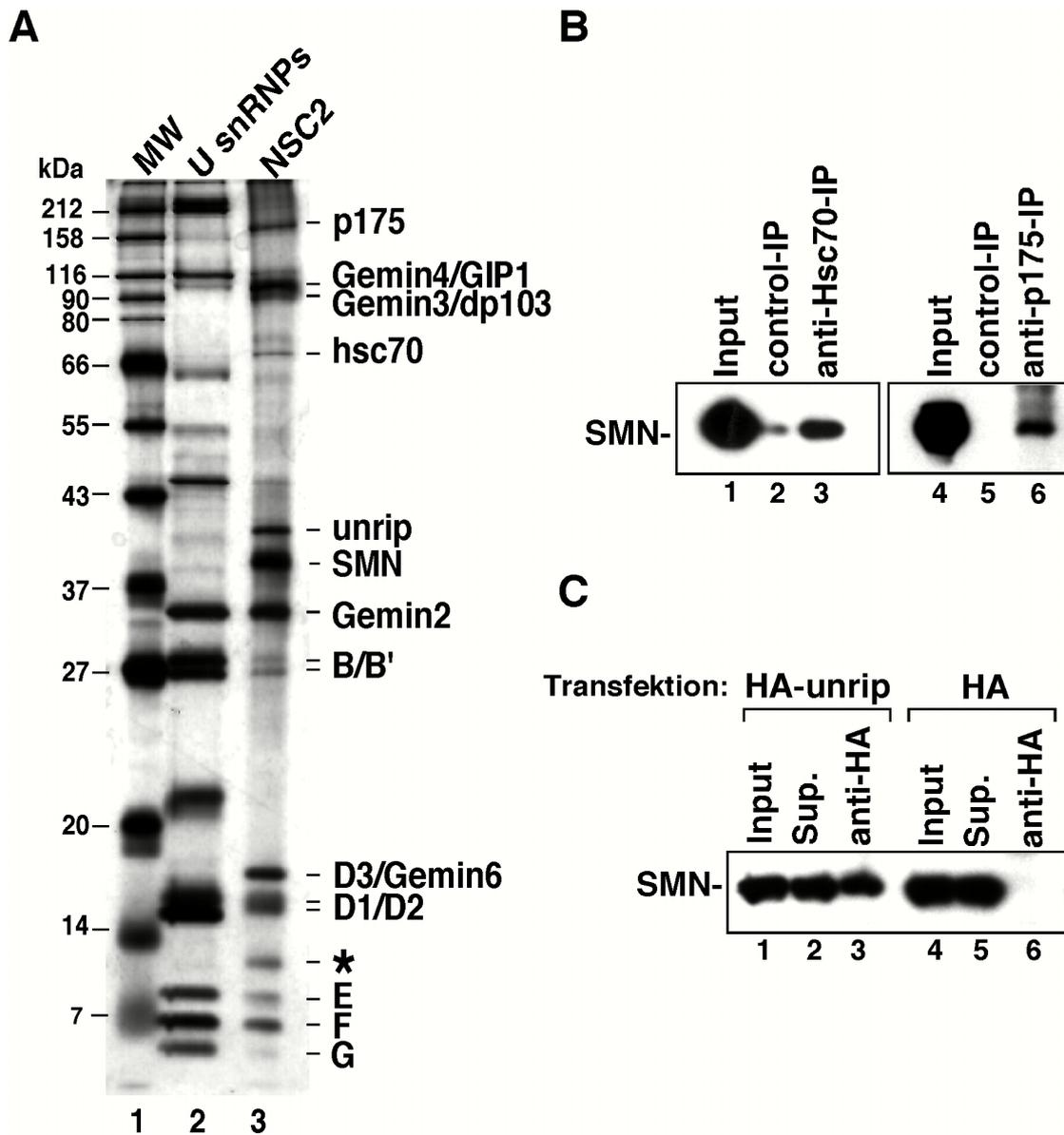


Abbildung 5.5: Molekulare Charakterisierung des nukleären SMN-Komplexes. (A) Die Proteine des affinitätsgereinigten nukleären SMN-Komplexes (NSC2, Spur 3) wurden neben affinitätsgereinigten U snRNPs (Spur 2) sowie einem Molekulargewichtsstandart (Spur 1) durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die einzelnen Proteine wurden durch MALDI-TOF bzw. Western Blotting identifiziert. (B) Hsc70 und p175 sind spezifisch mit dem SMN-Komplex assoziiert. SMN wurde mit Antikörpern gegen hsc70 (Spur 3), p175 (Spur 6) und Glutathion-S-Transferase (Spuren 2 und 5) aus Gesamtzellextrakt koimmunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting mit Antikörpern gegen SMN (7B10) analysiert. Die Spuren 1 und 4 zeigen 5% der Extraktmenge, die für die Immunpräzipitationen eingesetzt wurde. (C) Koimmunpräzipitation von SMN und Hämagglutinin (HA)-fusioniertem unrip. 293-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die HA-unrip (Spuren 1-3) bzw. den HA-Fusionsanteil alleine (Spuren 4-6) enthielten. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte aus den Zellen hergestellt und mit Antikörpern gegen den HA-Fusionsanteil Immunpräzipitationen durchgeführt. 5% der eingesetzten Extrakte (Spuren 1 und 4), die Immunpräzipitate (Spuren 3 und 6) sowie die einzelnen Überstände (Spuren 2 und 5) wurden durch Western Blotting mit Antikörpern gegen SMN (7B10) analysiert.

Die Hsc70- und p175-spezifischen Antikörper ko-immunpräzipitierten in der Tat SMN (Spuren 3 und 6), wohingegen kein SMN nachgewiesen werden konnte, wenn ein Präimmenserum für die Immunpräzipitation verwendet wurde (Spuren 2 und 5). Um eine Interaktion zwischen SMN und unrip nachzuweisen, wurden HA-unrip und HA alleine in NIH293 Zellen transient transfiziert und mit anti-HA Antikörpern immunpräzipitiert (Abb.: 5.5C). Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blotting mit dem 7B10 Antikörper analysiert. SMN konnte effizient aus HA-unrip transfizierten Zellen ko-immunpräzipitiert werden (Spur 3), nicht aber aus Zellen, die nur mit dem HA-Vektor transfiziert worden waren (Spur 6). Zusammengefaßt zeigten diese Ergebnisse, dass unrip, Hsc70 und p175 spezifisch mit SMN *in vivo* assoziiert sind und deswegen integrale Komponenten des SMN-Komplexes sind.

Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche Funktion oder Eigenschaften von p175 und p99 zu erhalten, wurde eine Homologie-Suche mit dem „BLAST“-Programm am NCBI durchgeführt. Es konnte dabei festgestellt werden, dass p99 einen putativen „Leucin-Zipper“ enthält. P175 weist dagegen 13 WD-Motive auf. Solche Motive sind bei einer Vielzahl von Proteinen beschrieben und es wurde für sie eine Funktion als Protein-Protein-Interaktionsdomänen vorgeschlagen. Die Gene für unrip und hsc 70 waren bereits bekannt. Unrip enthält wie p175 WD-Motive, während hsc 70 eine ATPase-Domäne enthält. P18 wurde parallel von Pellizzoni et al. identifiziert und in dieser Arbeit als Gemin6 bezeichnet. Dieses Protein enthält keine bekannten Motive (Pellizzoni *et al.*, 2002).

Die spezifische Elution von p175, p99, Hsc70 und unrip sowie bekannten SMN-interagierenden Proteinen wie dp103/Gemin3 und Gemin2 von der 7B10 Säule legte den Schluß nahe, dass es sich bei all diesen Proteinen um Komponenten des SMN-Komplexes handelt. Um die Bindungspartner für diese Komponenten zu identifizieren, wurden dp103/Gemin3, SMN und ein Komplex aus SMN und Gemin2 als Glutathion-S-Transferase-Fusionen (GST) exprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem p99 inkubiert (Abb.: 5.6). P99 band dabei nur an GST-dp103/Gemin3 (Spur 1) und wurde dementsprechend mit GIP1 (für Gemin3 interagierendes Protein 1) bezeichnet. P99 wurde parallel zu dieser Arbeit auch von Charroux et al. als dp103/Gemin3 interagierendes Protein identifiziert und in dieser Arbeit als Gemin4 bezeichnet (Charroux *et al.*, 2000). Analoge Experimente mit p175, Hsc70 und unrip zeigten keine spezifische Bindung der Proteine an SMN, Gemin2 oder Gemin3/dp103 (nicht gezeigt).

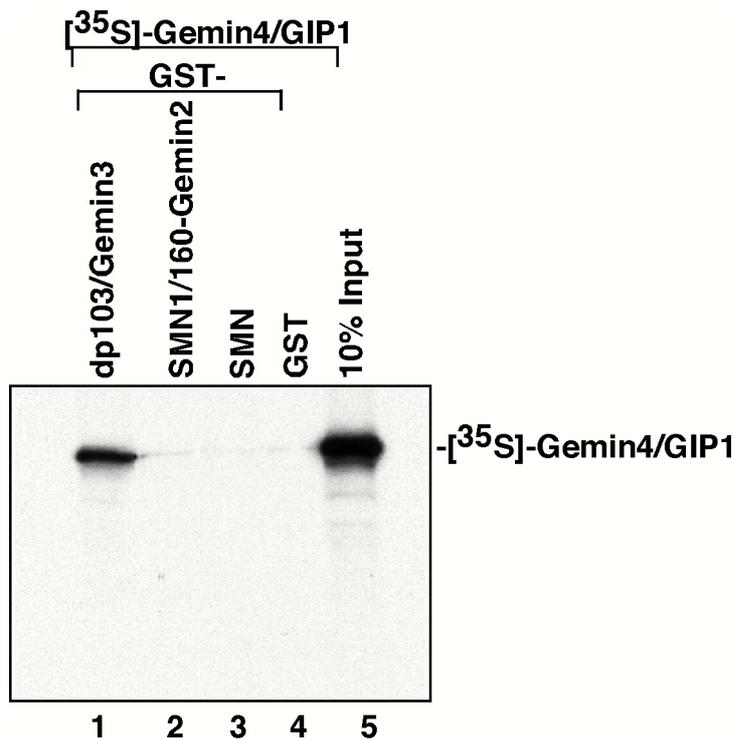


Abbildung 5.6: Gemin4/GIP1 interagiert mit dp103/Gemin3. 1 µg GST-dp103/Gemin3 (Spur 1), GST-SMN1/160-Gemin2 (Spur 2) sowie GST-SMN (Spur 3) und GST alleine (Spur 4) wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Gemin4/GIP1 inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Protein-Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. In Spur 5 sind 10% der eingesetzten Gemin4/GIP1-Menge dargestellt.

5.6 Der SMN-Komplex ist essentiell für die U snRNP-Biogenese

Die Tatsache, dass SMN *in vivo* in einem makromolekularen Proteinkomplexen, der alle Sm-Proteine enthält, vorliegt, ließ vermuten, dass dieser Komplex eine funktionelle Einheit bildet, der die Zusammenlagerung von U snRNPs vermittelt. Um dieser Frage nachzugehen wurde getestet, ob der isolierte SMN-Komplex die Zusammenlagerung von U snRNPs im beschriebenen SMN/Gemin2-immundepletierten *X. laevis* Ei-Extrakt rekonstituieren kann (Abb.: 5.7A). Dazu wurde an anti-SMN-Affinitätssäulenmatrix gebundener SMN-Komplex mit SMN/Gemin2-depletiertem Ei-Extrakt und radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert. Der Überstand dieser Reaktion wurde nach einer Stunde durch native Gelelektrophorese analysiert. In der Tat konnte der isolierte SMN-Komplex die Bildung der Komplex R2 und M rekonstituieren, wobei die Effizienz der Komplexbildung von der Menge an addiertem SMN-Komplex abhängig war (Spuren 4-7). Interessanterweise ließ sich die U snRNP-Zusammenlagerung auch mit SMN-Komplexen, die aus HeLa-Kernextrakt (Spuren 4 und 5) oder *X. laevis* Ei-Extrakt aufgereinigt worden waren, rekonstituieren, nicht jedoch mit Proteinen, die an eine Kontrollsäule gebunden waren (Abb.: 5.7B, Spuren 3 und 4).

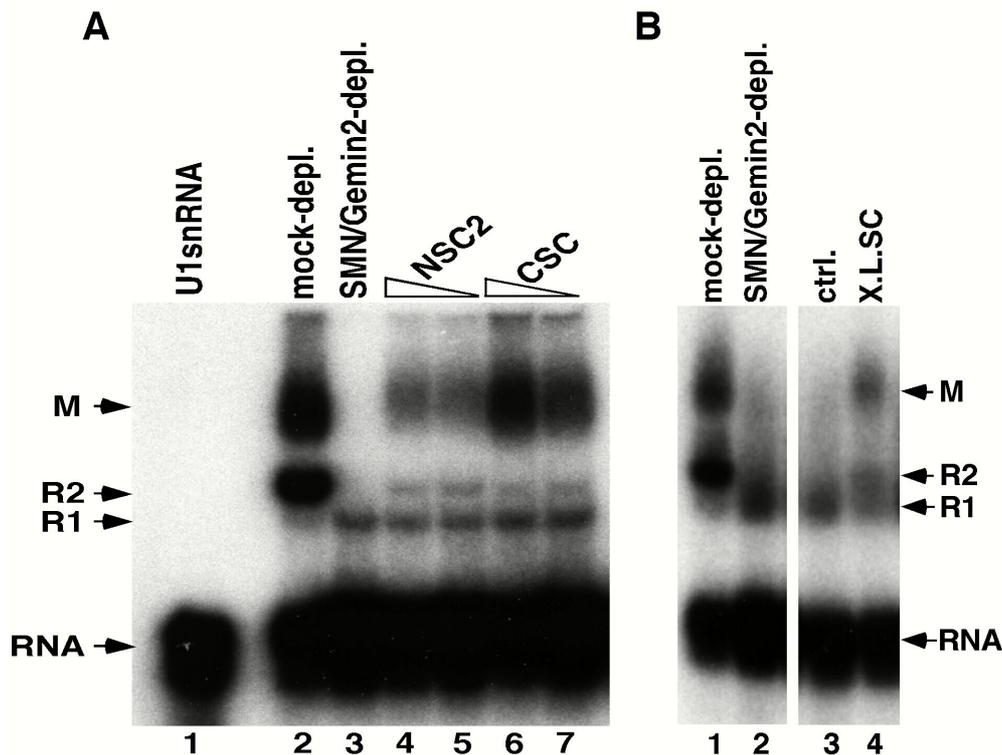


Abbildung 5.7: Rekonstitution der U1 snRNP-Biogenese-Aktivität SMN/Gemin2-depletierter Extrakte durch den gereinigten SMN-Komplex. (A) Steigende Mengen (0.5 und 1 μ g) des gereinigten nukleären (Spuren 4 und 5) bzw. des cytosolischen (Spuren 6 und 7) SMN-Komplexes wurden zusammen mit SMN/Gemin2-depletierter *X.laevis* Ei-Extrakt und [32 P]-markierte U1 snRNA für 60 Minuten bei 20°C inkubiert. Spur 1 zeigt die freie U1 snRNA. In den Spuren 2 und 3 sind Assemblierungsreaktionen mit Kontrolldepletierter bzw. SMN/Gemin2-depletierter Extrakte dargestellt. (B) Rekonstitution der U1 snRNP-Assemblierung durch den SMN-Komplex aus *X.laevis* Ei-Extrakt. Affinitätsgereinigter *X.laevis* SMN-Komplex wurde zusammen mit SMN/Gemin2-depletierter (Spur 4) Ei-Extrakt und radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert. Als Kontrolle wurden die Protein-G-Sepharose alleine eingesetzt (Spur 3). Die Spuren 1 und 2 zeigen Assemblierungsreaktionen mit Kontroll- bzw. SMN-Gemin2-depletierter Ei-Extrakt.

Aus diesen Ergebnissen wurde offensichtlich, dass ein makromolekularer SMN-Komplex, der alle Sm-Proteine und mindestens 10 weitere Komponenten enthält, einen essentiellen Faktor für die Ausbildung der Sm-core-Domäne *in vivo* darstellt.

5.7 Untersuchung der U snRNP-Biogenese in somatischen Zellen

Obwohl sich das in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene zellfreie Testsystem als äußerst informativ bei der Analyse des U snRNP-Zusammenlagerungsvorgangs erwiesen hatte, sind wichtige Aspekte in *X. laevis* Eiextrakten nur begrenzt analysierbar. So stellte sich die Frage in wie weit der Zusammenlagerungsprozess auch in somatischen Zellen über das SMN/Gemin2-System vermittelt wird. Des Weiteren waren biochemische Fraktionierungsstudien geplant um alle an der U snRNP-Zusammenlagerung beteiligten

Faktoren zu identifizieren. Aufgrund der schweren Zugänglichkeit war der Ei-Extrakt hierfür nicht geeignet. Es wurde daher versucht die U snRNP-Zusammenlagerung auch im HeLa-Zellextrakt zu rekapitulieren.

HeLa-Zellen wurde zunächst unter verschiedenen Pufferbedingungen aufgeschlossen und der cytoplasmatische Überstand zusammen mit radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert. Die Zusammenlagerung wurde wie bereits beschrieben durch native Gelelektrophorese analysiert (Abb.: 5.8). Dabei zeigte sich, dass HeLa-Zellextrakt, der unter physiologischen Bedingungen aufgeschlossen wurden, ähnlich effizient wie der *X. laevis* Ei-Extrakt RNA-Protein-Komplexe formierte (Spur 2 und nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Ei-Extrakt, wurde hier jedoch nur zwei Komplexe gebildet, die mit den Komplexen M und R1 des Ei-Extrakt-Systems komigrierten. Der M-Komplex läßt sich dabei durch die Inkubation mit anti-Sm Antikörpern (Y12) in die Taschen des Gels verschieben (Spur 3), was zeigt, dass in diesem Komplex Sm-Proteine an die U snRNA gebunden sind. Der R-Komplex besteht dagegen aus der U1 snRNA, an die das U1 spezifische U1-A Protein gebunden ist (nicht gezeigt).

Mehrere experimentelle Evidenzen belegen, dass im somatischen Zellextrakt die U snRNP-Zusammenlagerung sehr ähnlich abläuft, wie zuvor im Ei-Extrakt beschrieben wurde. Erstens ließ sich beobachten, dass sich die Ausbildung des M-Komplexes durch Inkubation bei 4°C stark inhibieren ließ, was auf eine aktive Entstehung dieses Komplexes hinwies (Spur 10). Zweitens inhibieren Antikörper, die gegen Gemin2 gerichtet waren, die Zusammenlagerung des M-Komplexes (Spur 4). Drittens ging die nahezu vollständige Depletion von SMN (Spur 8, untere Teilabb.) mit einer spezifischen Inhibition der Formierung des M-Komplexes einher (Spur 8, oberer Teilabb.), während sich in der Kontroll-Depletion der M-Komplex ausbilden konnte (Spur 7). Durch die Re-Addition des gereinigten SMN-Komplexes konnte die U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität in diesem Extrakt wieder hergestellt werden (Spur 9).

Diese Resultate legten den Schluß nahe, dass in Analogie zum *X. laevis* Ei-Extrakt-System auch in somatischen Zellen die Biogenese von U snRNPs ein aktiver Prozess ist, der unter essentieller Beteiligung des SMN-Komplexes abläuft.

Die aktive und SMN-abhängige Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne erfolgt in diesem System nicht nur an der U1 snRNA, sondern auch an den anderen spleißosomalen U snRNAs mit einer Sm-Bindungsstelle (siehe Abb.: 5.8, Spuren 12-15 für die U5 snRNP-Zusammenlagerung).

Die hier dargestellten Resultate zeigten, dass ein zellfreies, somatisches Testsystem zur Analyse der U snRNP-Biogenese herangezogen werden kann, das sich in allen Aspekten wie das beschriebene *X. laevis* Ei-Extrakt-System verhält.

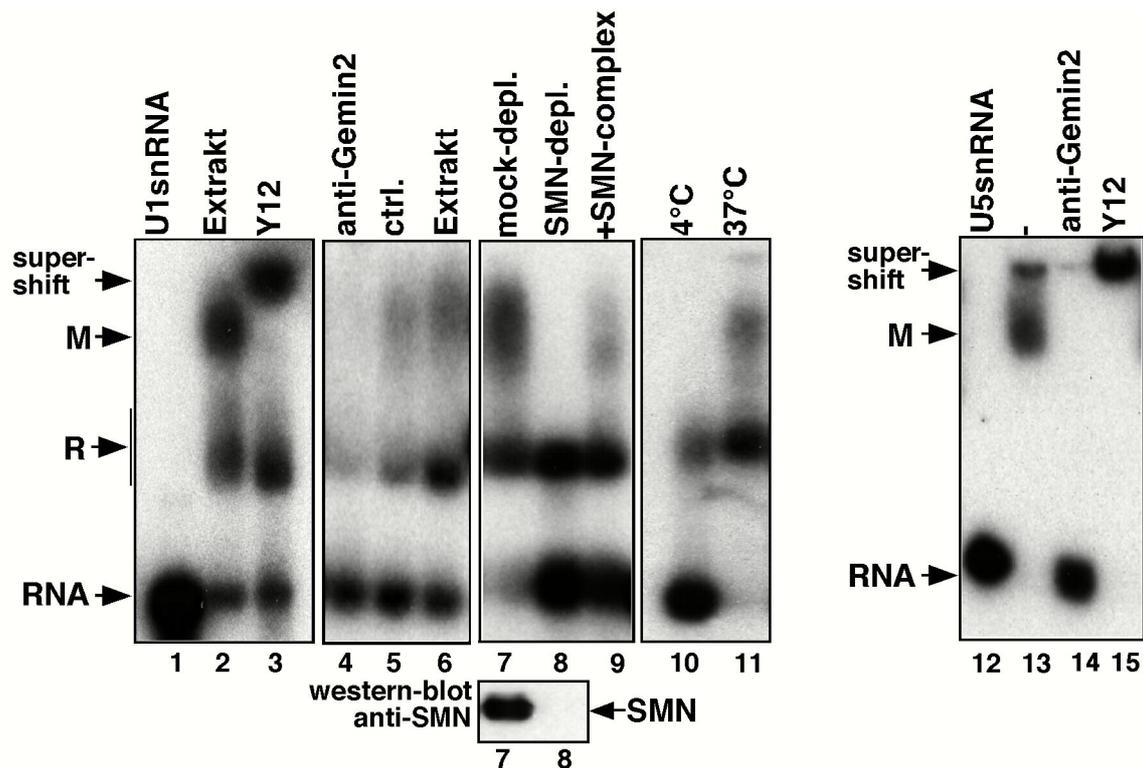


Abbildung 5.8: In vitro Rekonstitution der U1 snRNP-Biogenese in HeLa-Cytoplasmaextrakt. [³²P]-markierte U1 snRNA (Spuren 2-11) oder U5 snRNA (Spuren 12-13) wurden zusammen mit HeLa-Cytoplasmaextrakt entweder bei 4°C (Spur 10) oder 37°C (alle anderen Spuren) inkubiert. Die angegebenen Antikörper wurden entweder vor der Reaktion (Spuren 4, 5 und 14) oder nachdem die Reaktion abgeschlossen war (Spuren 3 und 15) dazugegeben. Die Zusammenlagerungsreaktionen, die in den Spuren 7-9 dargestellt sind, wurden in mock-depletiertem (Spur 7), SMN-depletiertem Extrakt (Spuren 8) oder SMN-depletiertem Extrakt der durch den gereinigten SMN-Komplex rekonstituiert worden war (Spur 9), durchgeführt. Der Western Blot in der unteren Teilabbildung zeigt die SMN-Protein-Menge der entsprechenden Extrakte an. Die RNA-Protein-Komplexe wurden durch native Gelelektrophorese voneinander getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

5.8 Der SMN-Komplex ist für die Biogenese der Sm-core-Domäne alleine ausreichend

Mit den bisher beschriebenen Experimenten war es gelungen eine strikte SMN/Gemin2-Abhängigkeit der U snRNP-Biogenese sowohl in *Xenopus laevis* als auch in HeLa-Zellen nachzuweisen. Es ist dafür ein makromolekularer Proteinkomplex, der neben SMN und Gemin2 noch zahlreiche andere Komponenten enthält (Abb.: 5.5), notwendig. Es blieb aber die Frage offen, ob neben diesem Komplex noch andere Faktoren während der Biogenese von U snRNPs eine Rolle spielen. Ziel der nächsten Untersuchungen war es daher herauszufinden, ob an der Biogenese von U snRNPs noch andere Proteine oder Proteinkomplexe beteiligt sind. Die Trennung der im HeLa-Cytoplasmaextrakt vorhandenen

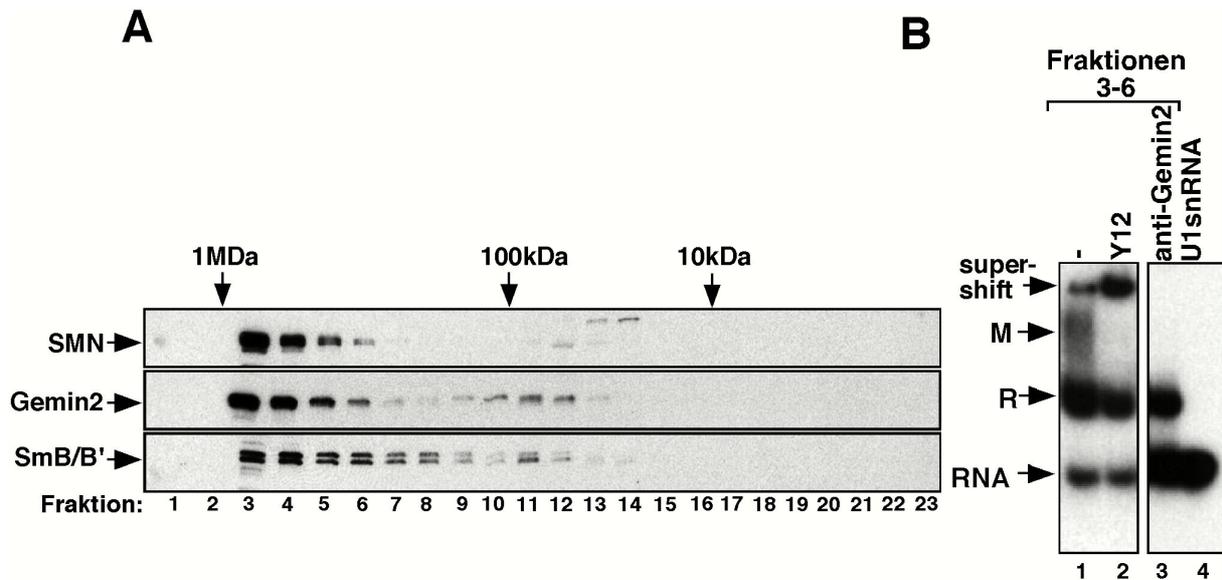


Abbildung 5.9: SMN und Gemin2 enthaltende Gelfiltrationsfraktionen besitzen U snRNP-Biogenese-Aktivität. (A) Cytoplasmaextrakt aus HeLa-Zellen wurde mit Hilfe einer Superose-6-Gelfiltrationssäule fraktioniert. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und SMN, Gemin2 und SmB/B' durch Western Blotting identifiziert. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind über den western blots angegeben. (B) Die Fraktionen 3-6 der in (A) dargestellten Gelfiltration wurden vereinigt und zusammen mit radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert (Spuren 1-3). In Spur 2 wurden Antikörper gegen die Sm-Proteine (Y12) nach der Assemblierungsreaktion und in Spur 3 Antikörper gegen Gemin2 vor der Assemblierungsreaktion zugegeben. Die einzelnen Proben wurden durch native Gelfiltration analysiert. Spur 4 zeigt die freie U1 snRNA.

Proteinkomplexe durch Gelfiltration und die Analyse der Assemblierungsaktivität der einzelnen Fraktionen wurde hierbei als experimentelle Strategie gewählt.

Die Proteine des Extraktes wurden durch eine Superose-6-Gelfiltrationssäule der Größe nach getrennt (Abb.: 5.9A). Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden anschließend durch Western Blotting mit anti-SMN, anti-Gemin2 und anti-Sm Antikörpern analysiert. Dabei zeigte sich, dass SMN und Gemin2 in einem makromolekularen Komplex von ca. 900 kDa zu finden sind (Spuren 3-6). Eine geringe Menge von Gemin2 ist in einem kleineren Molekulargewichtsbereich zu finden (Spuren 10-12), wobei unklar ist, ob es sich hierbei um einen physiologisch relevanten Komplex handelt. Interessanterweise wurde der größte Teil von SmB/B' in den gleichen Fraktionen wie SMN und Gemin2 gefunden, was vermuten ließ, dass ein großer Teil der cytoplasmatischen Sm-Proteine an den SMN-Komplex gebunden ist. Im folgenden Experiment wurden die Gelfiltrationsfraktionen zusammen mit radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert und durch native Gelelektrophorese die Zusammenlagerung des U1 snRNPs untersucht (Abb.: 5.9B). Hierbei zeigte sich, dass der M-Komplex nur in den hochmolekularen Fraktionen ausgebildet wurde, in denen auch der SMN/Gemin2-Komplex zu finden war (Spur 1). In keiner der anderen Fraktionen konnte dagegen die

Ausbildung der Sm-core-Domäne beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Zusammenlagerungsreaktion zeigte dabei die gleichen Charakteristika, wie im Gesamtzellextrakt: sie erfolgte nicht bei 4°C und war strikt von der Aktivität des SMN-Komplexes abhängig (Spur 3 und nicht gezeigt).

In den nächsten Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob SMN in diesen hochmolekularen Fraktionen mit sämtlichen Faktoren assoziiert ist, die für die Zusammenlagerungsreaktion notwendig sind. Hierzu wurde der SMN-Komplex über Immunoaffinitätschromatographie aus den rekonstitutionsaktiven Extrakten isoliert und analysiert. In Abbildung 5.10A ist die Protein-Zusammensetzung des isolierten SMN-Komplexes dargestellt (Spur 1). Dabei konnten neben den bereits in vorangegangenen Experimenten beschriebenen Komponenten (SMN, Gemin2, Gemin3/dp103, Gemin4/GIP1, Gemin5, Gemin6, unrip, hsc70 sowie alle Sm-Proteine) auch zusätzliche Proteine durch MALDI-TOF identifiziert werden. Darunter waren die U1 spezifischen Proteine A und 70K sowie das U2 spezifische Protein A' (Spur 1).

Um zu überprüfen, ob der aufgereinigte SMN-Komplex alleine hinreichend für die U snRNP-Zusammenlagerung ist, wurde er mit radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert und die entstehenden Komplexe anschließend durch native Gelelektrophorese analysiert (Abb.: 5.10B). Interessanterweise bildeten sich unter diesen Bedingungen RNA-Protein-Komplexe aus, die mit den Komplexen R und M der Rekonstitutionsreaktion in Extrakten komigrierte (vergleiche Spur 2 und 4). In der Tat zeigte sich durch „supershift“-Experimente, dass diese Komplexe Sm-Proteine enthielten (Spur 3) und darüber hinaus bei 4°C nicht gebildet werden konnten (Spur 7). Um zu untersuchen, ob die Zusammenlagerung des M-Komplexes SMN-Komplex-vermittelt abläuft, wurden Antikörperinhibitionsstudien durchgeführt. Bemerkenswerterweise blockierten Antikörper, die gegen Gemin2 oder Gemin4 gerichtet waren, die Entstehung des M-Komplexes (Spuren 5 und 6). Der SMN-Komplex ist daher notwendig und hinreichend die Sm-Proteine auf die U snRNA zu übertragen. Interessanterweise war aber diese Reaktion durch den isolierten SMN-Komplex ATP-unabhängig und nur sehr ineffizient. Dies legte die Vermutung nahe, dass im Kontext des Extraktes die U snRNP-Zusammenlagerung weitere Faktoren benötigt, die diesen Prozess energieabhängig und effizient machen.

Die in den vorangegangenen Experimenten dargestellten Ergebnisse zeigten, dass der SMN-Komplex die Sm-Proteine auf die U snRNA übertragen kann. Es stellte sich als nächstes die Frage, ob bei diesem Vorgang in der Tat die vollständige und funktionelle Sm-core-Domäne entsteht, oder ob sich lediglich partielle „subcore“-Strukturen bzw. nicht funktionelle

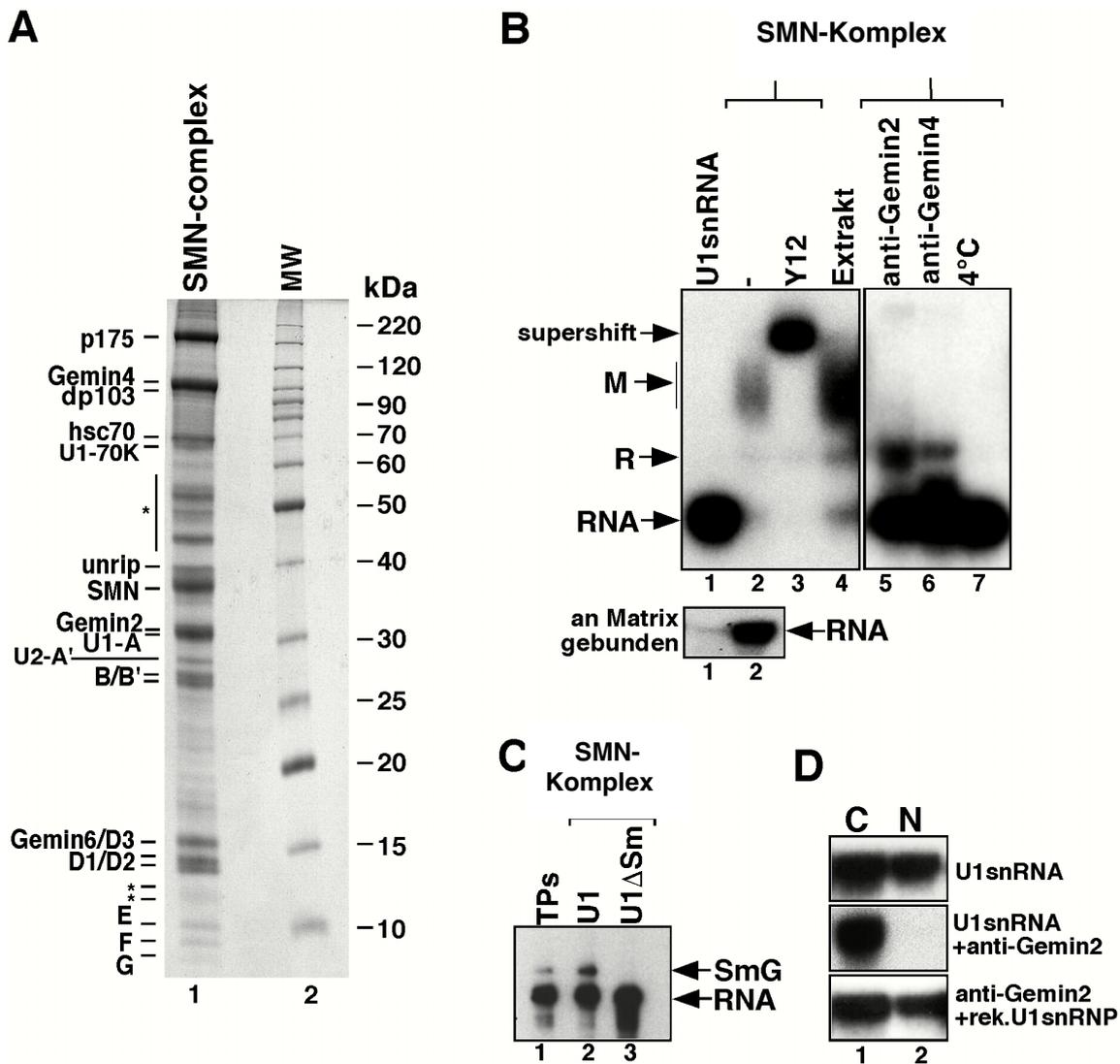


Abbildung 5.10: Der gereinigte SMN-Komplex ist für die U snRNP-Zusammenlagerung ausreichend. (A) Eine anti-SMN-Affinitätssäule wurde mit HeLa-Cytoplasmaextrakt beladen und die gebundenen Proteine durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Spur 1 zeigt den gereinigten SMN-Komplex, Spur 2 einen Molekulargewichtsstandard. Die Proteine des SMN-Komplexes wurden entweder durch Western Blotting oder durch MALDI-TOF identifiziert. Die Banden, die mit Sternen gekennzeichnet sind, sind entweder unspezifisch an die Säule gebunden oder bisher noch nicht identifiziert worden. (B) [³²P]-markierte U1 snRNA wurde entweder mit Protein-G-Sepharose (Spur 1) oder mit der anti-SMN-Affinitätssäule, die den gebundenen SMN-Komplex enthielt (Spuren 2 und 3, 5-7) inkubiert. In den Spuren 5 und 6 wurden entweder anti-Gemin2- oder anti-Gemin4-Antikörper zur Reaktion gegeben. Die Spur 7 zeigt die Reaktion bei 4°C. Antikörper gegen die Sm-Proteine wurden nach der Assemblierungsreaktion zugegeben (Spur 3). In Spur 4 wurde eine Zusammenlagerungsreaktion mit HeLa-Cytoplasmaextrakt durchgeführt. Die Überstände der einzelnen Reaktionen wurden durch native Gelelektrophorese analysiert. Im unteren Gel ist die Bindung der U1 snRNA an die Protein-G-Sepharose (Spur 1) bzw. die anti-SMN-Affinitätssäule (Spur 2) dargestellt. (C) Vernetzung von SmG mit der U1 snRNA durch UV-Licht. [³²P]-markierte U1 snRNA (Spur 2) bzw. U1ΔSm (Spur 3) wurden entweder mit dem gereinigten SMN-Komplex oder mit isolierten Sm-Proteinen (TPs, Spur 1) inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die einzelnen Proben wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. (D) Kerntransport von U snRNPs, die vom SMN-Komplex zusammengelagert wurden. [³²P]-markierte U1 snRNA (obere und mittlere Teilabbildung) sowie vom SMN-Komplex ausgebildete U1 snRNPs (untere Teilabbildung) wurden ins Cytoplasma von *X.laevis* Oocyten injiziert. In die Oocyten wurden vorher entweder Antikörper gegen ein nicht verwandtes Protein (obere Teilabbildung) oder gegen Gemin2 (mittlere und untere Teilabbildung) injiziert. Nach 12 h wurde die RNA aus dem Cytoplasma (Spur 1; C) und aus dem Kern (Spur 2; N) isoliert und durch denaturierende Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie analysiert.

Aggregate bilden. Um diese Frage zu beantworten, wurden zwei unterschiedliche experimentelle Strategien gewählt. Zum einen wurde durch UV-Quervernetzungsstudien untersucht, ob im *in vitro* zusammengelagerten Partikel eine Interaktion des SmG-Proteins mit der U snRNA stattfindet, wie dies zuvor an *in vitro* ausgebildeten Sm-core-Domänen gezeigt wurde (Raker *et al.*, 1999). Im folgenden Experiment wurde dazu der isolierte SMN-Komplex zusammen mit radioaktiv markierter U1 snRNA inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die Analyse von RNA-Protein-Quervernetzungsprodukten erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie (Abb.: 5.10C). In der Tat läßt sich das SmG-Protein in so zusammengelagerten U snRNPs mit der U1 snRNA quervernetzen, während U1 Δ Sm keine Interaktion mit dem SmG-Protein zeigt (Spuren 2 und 3). Eine identische Quervernetzung findet man, wenn man gereinigte Sm-Proteine (TPs) mit der U1 snRNA inkubiert (Raker *et al.*, 1999) (Spur 1). Diese Daten lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass die Partikel, die durch den gereinigten SMN-Komplex gebildet werden, in der Tat die Sm-core-Domäne enthalten.

Als ein weiteres Kriterium für die Funktionalität der Sm-core-Domäne, wurde der Nukleo-Cytoplasmatische Transport von *in vitro* zusammengelagerten U snRNPs herangezogen. In früheren Experimenten wurde bereits gezeigt, dass im Cytoplasma zusammengesetzte U1 snRNPs nur dann in den Zellkern der Oocyte transportiert werden, wenn die Sm-core-Domäne vollständig ausgebildet ist (Fischer and Luhrmann, 1990). Im folgenden Experiment wurde darüber hinaus ausgenutzt, dass die Ausbildung der Sm-core-Domäne durch die Injektion von anti-Gemin2 Antikörper in Oocyten effizient blockiert werden kann (Fischer *et al.*, 1997). Dies hat zur Folge, dass so behandelte Oocyten keine eigenen U snRNPs an injizierten U snRNAs zusammenlagern können. Hierzu wurden zunächst *X. laevis* Oocyten mit Kontroll-Antikörpern oder mit anti-Gemin2-Antikörpern präinjiziert und anschließend entweder radioaktiv markierte U1 snRNA (obere und mittlere Teilabb.) oder durch den gereinigten SMN-Komplex zusammengelagerte U1 snRNPs (untere Teilabb.) in diese Oocyten injiziert. Nach 18 Stunden Inkubation wurden Kerne und Cytoplasma getrennt und die extrahierte RNA durch denaturierende Gelelektrophorese untersucht. Wie in Abbildung 5.10D zu erkennen ist, wurden die ins Cytoplasma injizierten, *in vitro* zusammengelagerten U1 snRNPs effizient in den Kern der Oocyte transportiert (untere Teilabbildung), während die endogene Zusammenlagerungsmaschinerie durch die anti-Gemin2 Antikörper vollständig inhibiert wurde (mittlere Teilabb.). Diese Befunde, zusammen mit den oben gezeigten UV-Quervernetzungsstudien, lieferten starke Hinweise, dass die vollständige und funktionelle Sm-core-Domäne durch den gereinigten SMN-Komplex gebildet wird.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten haben aufzeigen können, dass der gereinigte SMN-Komplex alleine notwendig und hinreichend ist um eine vollständige und funktionelle Sm-core-Domäne *in vitro* zusammenzulagern.

5.9 Die Sm-Proteine werden *in vivo* vom SMN-Komplex auf die U snRNA transferiert

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse legten den Schluß nahe, dass Sm-Proteine, die an den SMN-Komplex gebunden sind, beim Zusammenlagerungsvorgang direkt auf die U snRNA übertragen werden. In einem „pulse-chase“-Experiment sollte untersucht werden, ob auch *in vivo* ein direktes Übertragen der Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf die U snRNA zu beobachten ist (Abb.: 5.11). Hierfür wurden die Proteine lebender HeLa-Zellen mit einer Mischung aus [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein für 1.5 Stunden radioaktiv markiert („pulse“). Anschließend wurde durch Mediumwechsel die nichtinkorporierten radioaktiven Aminosäuren entfernt („chase“) und die Veränderung der radioaktiv markierten Sm-Proteine am SMN-Komplex und an den U snRNPs im zeitlichen Verlauf untersucht. Dazu wurden die Zellen nach 1h, 5h und 18h lysiert und der gewonnene Zellextrakt für Immunpräzipitationen mit anti-SMN (7B10) und anti-m₃G/m⁷G Antikörpern (H20, (Bringmann and Luhrmann, 1986)) herangezogen. Der 7B10 Antikörper kopräzipitiert dabei die an SMN gebundenen Sm-Proteine, während durch den H20-Antikörper vollständig zusammengesetzte U snRNPs immunpräzipitiert werden. Die gebundenen Proteine wurden durch Proteinprobenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE voneinander getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 5.11 zu erkennen ist, können nach einer Stunde alle Sm-Proteine im SMN-Komplex detektiert werden (Spur 5). Interessanterweise lösen sich diese Sm-Proteine aber nach 18 Stunden aus dem SMN-Komplex (Spuren 6 und 7). In einer gegenläufigen Reaktion akkumulieren die radioaktiven Sm-Proteine an zusammengelagerten U snRNPs, wie durch Immunpräzipitationen mit H20 ersichtlich wird. Hier sind nach einer Stunde nur marginale Mengen an markierten Sm-Proteinen an die U snRNA gebunden (Spur 8), wohingegen nach 18 Stunden [³⁵S]-markierte Sm-Proteine mit der U snRNA assoziiert vorliegen (Spuren 9 und 10).

Die Assoziation der Sm-Proteine mit dem SMN-Komplex ist demnach transient und geht der Inkorporation in U snRNP-Partikel voraus. Diese *in vivo* Befunde sind mit dem *in vitro* beobachteten direkten Transfer der Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf die U snRNA konsistent.

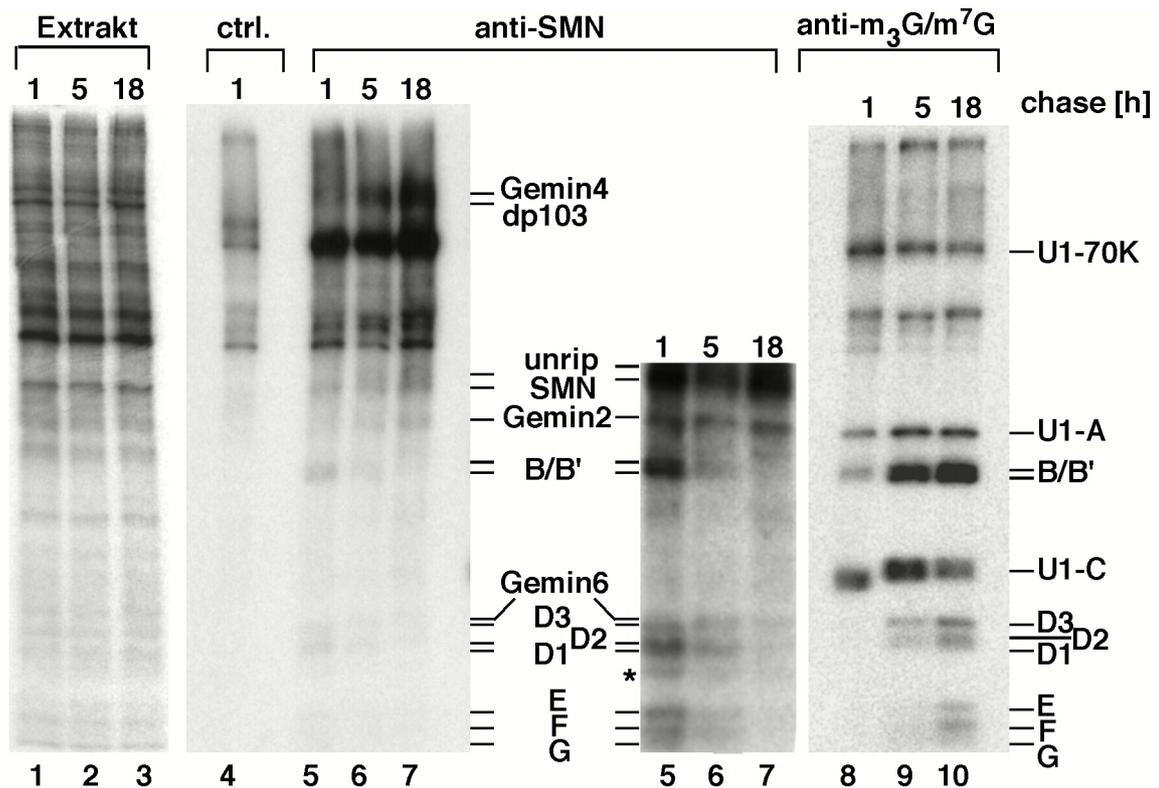


Abbildung 5.11: Sm-Proteine werden *in vivo* vom SMN-Komplex auf die U snRNA übertragen. Lebende HeLa-Zellen wurden 1.5 h mit einer Mischung aus [³⁵S]-markiertem Methionin und [³⁵S]-markiertem Cystein inkubiert. Die Zellen wurden anschließend entsprechend den angegebenen Zeitpunkten (1h, 5h und 18h) mit nicht markierten Aminosäuren inkubiert. Aus den gewonnenen Extrakten wurden anschließend Immunpräzipitationen mit anti-SMN (7B10, Spuren 5-7), anti-m₃/m⁷G spezifischen (H20, Spuren 8-10) Antikörpern bzw. Antikörper gegen ein nicht verwandtes Protein (Spur 4) durchgeführt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der untere Teil der anti-SMN-Immunpräzipitation ist durch eine längere Exposition des Gels hervorgehoben. In den Spuren 1-3 sind 2% der eingestzten Proteinmengen dargestellt.

5.10 Ein partieller SMN-Komplex, dem die Sm-Proteine B/B' und D3 fehlen, ist nicht mehr in der Lage die Sm-core-Domäne auszubilden

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass isolierte Sm-Proteine spontan in zwei aufeinander folgenden Schritten an die U snRNA assoziieren. Zunächst wird ein sogenanntes „subcore“, das aus SmD1, D2, E, F, G und der U snRNA besteht, gebildet. Im zweiten Schritt assoziiert der SmB/B'.D3 Komplex mit dem subcore, was zur Ausbildung der vollständigen Sm-core-Domäne führt (Raker *et al.*, 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob die Sm-Proteine schrittweise (d.h. über Zusammenlagerungs-Intermediate) vom SMN-Komplex auf die U snRNA übertragen werden. Die biochemische Analyse dieser Frage ist durch die Beobachtung ermöglicht worden, dass der SMN-Komplex unter Hochsalzbedingungen (850mM NaCl) selektiv die Sm-Proteine B/B' und D3 verliert (SMNΔB/B'.D3-Komplex;

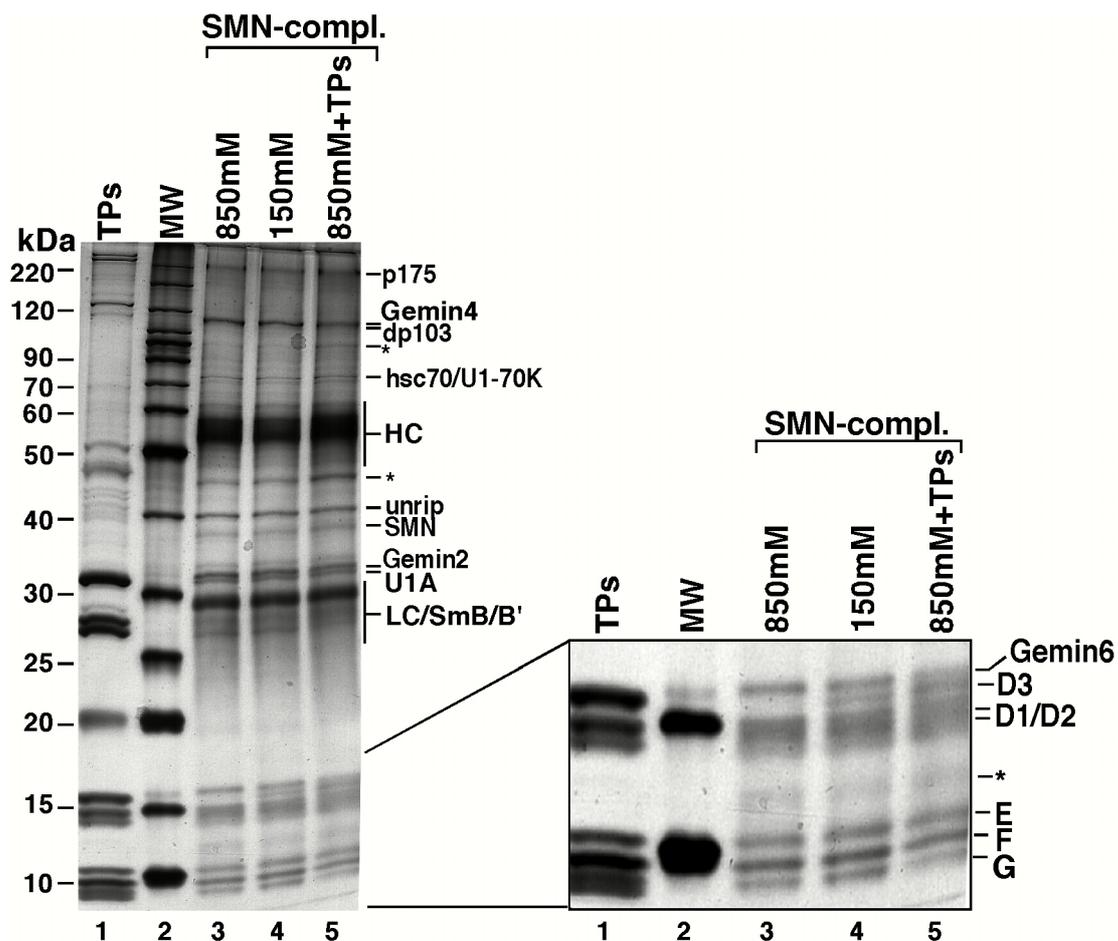


Abbildung 5.12: Durch Hochsals-Behandlung können die Sm-Proteine B/B' und D3 spezifisch vom SMN-Komplex gelöst werden. Eine anti-SMN-Säulenmatrix wurde mit cytosolischem HeLa-Extrakt beladen und anschließend entweder mit 850mM (Spur 3 und 5) oder 150mM (Spur 4) NaCl gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch pH-Schock eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Der in Spur 5 dargestellte SMN-Komplex wurde nach dem Waschen mit 850mM NaCl mit gereinigten Sm-Proteinen (TPs) inkubiert und anschließend erneut intensiv mit 150mM NaCl gewaschen. Die eingesetzten Sm-Proteine und ein Molekulargewichtsmarker sind in den Spuren 1 und 2 dargestellt. Die schwere und die leichte Kette des gebundenen Antikörpers sind mit HC bzw. LC gekennzeichnet. Auf der rechten Seite ist eine Vergrößerung des unteren Bereiches des Gels dargestellt.

Abb.: 5.12 und 5.13A). Das Fehlen dieser Proteine im SMN-Komplex ließ sich sowohl durch Coomassie-Färbung (Abb.: 5.12, Spuren 3 und 4) als auch durch Western blot-Analysen mit Antikörpern, die gegen SmB/B' (Abb.: 5.13A, Teilabb. c) bzw. D3 (Teilabb.: d) gerichtet waren, nachweisen. Interessanterweise konnte die Sm-core-Domäne durch den SMNΔB/B'.D3-Komplex nicht ausgebildet werden (Abb.: 5.13B, Spur 2), wohingegen ein SMN-Komplex, der unter physiologischen Bedingungen gereinigt wurde, und alle Sm-Proteine enthielt, die Zusammenlagerung ermöglichte (Spur 1). Es stellte sich nun die Frage, ob der Verlust der Assemblierungsaktivität nur auf das Fehlen von SmB/B' und D3 zurückzuführen ist, oder ob andere Faktoren, die möglicherweise für die Funktion des SMN-

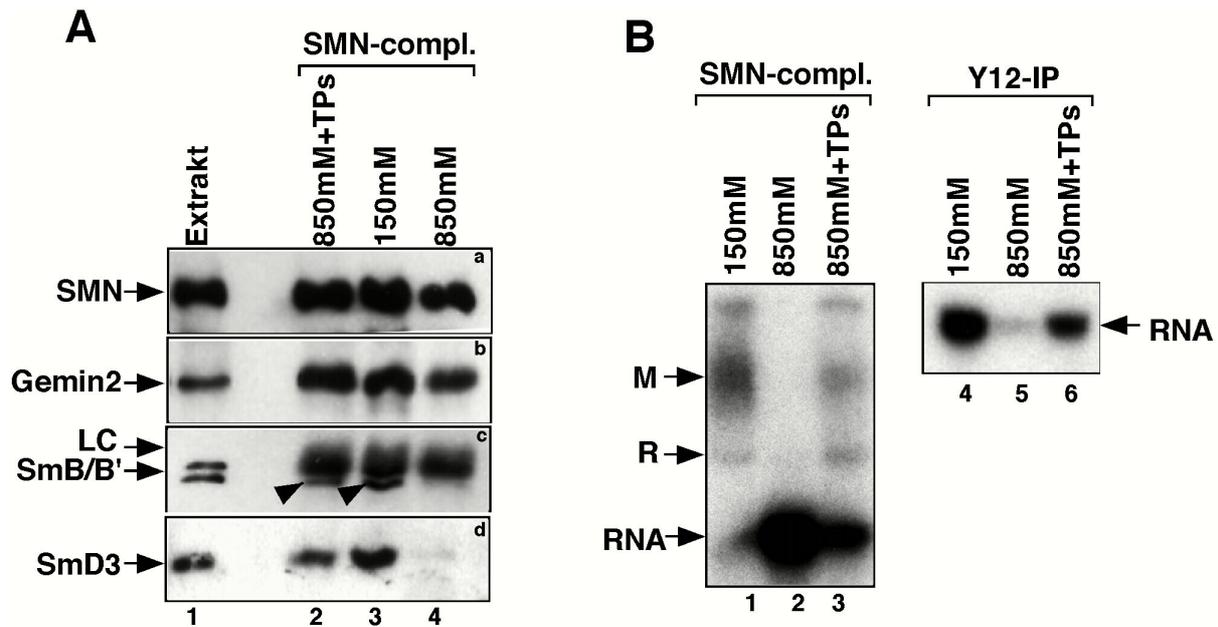


Abbildung 5.13: Ein SMN-Komplex, dem die Sm-Proteine B/B' und D3 fehlen, ist nicht in der Lage U snRNPs zusammenzulagern. (A) Identifizierung verschiedener Proteine der in (A) dargestellten SMN-Komplexe durch Western Blotting. SMN wurde mit dem monoklonalen Antikörper 7B10 (Teilabb.: a), Gemin2, Sm B/B' und SmD3 wurden mit Hilfe von affinitätsgereinigten Kaninchenseren identifiziert (Teilabb.: b-d; B/B' ist durch Pfeilspitzen gekennzeichnet). Neben SmB/B' ist in Teilabb. c die leichte Kette des Antikörpers zu erkennen, der ebenfalls von der Säule eluiert wurde. (B) *In vitro* Rekonstitution der U1 snRNP-Ausbildung durch den SMN-Komplex, der mit 150mM NaCl (Spuren 1 und 4) oder mit 850mM NaCl (Spuren 2 und 5) gewaschen wurde. In den Spuren 3 und 6 ist die Rekonstitution durch den mit gereinigten Sm-Proteinen wiederbeladenen SMN-Komplex dargestellt. Die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne wurde durch native Gelelektrophorese (Spuren 1-3) oder Immunpräzipitationen mit dem anti-Sm Antikörper Y12 (Spuren 4-6) analysiert.

Komplexes wichtig sind, durch die Hochsalzbehandlung ebenfalls gelöst wurden. Um dies zu untersuchen, wurde der immobilisierte SMN Δ B/B'.D3-Komplex mit einem Überschuss an isolierten Sm-Proteinen (TPs) inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden hiernach durch intensives Waschen entfernt, und die gebundenen Proteine durch SDS-PAGE bzw. Western Blotting analysiert (Abb.: 5.12 und 5.13A). Interessanterweise führte diese Prozedur zu einer spezifischen Assoziation der Sm-Protein B/B' und D3 mit dem SMN Δ B/B'.D3-Komplex und damit zur Rekonstitution des SMN-Komplexes (Abb.: 5.12, Spur 5 und Abb.: 5.13A, Spur 2). In der Tat konnte der rekonstituierte SMN-Komplex effizient das U1 snRNP-Partikel *in vitro* zusammenlagern (Abb.: 5.13B, Spur 3).

Diese Ergebnisse lassen daher vermuten, dass alle Sm-Proteine in einem Schritt vom SMN-Komplex auf die U snRNA übertragen werden. Die stabile Ausbildung einer „subcore“-Struktur, wie sie mit isolierten Sm-Proteinen beobachtet wird, ist bei der SMN-Komplex-abhängigen Zusammenlagerung von U snRNPs dagegen nicht festzustellen.

5.11 Identifizierung einer cytosolischen Enzymaktivität, die Sm-Proteine symmetrisch dimethyliert

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der SMN-Komplex nicht nur essentiell, sondern alleine ausreichend für die Zusammenlagerung von U snRNPs ist. Die Interaktion des SMN-Komplexes mit den Sm-Proteinen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass SMN eine Hauptkomponente des SMN-Komplexes ist, die direkt mit den Sm-Proteinen B/B', D1 und D3 interagiert (Liu *et al.*, 1997) und hierfür die Tudor-Domäne von SMN notwendig ist (Buhler *et al.*, 1999; Selenko *et al.*, 2001). Die Tudor-Domäne erkennt eine C-terminale Sequenz der Sm-Proteine, die sich durch wiederholende Glycin-Arginin-Paare auszeichnet (RG-repeats). Interessanterweise werden die Arginine in diesen Bereichen *in vivo* zu symmetrischen Dimethyl-Argininen (sDMA; (Brahms *et al.*, 2000)) umgewandelt und diese Modifikation führt zu einer dramatischen Bindungsaffinitätssteigerung an SMN (Friesen *et al.*, 2001a). Es war aufgrund dieser Befunde eine attraktive Annahme, dass der Transfer der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex auf der Ebene der post-translationalen Modifikation reguliert ist.

Ziel der folgenden Experimente war es daher herauszufinden welche Faktoren die sDMA-Modifikation katalysieren und welche Rolle sie bei der Biogenese von U snRNPs spielen. Zunächst wurde ein Testsystem, das die Analyse der Sm-Protein-Methylierung erlaubt, etabliert. Hierzu wurde ein Fusionsprotein aus GST und der RG-Sequenz von SmD3 rekombinant (d.h. unmethyliert) hergestellt (GST-SmD3-RG) und mit Cytoplasmaextrakt aus HeLa-Zellen in Anwesenheit von [³H]-S-Adenosylmethionin (SAM) inkubiert. Der Transfer der [³H]-markierten Methylgruppe von SAM auf das rekombinante Fusionsprotein wurde dann durch Autoradiographie nachgewiesen. Durch diese Vorgehensweise wurde GST-SmD3-RG nicht aber GST alleine effizient methyliert (Daten nicht gezeigt). Die Fraktionierung des Extraktes offenbarte darüber hinaus, dass die Methylierungsaktivität in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 300kDa detektierbar war (Abb.: 5.14A). Die Fraktion 7 aus der Gelfiltration methyliert nicht nur das beschriebene Fusionsprotein, sondern auch die vollständigen, rekombinanten Sm-Proteine. Diese Proteine wurden als heterooligomere Sm-Proteinkomplexen D1.D2, B(1-168).D3 und E.F.G (Kambach *et al.*, 1999) exprimiert und die Methylierungsaktivität der Fraktion 7 wie oben beschrieben analysiert. In Abbildung 5.14B ist gezeigt, dass SmD1 und SmD3 effizient modifiziert werden (Spuren 1 und 2). Im Gegensatz dazu wurden die Sm-Proteine, die keine RG-Paare enthielten (SmB(1-168), Spur 1; SmD2, E, F, G; Spuren 2 und 3) bzw. GST oder Histon 2A (Spuren 5 und 6) nicht modifiziert. Diese

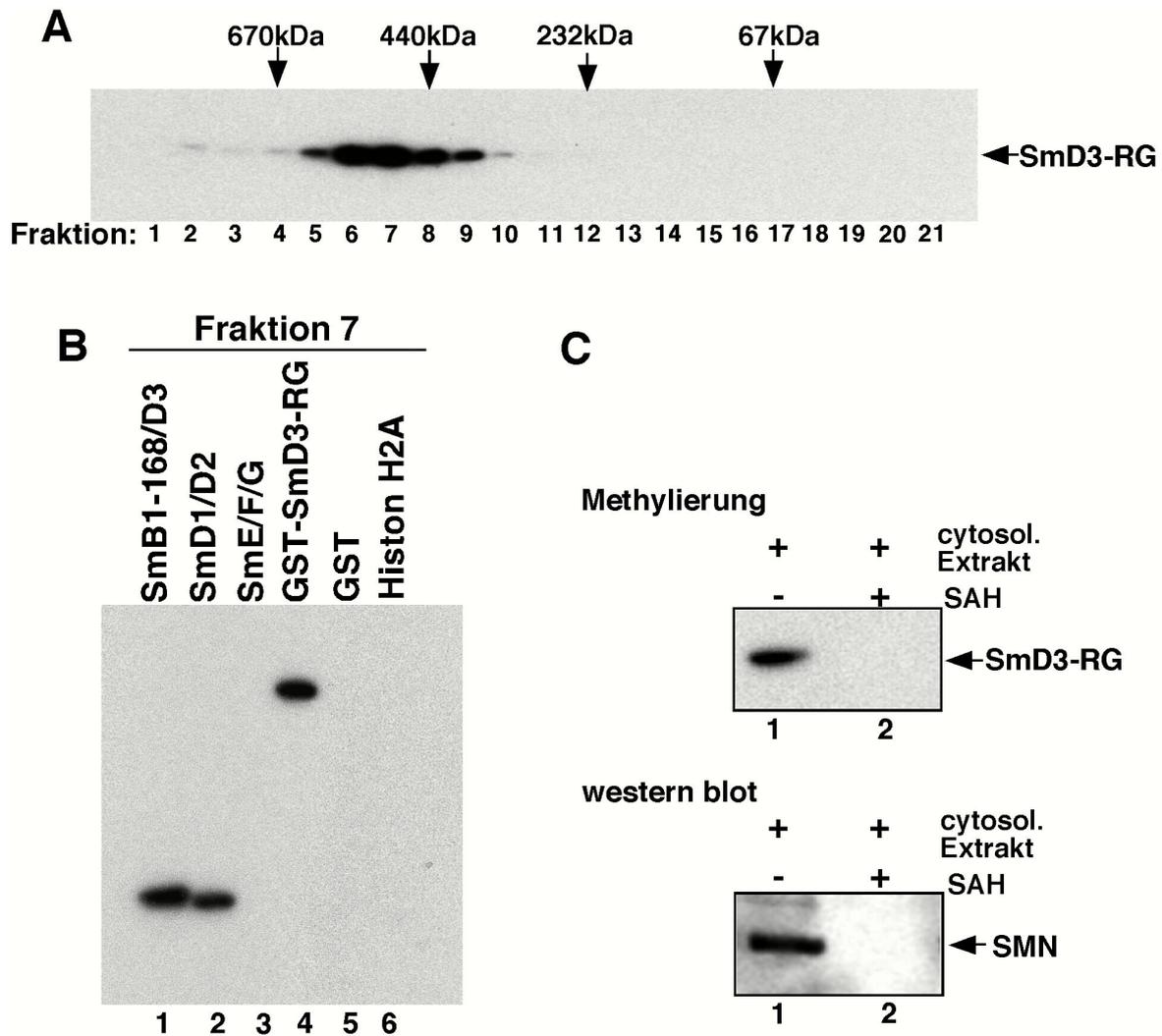


Abbildung 5.14: Ein makromolekularer Protein-Komplex katalysiert die symmetrische Dimethylierung der Sm-Proteine D1 und D3. (A) Cytoplasmaextrakt aus HeLa-Zellen wurde mit Hilfe einer Superose-6-Gelfiltrationssäule fraktioniert. Zur Detektion der Methyltransferaseaktivität wurden die einzelnen Fraktionen mit rekombinantem GST-SmD3-RG und $[^3\text{H}]$ -SAM inkubiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Molekulargewichte eines Proteinmarkers sind im oberen Bereich der Teilabb. (A) beschrieben. (B) Die Fraktion 7 der in (A) dargestellten Gelfiltration wurde zusammen mit rekombinantem SmB/B'(1-168).D3 (Spur 1), SmD1.D2 (Spur 2), SmE.F.G (Spur 3), GST-SmD3-RG (Spur 4), dem GST-Fusionsanteil alleine (Spur 5) und Histon H2A (Spur 6) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem SAM inkubiert. Die modifizierten Proteine wurden wie in (A) beschrieben analysiert. (C) Sm-Proteine werden im Cytoplasmaextrakt symmetrisch dimethyliert. GST-SmD3-RG wurde mit Cytoplasmaextrakt, $[^3\text{H}]$ -SAM und entweder Puffer (PBS, Spur 1) oder SAH (Spur 2) inkubiert. Nach einer Stunde wurde GST-SmD3-RG mit Hilfe von Glutathion-Sepharose isoliert. Die Methylierung von GST-SmD3-RG wurde durch Autoradiographie (obere Teilabb.) und ko-gereinigtes SMN durch Western Blotting mit anti-SMN Antikörpern 7B10 (untere Teilabb.) analysiert.

Ergebnisse ließen daher vermuten, dass die Methyltransferase, die Methylgruppen auf Sm-Proteine überträgt, ein Protein (bzw. ein Protein-Komplex) von ca. 300kDa Größe ist.

Es galt als nächstes festzustellen, ob die beobachtete Methylierungsaktivität im Extrakt tatsächlich symmetrische Dimethylarginine in den Sm-Proteinen generiert oder ob es sich hier um die sehr viel häufiger auftretenden asymmetrischen Dimethylarginine handelt. Um dies zu klären, wurde die Beobachtung ausgenutzt, dass nur die symmetrisch nicht aber die asymmetrische Dimethylierung von Sm-Proteinen die Interaktion mit SMN erlaubt (Friesen *et al.*, 2001a). Rekombinante Sm-Proteine sollten daher nur dann mit SMN interagieren können, wenn diese zuvor symmetrisch dimethyliert wurden.

GST-SmD3-RG wurde mit HeLa-Cytosol und [³H]-SAM inkubiert, was zur Methylierung des Proteins führte (Abb.: 5.14C, Spur 1, oberer Teilabb.). Die Methylierung ließ sich hingegen effizient durch Zugabe eines Überschusses S-Adenosyl-Homocystein (SAH), dem Endprodukt der Methylierungsreaktion, blockieren (Spur 2). Um die Interaktion mit SMN zu analysieren, wurden methyliertes und unmethyliertes GST-SmD3-RG durch die Bindung an Glutathion-Sepharose aus dem Extrakt isoliert und getestet, ob SMN kogereinigigt werden konnte. Wie in Abbildung 5.14C (obere Teilabb.) zu sehen ist, konnte SMN nur dann mit GST-SmD3-RG kogereinigigt werden, wenn das Fusionsprotein methyliert war (Spur 1). Im Gegensatz dazu wurde durch die Behandlung mit SAH keine Bindung an SMN beobachtet (Spur 2).

Diese Daten machten es wahrscheinlich, dass ein ca. 300 kDa Enzym (-Komplex) die symmetrische Dimethylierung von Sm-Proteine im HeLa-Cytosol katalysiert.

5.12 Der pICln-Komplex katalysiert die sDMA-Modifikation der Sm-Proteine

Die Beobachtung der sDMA-Modifizierung von Sm-Proteinen im HeLa-Extrakt ließ auf eine spezifische Methyltransferase schließen, die diese Modifikation katalysiert. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich Typ-I-Methyltransferasen bekannt, die die asymmetrische Arginin-Methylierung von Proteinen mit RGG-Motiven katalysieren. Eine Typ-II- (d.h. sDMA generierende) Methyltransferase wurde zwar postuliert, jedoch noch nicht identifiziert. Bei der Suche nach der Sm-Protein-modifizierenden, putativen Typ-II-Methyltransferase wurde von der Prämisse ausgegangen, dass dieses Protein zumindest transient mit den Sm-Proteinen interagieren muss. In der Tat wurde kürzlich von Pu *et al.* gezeigt, dass ein als pICln bezeichnetes Protein sowohl mit Sm-Proteinen als auch mit einem weiteren Faktor, JBP1, assoziiert vorliegt (Pu *et al.*, 1999). Die Sequenzanalyse von JBP1 offenbarte weiterhin, dass

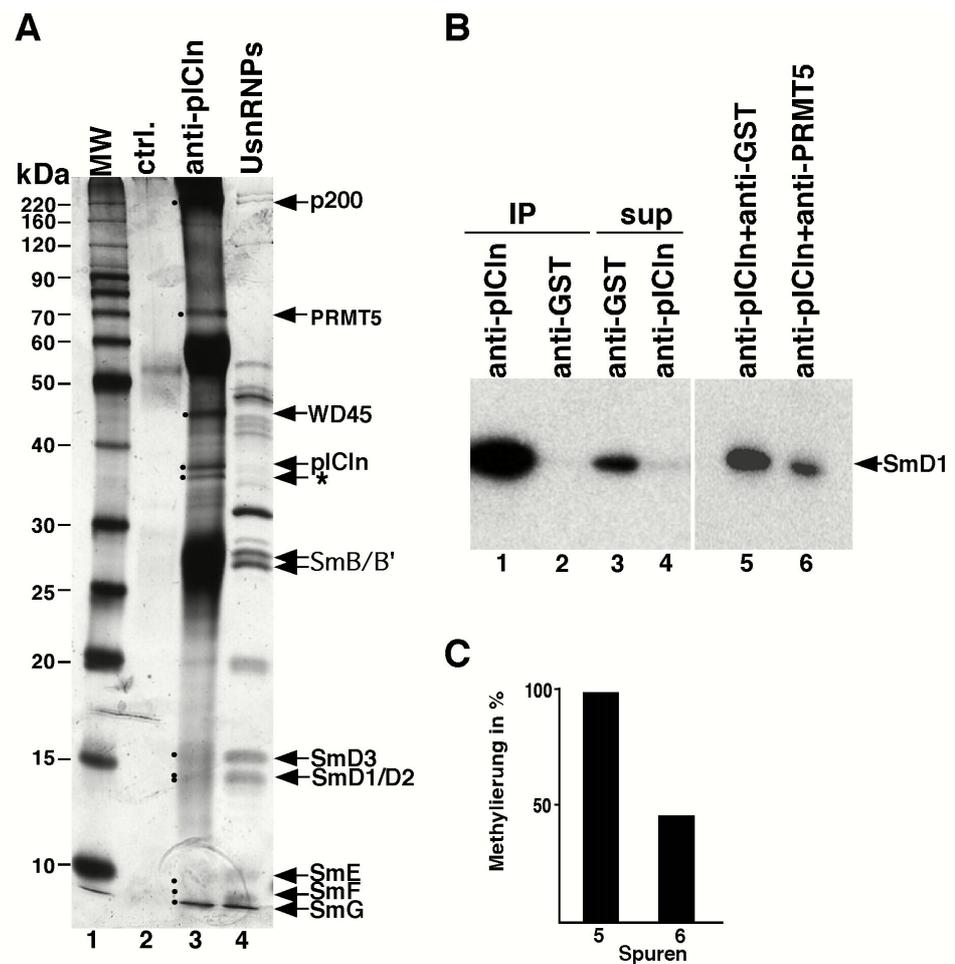


Abbildung 5.15: Der gereinigte pICln-Komplex katalysiert die symmetrische Dimethylierung der Sm-Proteine. (A) Eine anti-pICln-Affinitätssäule (Spur 3) bzw. eine Kontrollssäule (Spur 2) wurden mit HeLa-Cytoplasmaextrakt beladen und durch pH-Schock eluiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silber-Färbung sichtbar gemacht. Die Spuren 1 und 4 zeigen einen Molekulargewichtsmarker sowie die Proteine von gereinigten U snRNPs. Die Komponenten des pICln-Komplexes sind durch Punkte gekennzeichnet. Bei der Bande, die mit einem Stern gekennzeichnet ist, handelt es sich um ein Abbauprodukt von pICln. (B) Anti-pICln- bzw. anti-GST Antikörper wurden an Protein-G-Sepharose gebunden und mit HeLa-Cytoplasmaextrakt inkubiert. Die Methyltransferaseaktivität der Immunpräzipitate (Spuren 1 und 2) und der korrespondierenden Überstände (Spuren 3 und 4) wurden wie in Abbildung 5.14 beschrieben analysiert. Als Substrat diente ein Komplex aus rekombinantem SmD1 und D2. Die Methylierungsexperimente, die in den Spuren 5 und 6 gezeigt sind, wurden mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen GST (Spur 5) und PRMT5 (Spur 6) vorinkubiert. (C) Quantifizierung der in (B) (Spuren 5 und 6) dargestellten Antikörperinhibitionsstudien.

dieses Protein eine Domäne enthält, die man auch bei allen bisher bekannten Typ-I-Methyltransferasen findet (Pollack *et al.*, 1999; Rho *et al.*, 2001). Diese Beobachtung legte den Schluß nahe, dass die in Abbildung 5.14 detektierte Methyltransferase-Aktivität durch diesen pICln-Komplex katalysiert wird.

Um dies zu testen wurde der pICln-Komplex über Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb.: 5.15A). Konsistent mit vorherigen Berichten ko-eluierte pICln zusammen mit JBP1 und einem neuen Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Spur 3). Dieses 45kDa Protein (hier „WD45“ genannt) ist ein WD-Motiv-tragendes Protein, dem bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Datenbankanalysen ergaben, dass dieses Protein starke Ähnlichkeit zu β -Transducin aufweist (siehe Anhang für Sequenzinformationen). Darüber hinaus wurden auch alle Sm-Proteinen (d.h. Sm B/B', D1, D2, D3, E, F und G) im Säuleneluat gefunden (Spur 3).

Um zu testen, ob der gereinigt pICln-Komplex Methyltransferase-Aktivität aufweist wurde er zusammen mit rekombinantem SmD1/D2-Komplex in Anwesenheit von [³H]-markiertem SAM inkubiert und die Sm-Proteine durch SDS-PAGE bzw. Autoradiographie analysiert. Wie in Abbildung 5.15B zu erkennen ist, wurde SmD1 in der Tat durch den gereinigten pICln-Komplex stark methyliert (Spur 1), während der Durchlauf der Affinitätsreinigung nahezu inaktiv war (Spur 4). Eine Kontrollreinigung mit anti-GST Antikörpern zeigte dagegen keine Methylierungsaktivität (Spur 2). Interessanterweise ließ sich die Methylierungs-Aktivität des pICln-Komplexes signifikant reduzieren, wenn der Ansatz vor der Methylierungsreaktion mit anti-JBP1 Antikörpern inkubiert wurde (Abb.: 5.15B vergleiche Spuren 5 und 6).

Diese Daten legten daher nahe, dass der pICln-Komplex die sDMA-Modifikation der Sm-Proteine vermittelt, wobei die Typ-II-Arginin-Methyltransferase JBP1 sehr wahrscheinlich die enzymatische Komponente dieses Komplexes ist. Gleichzeitig und im Einklang mit den hier aufgeführten Studien konnte durch Branscombe et al. auf chemischem Wege nachgewiesen werden, dass es sich bei JBP1 um eine Typ-II-Methyltransferase handelt (Branscombe *et al.*, 2001). JBP1 wurde aufgrund dieser Befunde in Einklang mit der Methyltransferase-Nomenklatur in Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5) umbenannt.

Aufgrund der stabilen Integration von PRMT5 in den pICln-Komplex stellte sich die Frage, ob Faktoren wie pICln die Aktivität der Methyltransferase regulieren können. Um dies zu untersuchen, wurden Sm-Proteine zusammen mit rekombinantem pICln im cytoplasmatischen HeLa-Extrakt analysiert (Abb.: 5.16). Tatsächlich zeigte die Zugabe von rekombinantem pICln eine zehnfach stärkere Methylierung der Sm-Proteine D1 und D3 (vergleiche Spuren 1 und 2 mit 5 und 6), was darauf hindeutet, dass pICln und PRMT5 bei der effizienten Methylierung von Sm-Proteinen kooperieren.

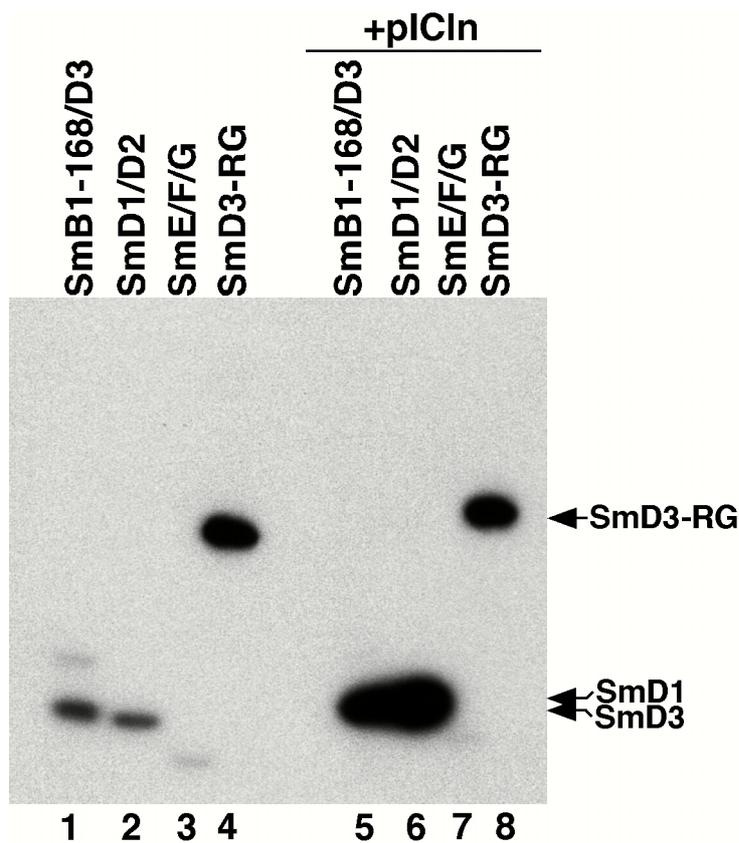


Abbildung 5.16: Die Vorinkubation der Sm-Proteine mit rekombinantem pICln stimuliert deren Methylierung. Rekombinante heterooligomere Sm-Proteinkomplexe B1-168/D3 (Spuren 1 und 5), D1/D2 (Spuren 2 und 6), E/F/G (Spuren 3 und 7) sowie SmD3-RG wurden entweder mit rekombinantem pICln vorinkubiert (Spuren 5-8) oder direkt mit HeLa-Cytoplasmaextrakt in Anwesenheit von radioaktiv markiertem SAM inkubiert (Spuren 1-4). Die methylierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

5.13 pICln interagiert direkt mit der Sm-Domäne von Sm-Proteinen

In initialen Experimenten von Pu et al. wurde pICln als ein Faktor beschrieben, der Sm-Proteine bindet und der im Überschuss die Zusammenlagerung von U snRNPs im *X. laevis* Oocytensystem inhibieren kann (Pu *et al.*, 1999). Daraus wurde geschlossen, dass sich die Bindung von pICln und SMN bezüglich der Sm-Proteine gegenseitig ausschließen, und dass beide Proteine gleiche Bindungsmotive auf den Sm-Proteinen erkennen. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt (Abb.: 5.17A). Erstaunlicherweise zeigten diese Untersuchungen, dass pICln mit allen drei rekombinanten heterooligomeren Sm-Komplexe interagieren kann (Spuren 8-10), wohingegen nur eine sehr schwache Interaktion mit dem GST-Fusionsanteil alleine zu beobachten war (Spur 14-16). Die heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe konnten hingegen nicht an SMN binden, was konsistent mit der Beobachtung war, dass hierfür die Methylierung der Sm-Proteine eine essentielle Voraussetzung ist (Spuren 11-13). Im Gegensatz dazu banden native heterooligomere Sm-Komplexe, die aus gereinigten U snRNPs isoliert wurden und somit symmetrische Dimethylarginine aufwiesen gleichermaßen an GST-SMN(1-160, ein SMN-Fragment, welches die Tudor-Domäne trägt und mit Sm-Proteinen interagiert) und GST-pICln

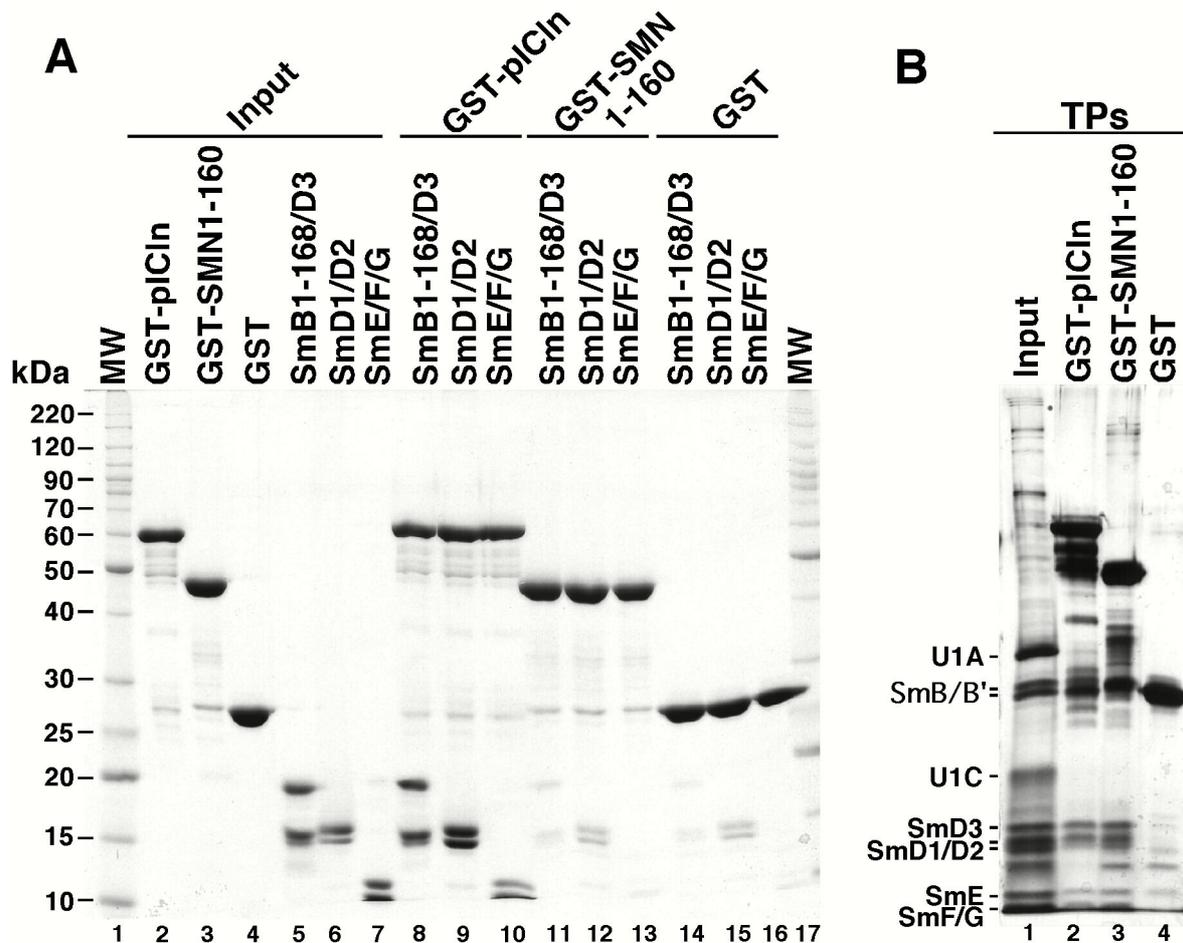


Abbildung 5.17: PICln interagiert direkt mit der Sm-Domäne der Sm-Proteine. (A) Rekombinantes GST-pICln (Spuren 8-10), GST-SMN(1-160) (Spuren 11-13) und GST alleine (Spuren 14-16) wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und anschließend mit den rekombinanten heterooligomeren Komplexen SmB/B'(1-168).D3 (Spuren 8, 11 und 14), SmD1.D2 (Spuren 9, 12 und 15) sowie SmE.F.G (Spuren 10, 13 und 16) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In den Spuren 2-7 sind die eingesetzten Proteine dargestellt. Molekulargewichtsmarker sind in den Spuren 1 und 17 gezeigt. (B) GST-pICln (Spur 2), GST-SMN(1-160) (Spur 3) sowie GST alleine (Spur 4) wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und mit gereinigten Sm-Proteinen (TPs) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silber-Färbung sichtbar gemacht. In Spur 1 sind die eingesetzten Sm-Proteine dargestellt.

nicht aber an GST alleine (Abb.: 5.17B; Spuren 2-4). PICln bindet demnach direkt an die Sm-Proteinen, im Gegensatz zu SMN ist dafür aber keine sDMA-Modifikation notwendig.

Die Bindung aller heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe an pICln deuteten darauf hin, dass eine gemeinsame Struktur der Sm-Proteine für diese Interaktion notwendig ist. Als ein gemeinsames Motiv kommt dabei die Sm-Domäne in Frage, die für die charakteristische Faltung dieser Proteinfamilie und für die Interaktion dieser Proteine untereinander verantwortlich ist.

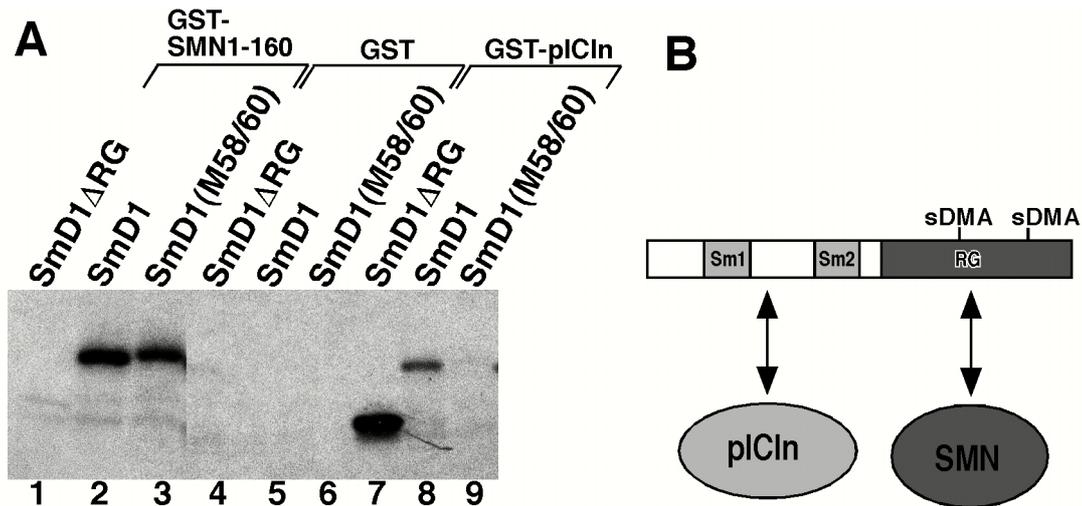


Abbildung 5.18: Die Sm-Domäne der Sm-Proteine ist für die Interaktion mit pICln notwendig. (A) GST-pICln (Spuren 7-9), GST-SMN(1-160) (Spuren 1-3) bzw. GST alleine (Spuren 4-6) wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und mit [³⁵S]-markierten SmD1ΔRG (Spuren 1, 4 und 7), SmD1 (Spuren 2, 5 und 8) sowie SmD1(M58/60) (Spuren 3, 6 und 7) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert. (B) Die Interaktionsmöglichkeiten der Sm-Proteine sowohl mit SMN als auch mit pICln sind schematisch dargestellt.

Um die Bindungsstelle für pICln auf den Sm-Proteinen zu identifizieren, wurden rekombinantes GST-pICln, GST-SMN(1-160) und GST alleine an Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit verschiedenen radioaktiv markierten, *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert. Hierbei ist anzumerken, dass aufgrund der Expression im Reticulocytenslysate die radioaktiv markierten Sm-Proteine symmetrisch dimethyliert werden. Die gebundenen Proteine wurden wie oben beschrieben durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Abb.: 5.18A). In der Tat konnte eine mutierte Form von SmD1, der die RG-Motive fehlten (SmD1ΔRG), noch sehr effizient mit pICln wechselwirken (Spur 7), es wurde aber keine Interaktion mit SMN(1-160) oder GST beobachtet (Spuren 1 und 4). Darüber hinaus band eine mutierte Form, bei der durch Punktmutationen die Aminosäuren L58 und I60 der Sm-Domäne durch K bzw. R ersetzt wurden (SmD1(M58/60)), nicht mehr an pICln bzw. GST (Spuren 9 und 6) aber noch sehr gut an SMN(1-160) (Spur 3).

Die gezeigten Resultate legten den Schluss nahe, dass pICln direkt mit den Sm-Domänen der Sm-Proteine interagiert und damit keine Überlagerung der Bindungssequenzen mit SMN hat. Die Interaktionen von SMN und pICln mit den Sm-Proteinen sind in Abbildung 5.18B schematisch dargestellt.

5.14 Der pICln-Komplex interagiert direkt mit dem SMN-Komplex und stimuliert dabei seine Aktivität

In den vorangegangenen Experimenten wurde dargestellt, dass der SMN-Komplex alleine ausreichend ist die Sm-core-Domäne von U snRNPs zu generieren. Bei diesen Untersuchungen war jedoch auffällig, dass die Assemblierungsreaktion sehr ineffizient und ATP-unabhängig ablief. Diese Diskrepanz zur *in vivo* Situation deutete darauf hin, dass neben dem SMN-Komplex *in vivo* noch weitere Faktoren an der U snRNP-Biogenese beteiligt sein könnten. Ein Kandidat dafür ist, aufgrund seiner Funktion bei der Sm-Protein-Methylierung, der pICln-Komplex, für den unter bestimmten experimentellen Bedingungen ein inhibitorischer Einfluss auf die U snRNP-Zusammenlagerung vorgeschlagen wurde (Pu *et al.*, 1999). Um einen möglichen Einfluss des pICln-Komplexes auf die U snRNP-Zusammenlagerung durch den SMN-Komplex zu untersuchen, wurden große Mengen pICln-Komplex aus HeLa-Cytoplasmaextrakt durch anti-pICln-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb.: 5.19A). In Übereinstimmung mit den in Abbildung 5.15A dargestellten Ergebnissen, konnten neben pICln die beschriebenen Komplexkomponenten WD45 und PRMT5 im Eluat detektiert werden. Interessanterweise ließen sich neben diesen Proteinen noch zahlreiche weitere Faktoren finden, die durch MALDI-TOF und Western Blot-Analysen als Komponenten des SMN-Komplexes identifiziert werden (Spur 2 mit Punkten markiert)

Die Beobachtung, dass der SMN-Komplex direkt mit dem pICln-Komplex interagiert, führte nun zu der Frage, ob beide Komplexe eine funktionelle Einheit bei der Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne bilden. In der Tat konnte beobachtet werden, dass der affinitätsgereinigte SMN/pICln-Komplex die Ausbildung der Sm-core-Domäne (Komplex M) induzierte (Abb.: 5.19B, Spur 2). Die Ausbildung des M-Komplexes wird durch den SMN-Komplex vermittelt, da durch die Vorinkubation mit anti-Gemin2 und anti-Gemin4 Antikörpern bzw. durch die Inkubation auf 4°C keine Zusammenlagerung beobachtet wurde (Spuren 3-5). Interessanterweise erfolgte die Zusammenlagerung des U1 snRNPs durch den SMN/pICln-Komplex nur in Anwesenheit von ATP (Spuren 7-8) und offenbar wesentlich effizienter als mit dem isolierten SMN-Komplex alleine. Letzteres konnte aus dem Befund geschlossen werden, dass in Vergleich zum gereinigten SMN-Komplex wesentlich weniger SMN/pICln-Komplex notwendig war um die Zusammenlagerungsreaktion zu induzieren (Abb.: 5.19C, vergleiche Spuren 1, 2 mit 3, 4). Der pICln/SMN-Komplex vermittelt daher die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne in einer Reaktion, die sich in allen wesentlichen Aspekten mit der Ausbildung im Zellextrakt deckt. Der SMN/pICln-Komplex ist sehr

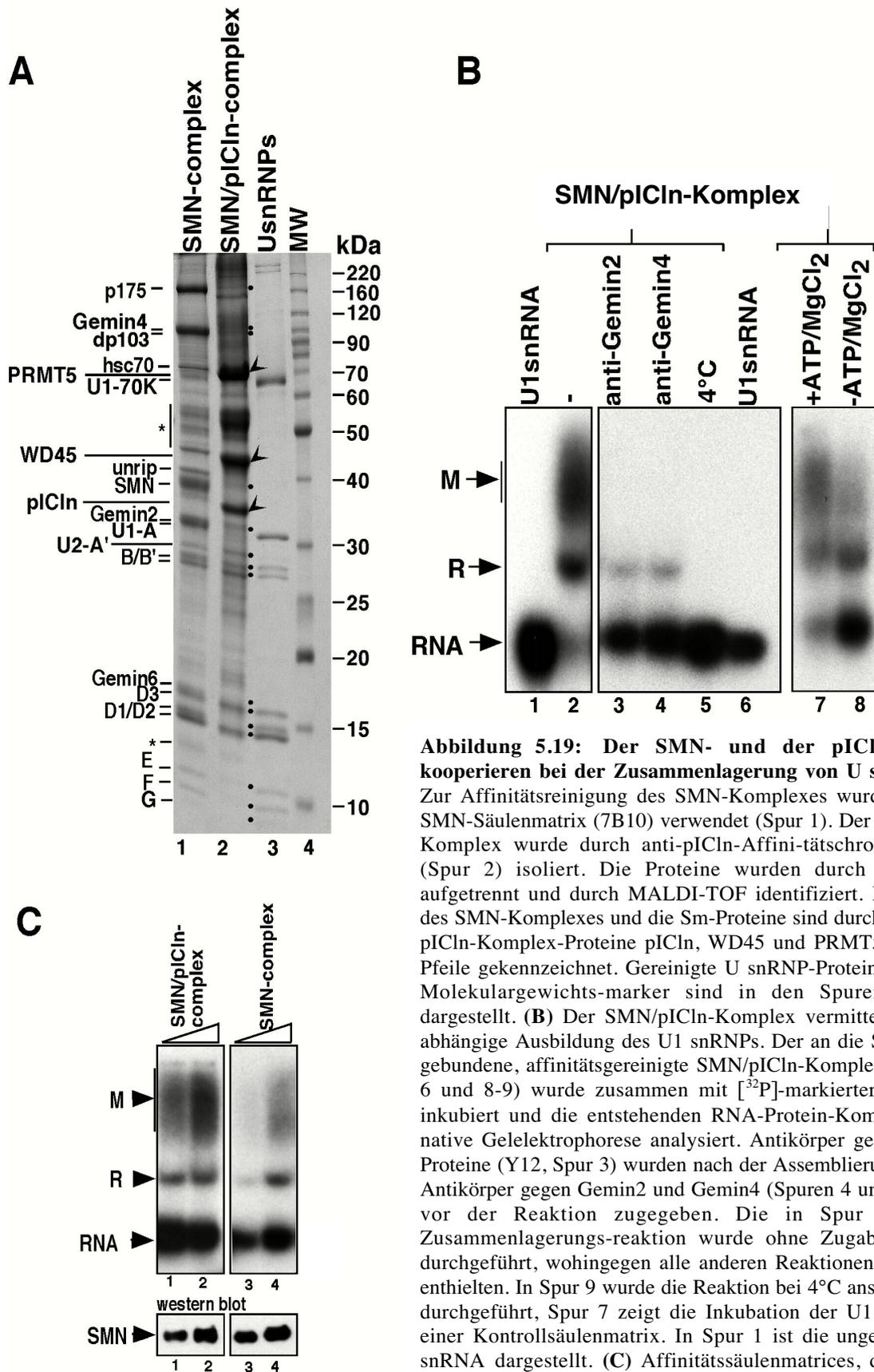


Abbildung 5.19: Der SMN- und der pICln-Komplex kooperieren bei der Zusammenlagerung von U snRNPs. (A) Zur Affinitätsreinigung des SMN-Komplexes wurde eine anti-SMN-Säulenmatrix (7B10) verwendet (Spur 1). Der SMN/pICln-Komplex wurde durch anti-pICln-Affinitätschromatographie (Spur 2) isoliert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch MALDI-TOF identifiziert. Die Proteine des SMN-Komplexes und die Sm-Proteine sind durch Punkte, die pICln-Komplex-Proteine pICln, WD45 und PRMT5 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gereinigte U snRNP-Proteine, sowie ein Molekulargewichts-marker sind in den Spuren 3 und 4 dargestellt. **(B)** Der SMN/pICln-Komplex vermittelt die ATP-abhängige Ausbildung des U1 snRNPs. Der an die Säulenmatrix gebundene, affinitätsgereinigte SMN/pICln-Komplex (Spuren 2-6 und 8-9) wurde zusammen mit [³²P]-markierter U1 snRNA inkubiert und die entstehenden RNA-Protein-Komplexe durch native Gelelektrophorese analysiert. Antikörper gegen die Sm-Proteine (Y12, Spur 3) wurden nach der Assemblierungsreaktion, Antikörper gegen Gemin2 und Gemin4 (Spuren 4 und 5) wurden vor der Reaktion zugegeben. Die in Spur 9 gezeigte Zusammenlagerungsreaktion wurde ohne Zugabe von ATP durchgeführt, wohingegen alle anderen Reaktionen 5 mM ATP enthielten. In Spur 9 wurde die Reaktion bei 4°C anstatt bei 37°C durchgeführt, Spur 7 zeigt die Inkubation der U1 snRNA mit einer Kontrollsäulenmatrix. In Spur 1 ist die ungebundene U1 snRNA dargestellt. **(C)** Affinitätssäulenmatrices, die entweder den SMN-Komplex (Spuren 3 und 4) oder den SMN/pICln-Komplex (Spuren 1 und 2) enthielten wurden mit [³²P]-markierter U1 snRNA inkubiert und wie in (A) beschrieben analysiert. Die untere Teilabbildung zeigt die eingesetzte SMN-Komplex-Menge.

wahrscheinlich die funktionelle Einheit, die die U snRNP-Zusammenlagerung *in vivo* ermöglicht.

5.15 Ein zelluläres Modell zur Analyse der molekularen Mechanismen der Spinalen Muskelatrophie

Bedingt durch den homozygoten Verlust der SMN1-Kopie exprimieren SMA-Patienten nur geringe Mengen an funktionellem SMN-Protein (Sendtner, 2001). Da in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass der SMN-Komplex den Transfer der Sm-Proteine auf die U snRNA und damit die Biogenese von U snRNPs vermittelt, stellte sich die Frage, ob Defekte in diesem Prozess bei SMA-Patienten zu beobachten sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst die SMN-Menge in primären Fibroblasten-Kulturen von SMA Typ-I-Patienten durch Western Blot-Analyse bestimmt. Wie in Abbildung 5.20A zu sehen ist, ist die SMN-Protein Menge in diesen Patienten um ca. 60% reduziert, die Menge der anderen Proteine wie zum Beispiel SMNrp oder SmB/B' ist dagegen unverändert (vergleiche Spuren 1/2 mit 3/4 und Abb.: 5.20B). Aus technischen Gründen war es jedoch nicht möglich die U snRNP-Assemblierungsaktivität der Patientenfibroblasten direkt (d.h. *in vivo*) zu analysieren. Es wurde daher in den folgenden Experimenten die SMN-Menge in HeLa-Zellen durch RNA-Interferenz (RNAi) auf den Level von SMA-Patienten reduziert um somit die Situation von SMA-Patienten in einem anderen Zellsystem zu simulieren.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit einer 22 nt langen RNA-Duplex, die den Nukleotiden 183-205 der SMN cDNA entsprach, inkubiert. Wie in Abbildung 5.20A zu erkennen ist, konnte nach 72 Stunden eine ca. 53%ige Reduktion der endogenen SMN-Menge erreicht werden, während die Menge von SMNrp und auch die der Sm-Proteine konstant blieben (Spuren 5 und 6). Dies entspricht in etwa der SMN-Protein-Menge in SMA-Typ-I-Patienten. Die weitere Absenkung des SMN-Levels führte hingegen zur Apoptose dieser Zellen, was die essentielle Funktion des SMN-Proteins unterstreicht (nicht gezeigt).

Die RNAi-Zellen zeigen, ähnlich wie Patientenzellen (Coover *et al.*, 1997), eine räumliche Umorganisation des endogenen SMN-pools. So wurde durch indirekte Immunfluoreszenzen mit anti-SMN Antikörpern an RNAi behandelten Zellen nachgewiesen, dass die Konzentration von SMN in nukleären Gems dramatisch abnahm, wohingegen der cytoplasmatische pool nahezu unverändert blieb (Abb.: 5.20C, vergleiche linke und rechte Teilabb.). Zusammenfassend läßt sich daher sagen, dass bezüglich des Expressionslevels und

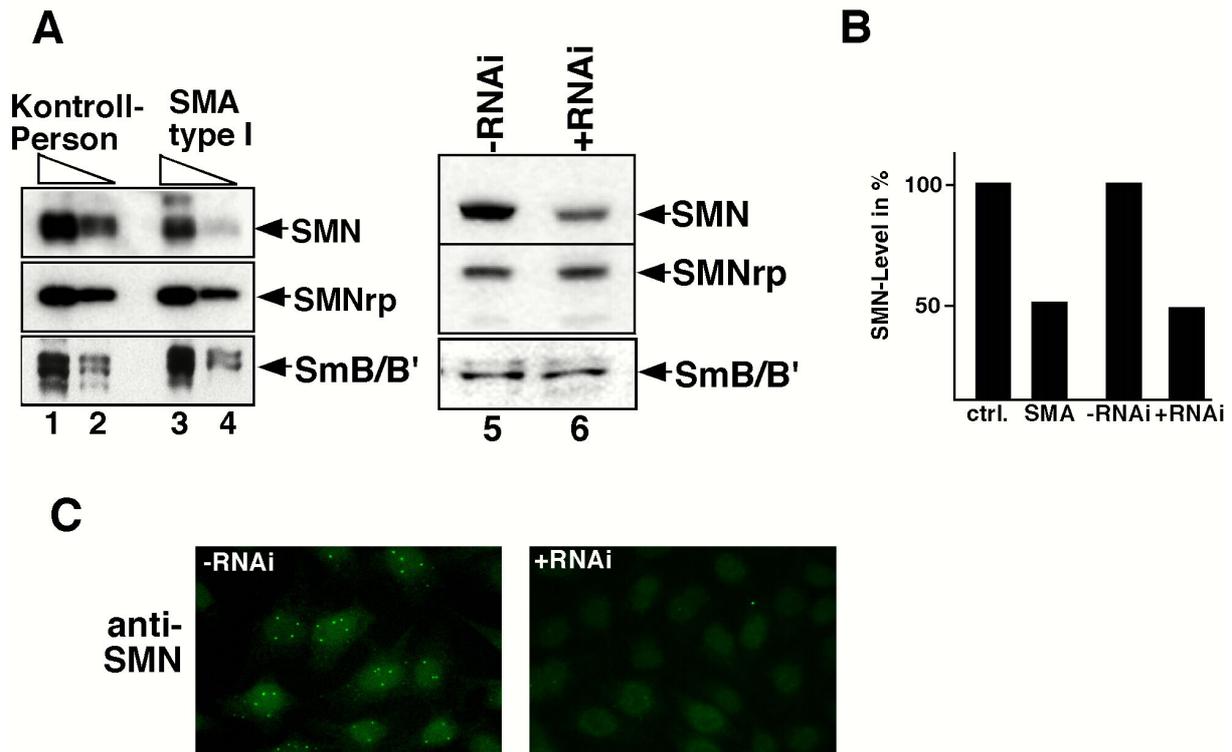


Abbildung 5.20: Reduktion der SMN-Proteinmenge in HeLa-Zellen durch RNA-Interferenz (RNAi) (A) Analyse der SMN-Proteinmenge in Zellextrakten von gesunden Personen (Spuren 1 und 2), SMA-Patienten (Spuren 3 und 4) sowie mit RNAi behandelten (Spur 6) und unbehandelten HeLa-Zellen (Spur 5). Zur Identifizierung der Proteine wurde der monoklonale anti-SMN Antikörper 7B10 (obere Teilabbildung), ein polyklonales anti-SMNrp Antiserum (mittlere Teilabbildung) sowie der monoklonale anti-Sm-Antikörper Y12 (untere Teilabbildung) herangezogen. (B) Quantifizierung der in (A) dargestellten SMN Proteinmengen. (C) Immunfluoreszenzstudien an RNAi behandelten (rechte Teilabbildung) und unbehandelten (linke Teilabbildung) HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden nach 72h Inkubation mit dsRNA fixiert und das zelluläre SMN durch den anti-SMN Antikörper 7B10 identifiziert.

der intrazellulären Lokalisation von SMN die RNAi behandelten HeLa-Zellen von den Typ-I-SMA-Patientenfibroblasten nicht zu unterscheiden waren.

Zwei Strategien wurden herangezogen, um die Auswirkungen der verminderten SMN-Menge auf die U snRNP-Biogenese zu untersuchen (Abb.: 5.21). Als erstes wurde die intrazelluläre Verteilung der Sm-Proteine untersucht. In früheren Arbeiten zum Transport von U snRNPs wurde gezeigt, dass Sm-Proteine nur dann in den Zellkern gelangen können, wenn sie zuvor in U snRNP-Partikel inkorporiert wurden (Fischer *et al.*, 1993). Es sollten demnach in Zellen, die eine verminderte U snRNP-Assemblierungsaktivität im Cytoplasma aufweisen, auch weniger Sm-Proteine im Kern zu finden sein. In Übereinstimmung mit publizierten Daten zeigten Immunfluoreszenzstudien an HeLa-Zellen mit anti-Sm-Antikörpern (hier anti-SmB/B'.D3 und anti-SmE.F.G) ein prominentes Kernsignal, wohingegen die Sm-Proteine im

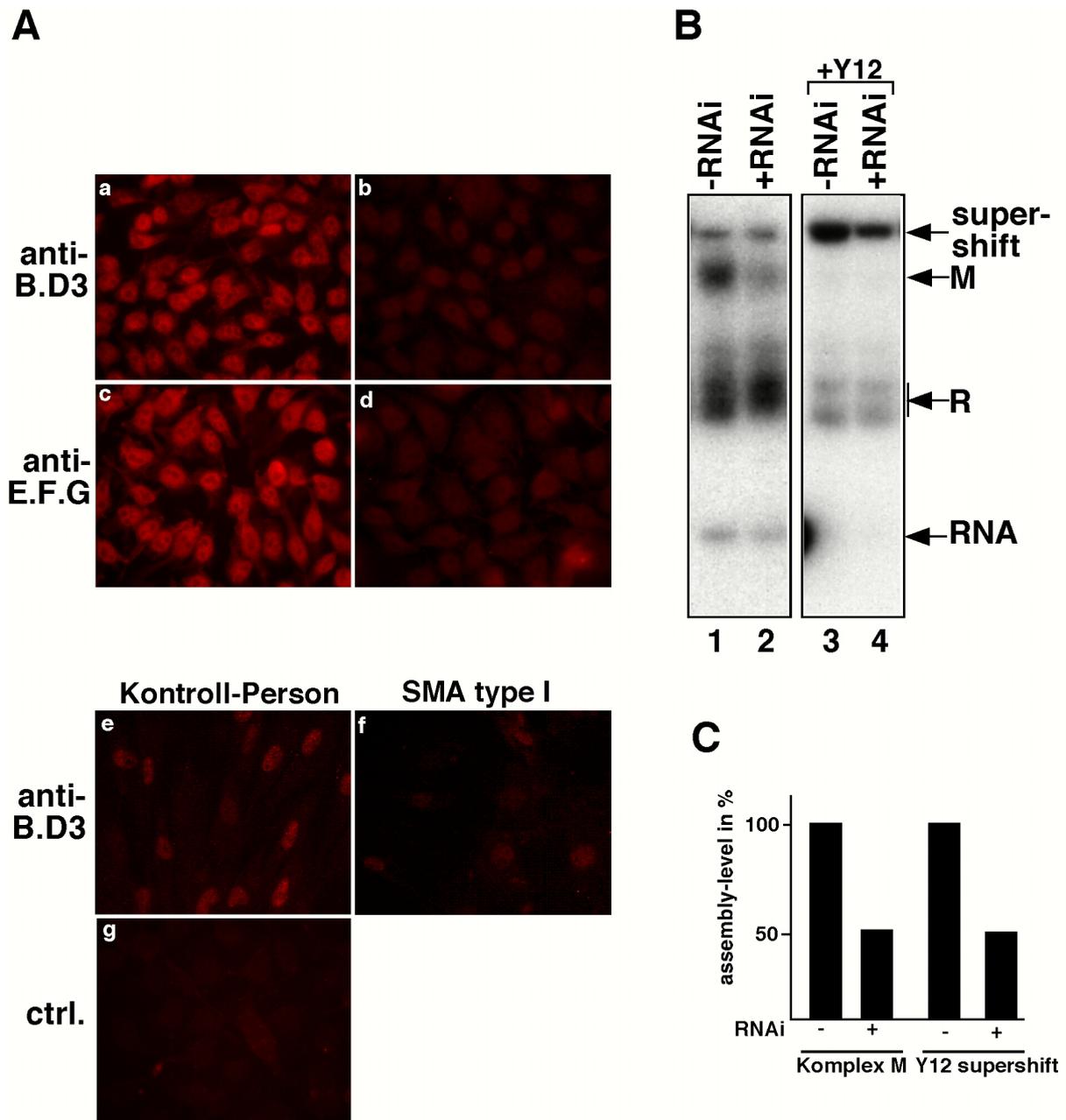


Abbildung 5.21: Die SMN-Reduktion bewirkt eine Reduktion der U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität. (A) Immunfluoreszenzstudien mit RNAi behandelten HeLa-Zellen (Teilabb.: b und d), unbehandelten HeLa-Zellen (Teilabb.: a und c), Fibroblasten von SMA-Typ-I-Patienten (Teilabb.: f) und Fibroblasten von einer gesunden Person (Teilabb.: e und g). Die Zellen wurden fixiert und entweder mit polyklonalen Antikörpern gegen SmB.D3 (Teilabb.: a, b, e und f) oder polyklonalen Antikörpern gegen SmE.F.G (Teilabb.: c und d) behandelt. In Teilabbildung g wurde nur der sekundäre Antikörper eingesetzt. (B) Aus RNAi-behandelten (Spuren 2 und 4) und unbehandelten HeLa-Zellen (Spuren 1 und 3) wurde Extrakt hergestellt und mit [³²P]-markierter U1 snRNA inkubiert. Die einzelnen Reaktionen wurden anschließend durch native Gelelektrophorese analysiert. Anti-Sm Antikörper wurden nach der Assemblierungsreaktion zu den Proben gegeben (Spuren 3 und 4). (C) Quantifizierung der in (B) dargestellten Assemblierungsreaktionen.

Cytosol nur schwach angefärbt werden konnten (Teilabb.: a, c und e). Interessanterweise war sowohl in Patientenfibroblasten als auch in RNAi behandelten HeLa-Zellen der Kernpool an Sm-Proteinen stark reduziert (ca. 50-60%), was auf eine gestörte U snRNP-Biogenese hindeutete (Teilabb.: b, d und f).

Um die oben beschriebene Beobachtung direkt zu überprüfen, wurde die U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität in RNAi-behandeltem Zellextrakt durch *in vitro*-Studien untersucht. In der Tat war die Zusammenlagerung des U1 snRNPs in Extrakten aus RNAi-behandelten HeLa-Zellen deutlich geringer als in Kontrollextrakten (Abb.: 5.21B/C, vergleiche Spuren 1 und 2).

Durch die in diesem Abschnitt gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der SMN-Menge auf pathogene Level mit einer verminderten Zusammenlagerung des U1 snRNPs einhergeht. Weitere Studien werden notwendig sein um zu klären, ob dieser Defekt kausal mit der Motorneuronendegeneration bei SMA-Patienten zusammenhängt (s. Diskussion).

5.16 SMNrp: ein neues Tudor-Domänen-Protein

Ein Sequenzcharakteristikum von SMN ist sein zentraler Bereich, der eine Tudor-Domäne enthält. Diese evolutionär konservierte Domäne ist vor kurzem als Bestandteil einer Reihe von Proteinen identifiziert worden, deren gemeinsames Charakteristikum eine Rolle im RNA-Metabolismus zu sein scheint (Ponting, 1997). Wie im ersten Teil dieser Arbeit herausgefunden wurde, ist SMN ein Protein mit einer neuartigen Funktion beim Zusammenlagern von RNPs.

Es stellte sich die Frage, ob Proteine existieren, die homolog zu SMN sind, und möglicherweise eine ähnliche Funktion ausüben. Es bestand die Hoffnung, dass die Identifizierung solcher Proteine weitere Einblicke in die Funktionsweise dieser Proteinklasse liefern könnte. Durch Datenbankanalysen ist es tatsächlich gelungen ein neues Protein zu identifizieren, das im zentralen Bereich zu 42% mit SMN homolog ist (Neubauer *et al.*, 1998; Talbot *et al.*, 1998). Dieses Protein besitzt demnach auch eine Tudor-Domäne und wurde aufgrund dieser bemerkenswerten Ähnlichkeit zu SMN als SMNrp (engl.: SMN related protein; (Talbot *et al.*, 1998)) bezeichnet. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Funktion von SMNrp untersucht. Diese funktionelle Charakterisierung zeigte, dass SMNrp eine Rolle als Zusammenlagerungsfaktor des Spleißosoms besitzt, weshalb an dieser Stellen das Spleißen von prä-mRNA-Molekülen in höheren Eukaryonten kurz beschrieben werden soll.

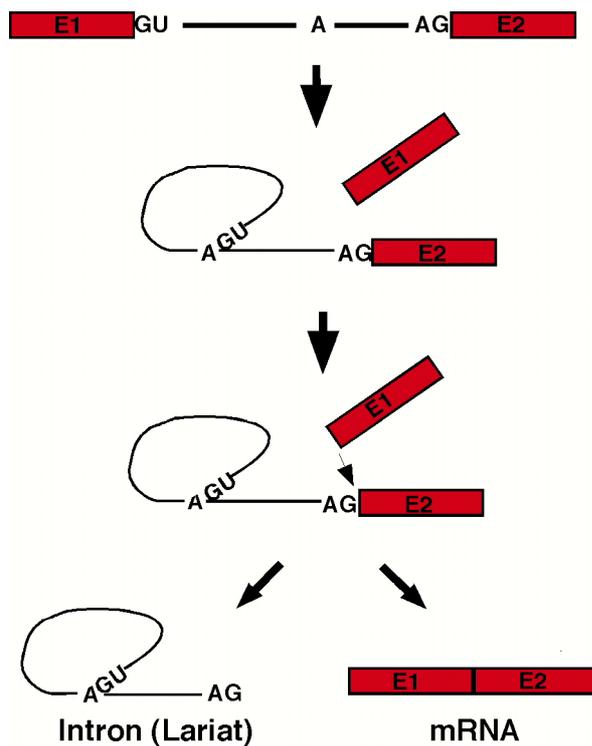


Abbildung 5.22: Schematische Darstellung der Spleißreaktion in höheren Eukaryonten. Das Spleißen von mRNA-Vorläufermolekülen erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungsreaktionen. Im ersten Schritt greift die 2'-Hydroxylgruppe eines im Intron befindlichen Adenins (branch point) als Nukleophil an der 5'-Spleißstelle an, was dazu führt, dass eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung entsteht (Lariat). Die so entstandene 3'-hydroxylgruppe des Exon1 greift nun als Nukleophil an der 3'-Spleißstelle an, was in der Freisetzung des Introns in seiner charakteristischen Lariat-Struktur und der Ligation der beiden Exons resultiert.

Gene höherer Eukaryonten sind durch kodierende Bereiche (Exons) und nicht kodierende Bereiche (Introns) gekennzeichnet. Die Transkription dieser Gene resultiert in einem Primärtranskript, das kodierende und nicht kodierende Sequenzen enthält. Um eine reife mRNA zu erhalten, müssen neben anderen Modifikationen diese Introns entfernt (gespleißt) werden. Dies wird durch einen makromolekularen Ribonukleoprotein-Komplex, dem sogenannten Spleißosom, katalysiert. Das Spleißen findet in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungs-Reaktionen, die an den Intron/Exon-Grenzen erfolgen, statt. Im ersten Schritt greift die 2'-Hydroxylgruppe eines sich im Intron befindenden Adenosins, der sogenannten Verzweigungspunktes (englisch: branch point), als Nukleophil an der 5'-Spleißstelle an. Dabei entsteht eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung im Intron-3'-Exon-Intermediat, die der RNA eine Lassostruktur (englisch: lariat) verleiht. Die im ersten Schritt entstandene freie 3'-Hydroxygruppe des 5'-Exons greift im zweiten Schritt als Nukleophil an der 3'-Spleißstelle an. Als Ergebnis der zweiten Transesterifizierung entstehen das herausgeschnittene Intron in seiner charakteristischen Lariat-Struktur und die ligierten Exons (zusammengefasst in Burge *et al.* (1999), Abb.: 5.22).

Das Spleißosom ist ein komplexes RNP, das sich aus den U1, U2, U4/U6 und U5 snRNPs und bis zu 50 weiteren Proteinen zusammensetzt (Tabelle 5.1). Das Spleißosom als solches ist darüber hinaus ein sehr dynamischer Komplex und wird an jedem individuellen Intron

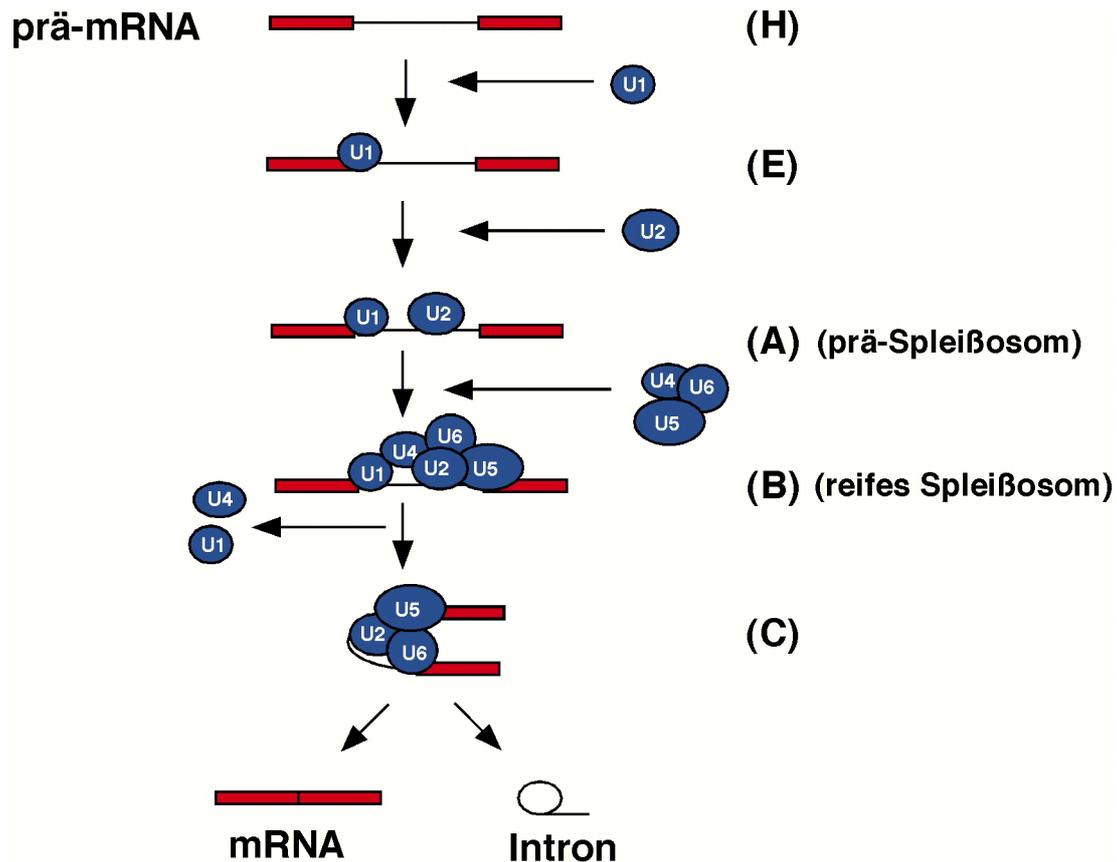


Abbildung 5.23: Schematische Darstellung der Ausbildung des Spleißosoms. Die Ausbildung des Spleißosoms verläuft in mehreren temporären Komplexen, die sich durch native Gelelektrophorese unterscheiden lassen. Die prä-mRNA liegt zunächst in hnRNP-gebundener Form vor (H-Komplex). Im ersten Schritt entsteht durch die Anlagerung des U1 snRNPs der erste spezifische Komplex, der E-Komplex genannt wird. In nächsten Schritt bindet das U2 snRNP an diesen Komplex was in der Ausbildung des A-Komplexes (prä-Spleißosom) resultiert. Dieser Schritt benötigt Energie in Form von ATP. Aus diesem Komplex wird in einem zweiten ATP-abhängigen Schritt unter Eintritt eines vorgeformten U4/U6.U5-tri-snRNP der B-Komplex (reifes Spleißosom) gebildet. Es erfolgen nun wiederum unter ATP-Verbrauch Umlagerungen in diesem Komplex, was zur Freisetzung des U4 und des U1 snRNPs und dadurch zur Ausbildung des C-Komplexes (katalytisch aktives Spleißosom) führt. Anschließend werden die Spleißprodukte und die einzelnen U snRNPs freigesetzt,

zumindest teilweise neu zusammengesetzt. Die Spleißosomenbildung verläuft dabei in einer Abfolge von mehreren Schritten und es können temporäre Komplexe in nativen Komplexelektrophoren identifiziert werden (Abb.: 5.23). Das Primärtranskript liegt zuerst in hnRNP-gebundener Form vor, was auch heterogener oder H-Komplex genannt wird. Im nächsten Schritt wird der erste spezifische Komplex, der aus dem an die 5'-Spleißstelle gebundenem U1 snRNP und der prä-mRNA besteht, gebildet. Dieser Komplex wird auch E-Komplex genannt. Während dieser erste Schritt ATP-unabhängig abläuft wird für die Anlagerung des U2 snRNP, was zur Formierung des prä-Spleißosoms (A-Komplex) führt, Energie in Form von ATP benötigt. Aus diesem Komplex, der neben den beiden U snRNPs auch zahlreiche

Tabelle 5.1: Protein-Zusammensetzung humaner spleißosomaler U snRNPs. Die Tabelle zeigt die allen U snRNPs gemeinsamen Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F und G sowie die spezifischen Proteine der einzelnen U snRNPs. Apparente Molekulargewichte (appM) sind in kDa angegeben.

	Protein	app.M (kDa)	12S U1	17S U2	14S U4/U6	20S U5	25S U4/U6.U5	Sequenz-motive	
Sm-Proteine	SmB	28	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmB'	29	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmD1	16	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmD2	16.5	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmD3	18	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmE	12	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmF	11	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
	SmG	9	•	•	•	•	•	Sm-Motiv 1 und 2	
LSm-Proteine	LSm2				•			Sm-Motiv 1 und 2	
	LSm3				•			Sm-Motiv 1 und 2	
	LSm4				•			Sm-Motiv 1 und 2	
	LSm5				•			Sm-Motiv 1 und 2	
	LSm6				•			Sm-Motiv 1 und 2	
	LSm7				•			Sm-Motiv 1 und 2	
	LSm8				•			Sm-Motiv 1 und 2	
U1-spezifisch	U1-C		•					Zink-Finger	
	U1-A U1-70K		•					RBD, SR	
U2-spezifisch	U2-A'	31		•				leucinreich	
	U2-B''	28.5		•				RBD	
		15.6		•				-	
		33		•				-	
		35		•				-	
		92		•				-	
	SF3A	SAP60	60		•				Zink-Finger
		SAP62	66		•				Zink-Finger
	SF3B	SAP114	110		•				SURP
		SAP49	53		•				RBD
SAP130		120		•				-	
SAP145		150		•				-	
	SAP155	180		•				-	
U5-spezifisch		220				•	•	DEXD/H	
		200				•	•	G-Domäne	
		116				•	•	-	
		110				•	•	-	
		100				•	•	TPR	
		102				•	•	SR, DEXD/H	
		65				•	•	-	
		40				•	•	WD40	
		27				•	•	SR	
		15				•	•	-	
U4/U6-spezifisch		90			•		•	-	
		61			•		•	WD40	
		60			•		•	Cyclophilin	
		20			•		•	RNA-bindend	
	15.5			•		•			

weitere Proteine enthält, wird in einem weiteren energieabhängigen Schritt unter Eintritt eines vorgeformten [U4/U6.U5]-tri-snRNP der B-Komplex formiert. Im B-Komplex sind alle spleißosomalen U snRNPs enthalten weshalb er auch als reifes Spleißosom bezeichnet wird. Es erfolgen nun wiederum unter ATP-Verbrauch Umlagerungen in diesem Komplex, was zur Freisetzung des U4 bzw. U1 snRNPs und gleichzeitig zur Entstehung des katalytisch aktiven Spleißosoms (C-Komplex) führt. Nach erfolgtem Spleißen werden die Endprodukte, die reife mRNA und das Intron in seiner charakteristischen Lariat-Struktur, freigesetzt und die spleißosomalen Untereinheiten wieder für neue Spleißreaktionen verwendet (zusammengefasst in Burge *et al.* 1999).

5.17 SMNrp ist in nukleären Bereichen zu finden, in denen sowohl Transkription, als auch Spleißen stattfindet

Um einen ersten Hinweis auf die Funktion von SMNrp zu erhalten, wurde die zelluläre Lokalisation des Proteins untersucht. Hierfür wurde zunächst ein polyklonales Antiserum gegen das vollständige SMNrp-Protein hergestellt, welches in Western Blot-Analysen das Protein sowohl im *X. laevis* Oocyten-Extrakt als auch im Kern- und Gesamtzellextrakten von HeLa-Zellen monospezifisch detektierte (Abb.: 5.24, Spuren 1-3).

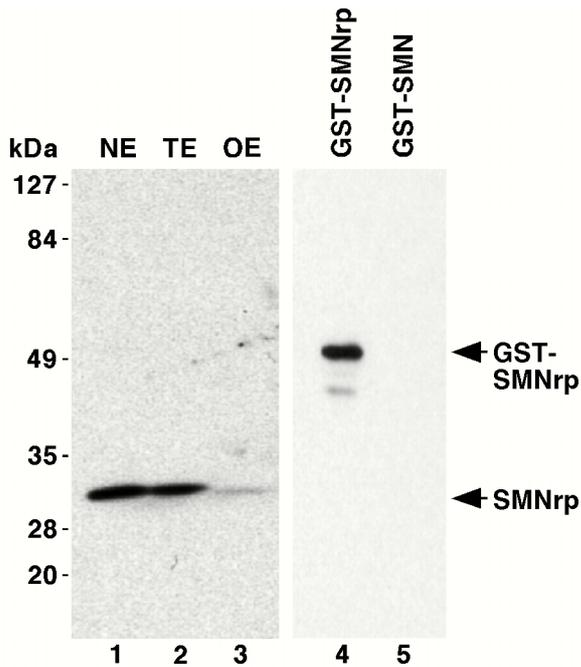


Abbildung 5.24: Das verwendete Antiserum erkennt spezifisch SMNrp in unterschiedlichen Extrakten. Detektion von SMNrp in HeLa-Kernextrakt (NE, Spur 1), Gesamtzellextrakt (TE, Spur 2) und *X.laevis* Oocytenextrakt (OE, Spur 3) durch Western Blotting mit polyklonalen anti-SMNrp Antikörpern. Rekombinantes GST-SMNrp wird ebenfalls durch das anti-SMNrp Antiserum erkannt (Spur 4), wohingegen das homologe SMN nicht detektiert wird (Spur 5).

Das affinitätsgereinigte Antiserum wurde als nächstes für intrazelluläre Lokalisationsstudien durch Immunfluoreszenz herangezogen (Abb.: 5.25A). In COS-1 Zellen wurde das Nukleoplasma dieser Zellen stark angefärbt, wohingegen das Cytosol nur eine geringe Färbung aufwies (Teilabbildung 1). Dieses Färbemuster war sehr spezifisch, da sich das Signal durch die Vorinkubation des Serums mit rekombinatem SMNrp vollständig unterdrücken ließ (Teilabb.: 5). Die Überlagerung der SMN und SMNrp Immunfluoreszenzen zeigte keine signifikante Kolokalisierung der beiden Proteine in der Zelle, wie in Teilabbildung 3 zu sehen ist. Die Lokalisation von SMNrp unterscheidet sich demnach signifikant vom homologen SMN, welches sowohl im Cytosol als auch in nukleären Gems zu detektieren war (Teilabb.: 2). Um detailliertere Erkenntnisse über die subnukleäre Verteilung von SMNrp zu erhalten, wurde SMNrp durch Immunogold-Markierung elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Studien wurden in Zusammenarbeit mit Prof. S. Fakan (Universität Lausanne) durchgeführt (Abb.: 5.25B). In kryofixierten HTC-Zellen lassen sich subnukleäre Regionen wie z.B. Perichromatinfibrillen, Interchromatin-Granula und Nukleoli unterscheiden. Perichromatinfibrillen sind als dunkle Regionen sichtbar und stellen den Ort der Transkription und des Spleißens dar (Spector, 1996). Interchromatin-Granula bestehen dagegen aus kondensiertem Chromatin, und sind als helle Bereiche erkennbar (Spector, 1996). Die mit Goldpartikeln markierten anti-SMNrp Antikörper zeigten eine starke

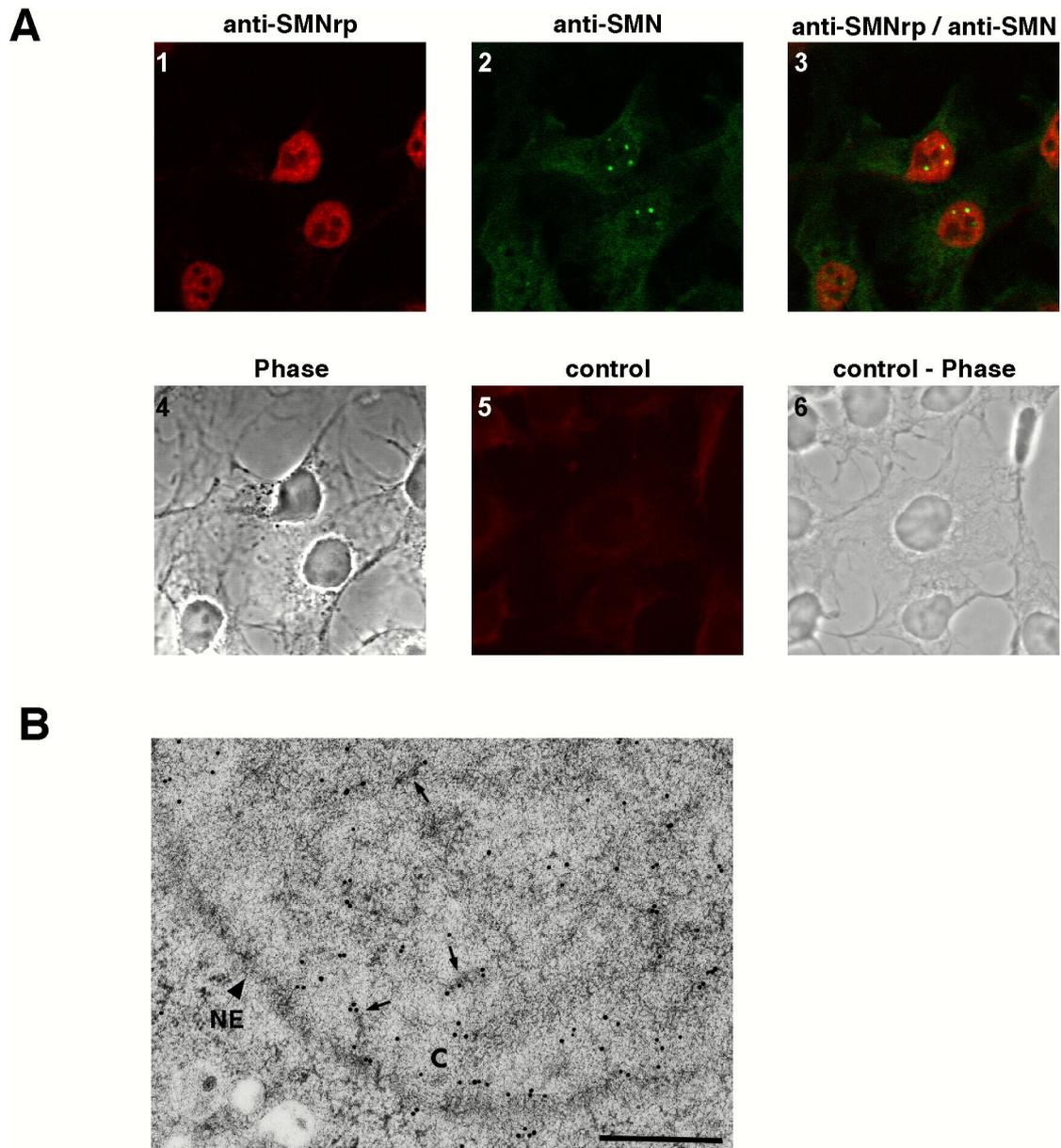


Abbildung 5.25: SMNrp lokalisiert in subnukleären Bereichen, in denen Transkription und Spleißen stattfindet. (A) Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von COS-1-Zellen mit anti-SMNrp (Teilabb.: 1) und anti-SMN (7B10, Teilabb.: 2) Antikörpern. Teilabbildung 3 zeigt die kombinierten Teilabbildungen 1 und 2, Teilabbildung 4 die Phasenkontrastaufnahme dieser Zellen. Teilabbildung 5 zeigt eine Kontrollimmunfluoreszenz, bei der die anti-SMNrp Antikörper mit rekombinantem SMNrp vorinkubiert worden waren und Teilabbildung 6 die zugehörige Phasenkontrastaufnahme. (B) Immunlokalisierung von SMNrp in kryofixierten HTC-Zellen mit Hilfe von Elektronenmikroskopie. Der größte Teil von SMNrp ist mit Perichromatinfibrillen assoziiert (einige sind durch kleine Pfeile gekennzeichnet). Interchromatingranula und kondensiertes Chromatin („C“) sind dagegen nicht markiert. NE bezeichnet die Kernmembran („nuclear envelope“).

Anreicherung in Perichromatinfibrillen, wohingegen die anderen beschriebenen Strukturen nur wenig SMNrp enthielten (Abb.: 5.25B).

Diese Experimente zeigten, dass SMNrp im Zellkern in Perichromatinfibrillen, d.h. an den Orten der Transkription und der Prozessierung von mRNA-Molekülen lokalisiert ist.

5.18 SMNrp ist eine Komponente des 17S U2 snRNPs

Die subnukleäre Lokalisation in Perichromatinfibrillen sowie Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die eine Assoziation mit partiell gereinigten Spleißosomen andeuteten (Neubauer *et al.*, 1998), ließen eine Beteiligung von SMNrp am Spleißprozeß von prä-mRNA Molekülen möglich erscheinen.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurde zunächst untersucht, ob SMNrp mit spleißosomalen U snRNPs assoziiert ist. In der Tat führte die Affinitätschromatographische Aufreinigung von spleißosomalen U snRNPs mit Hilfe einer anti-m⁷G/m₃G-Säule (H₂O, (Bringmann and Luhrmann, 1986)) zur Koreinigung von großen Mengen SMNrp (Abb.: 5.26A, Spur 2). Keines der untersuchten Proteine band dabei an eine Kontrollsäule, an die Antikörper gegen ein nicht verwandtes Protein (GST) gekoppelt waren (Spur 3). Diese Beobachtung lieferte den ersten Hinweis, dass SMNrp mit U snRNPs assoziiert sein könnte.

Um zu überprüfen, ob SMNrp mit einem spezifischen U snRNP-Partikel assoziiert ist, wurde das Sedimentationsverhalten von SMNrp im Kernextrakt analysiert (Abb.: 5.26B). Hierzu wurden zunächst ein Saccharose-Dichtegradient mit Kernextrakt aus HeLa-Zellen beladen und zentrifugiert. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten zeigte die Analyse der U snRNAs der einzelnen Fraktionen, dass das U1 snRNP im 12S Bereich, das U2 snRNP im 17S Bereich und der tri-snRNP im 25S Bereich sedimentierten (Abb.: 5.26B untere Teilabb.). Interessanterweise zeigte eine Western Blot-Analyse der einzelnen Fraktionen, dass SMNrp primär in drei Bereichen des Gradienten zu finden ist: < 6S, 17S und > 30S (obere Teilabb.). Wiederholungen dieser Sedimentationsanalysen ließen erkennen, dass die Menge von SMNrp im Bereich von 17S je nach Extraktpräparation 20-80% der Gesamtmenge umfasste (nicht gezeigt).

Die Sedimentation von SMNrp im 17S Bereich warf die Frage auf, ob SMNrp mit dem U2 snRNP assoziiert sein könnte, welches ebenfalls in dieser Region des Gradienten zu finden ist (Abb.: 5.26B, vergleiche obere und untere Teilabb.). Um dies zu beantworten, wurde aus den Fraktionen 12 und 13 SMNrp immunpräzipitiert und die koimmunpräzipitierte U snRNA durch [³²P]-pCp am 3'-Ende markiert. Wie in Abb.: 5.27 zu sehen ist, wurde spezifisch das U2 snRNP, zusammen mit SMNrp, effizient kopräzipitiert, während die anderen U snRNAs

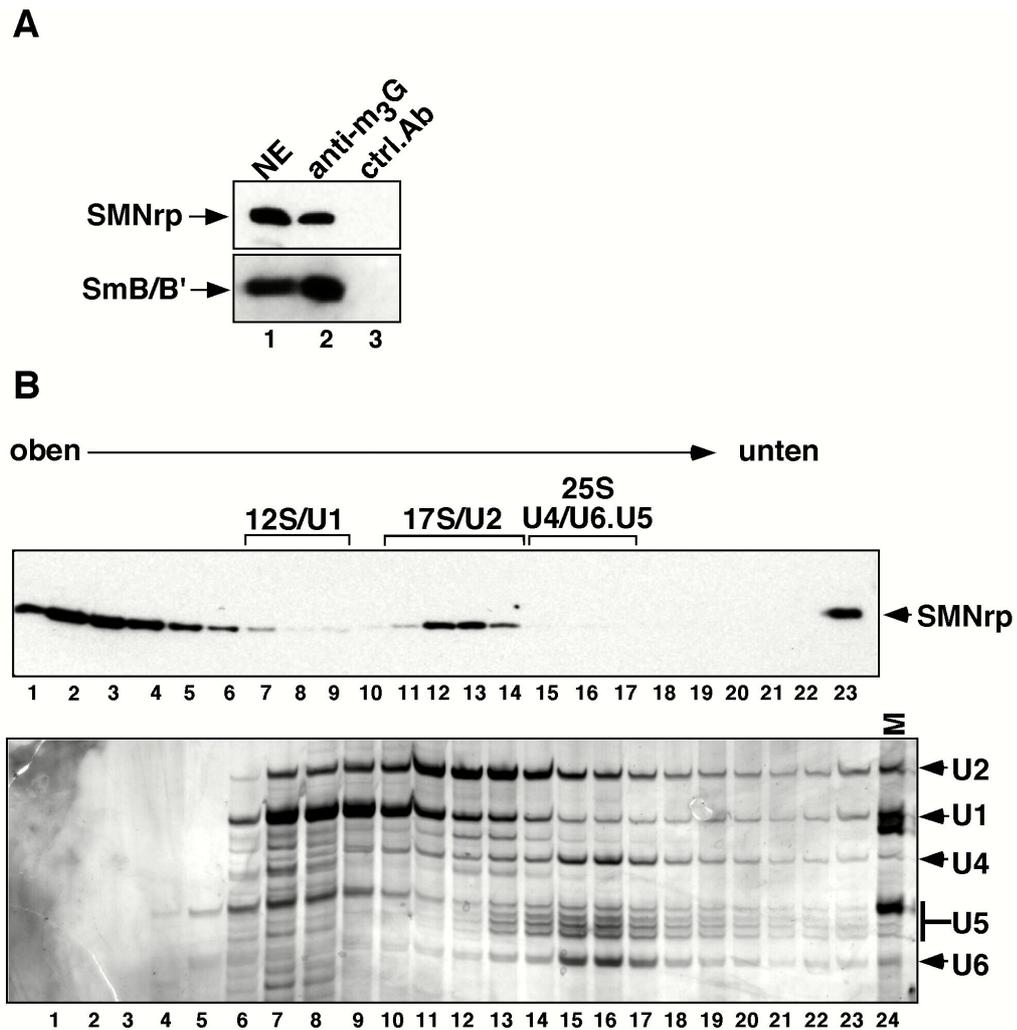


Abbildung 5.26: SMNrp ist mit dem U2 snRNP assoziiert. (A) Eine anti-m₃G/m⁷G (H20, Spur 2) bzw. eine Kontroll-Affinitätssäule (anti-GST, Spur 3) wurde mit HeLa-Kernextrakt beladen und durch Western Blotting analysiert. Spur 1 zeigt 5% des eingesetzten Kernextraktes. SMNrp wurde durch polyklonale SMNrp-Antikörper (obere Teilabb.) und SmB/B' durch den monoklonalen anti-Sm-Antikörper Y12 (untere Teilabb.) detektiert. (B) Sedimentationsanalyse von SMNrp in nukleärem HeLa-Extrakt mit Hilfe eines linearen, 15-45%igen Saccharose-Gradienten. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch Western Blotting mit anti-SMNrp Antikörpern analysiert (obere Teilabb.). In der unteren Teilabbildung sind die RNAs der einzelnen Fraktionen durch Silber-Färbung sichtbar gemacht.

nur in geringen Mengen im Eluat detektiert werden konnten (Spur 4). Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass SMNrp mit dem 17S U2 snRNP in nukleären Extrakten assoziiert vorliegt.

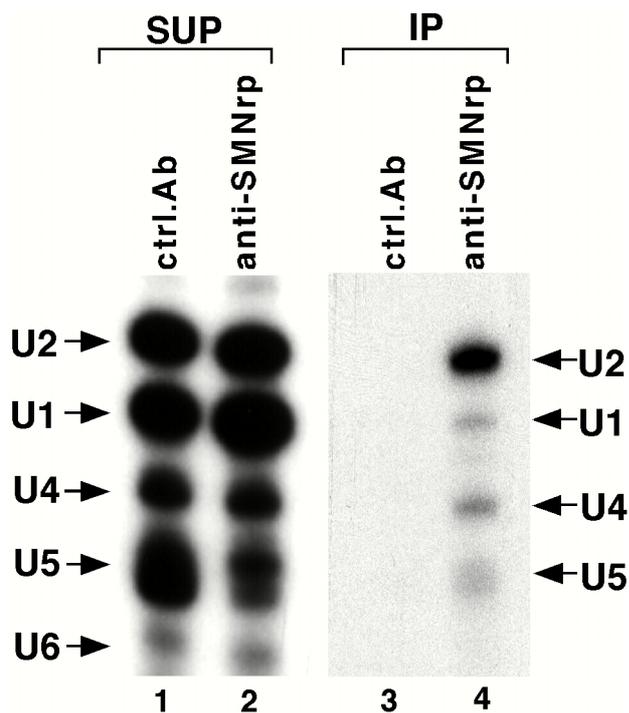


Abbildung 5.27: Anti-SMNrp Antikörper ko-präzipitieren den U2 snRNP. Die im 17S-Bereich liegenden Fraktionen wurden zusammengefasst und entweder mit anti-SMNrp Antikörper (Spur 4) oder Antikörper gegen ein nicht verwandtes Protein (anti-GST, Spur 3) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten U snRNAs (Spuren 3 und 4) sowie 25% der jeweiligen Überstände wurden (Spuren 1 und 2) wurden mit [32 P]-pCp markiert und durch denaturierende Gelelektrophorese analysiert.

5.19 SMNrp ist mit den spleißosomalen Komplexen A und B assoziiert

Studien von Hodges und Beggs haben gezeigt, dass das 17S U2 snRNP während des Spleißprozesses direkt in das Spleißosom eingebaut wird, während eine andere Form, das sogenannte 12S U2-Partikel, welches ebenfalls in Kernextrakten detektiert werden kann, sehr wahrscheinlich ein Zusammenlagerungsintermediat des 17S U2-Partikels darstellt (Hodges and Beggs, 1994). Es stellte sich die Frage, ob SMNrp als Komponente des 17S U2 snRNP ebenfalls in spezifischen spleißosomalen Komplexen zu detektieren ist. Die Zusammenlagerung des Spleißosoms bis hin zum katalytisch aktiven C-Komplex wurde dabei durch native Gelelektrophorese analysiert (Abb.: 5.28). Hierzu wurde HeLa Kernextrakt mit einer radioaktiv markierten prä-mRNA (pAD48; (Fischer *et al.*, 1995) inkubiert und anschließend durch native Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese Komplexe wurden dann durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb.: 5.28, Spuren 1-3). Um festzustellen, ob SMNrp mit spleißosomalen Komplexen assoziiert ist, wurde diese Membran mit anti-SMNrp Antikörpern inkubiert. Wie in Abbildung 5.28 zu sehen ist, ließ sich SMNrp in den spleißosomalen Komplexen A und B, nicht aber in den Komplexen H und C detektiert (Spuren 4-6). SMNrp war somit genau in den spleißosomalen Komplexen zu finden, in denen auch das U2 snRNP

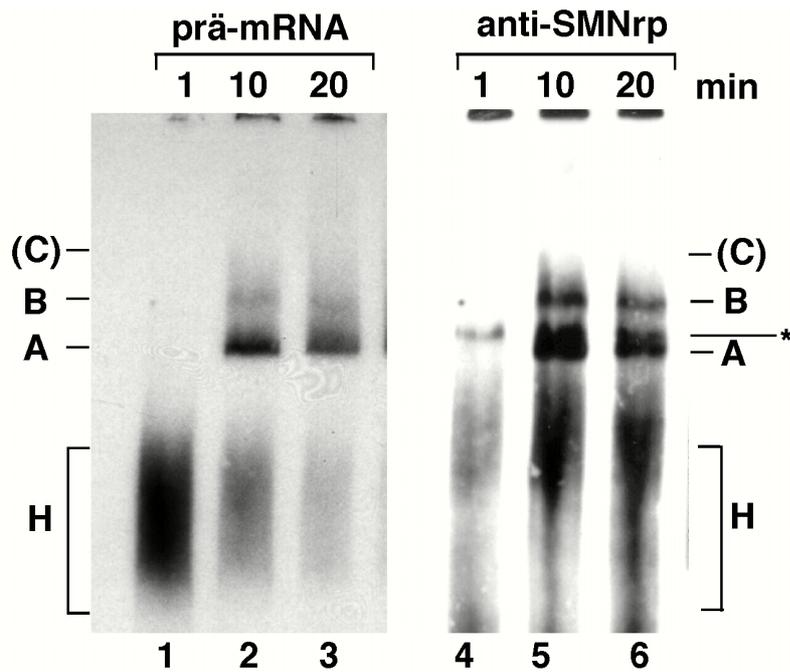


Abbildung 5.28: SMNrp ist mit den präsplicing Komplexen A und B assoziiert. Radioaktiv markierte pAD48 prä-mRNA (Fischer *et al.* 1995) wurde während der angegebenen Zeiträume mit HeLa-Kernextrakt inkubiert und die präsplicing Komplexe anschließend durch native Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und die präsplicing Komplexen durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Spuren 1-3). Der C-Komplex ist sehr instabil und daher nur nach langen Expositionszeiten sichtbar. Um SMNrp zu detektieren, wurde die gleiche Membran mit anti-SMNrp Antikörpern inkubiert (Spuren 4-6). Die mit einem Stern gekennzeichnete Bande stellt einen bislang unbekanntem, SMNrp-spezifischen Komplex dar, der keine radioaktiv markierte RNA enthält.

während der Zusammenlagerung des Spleißosoms detektiert werden kann. Darüber hinaus wurde ein weiterer Komplex identifiziert, dessen Ursprung aber im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte (Spuren 5 und 6). Diese Daten legen daher die Schlussfolgerung nahe, dass SMNrp zusammen mit dem U2 snRNP in das Spleißosom integriert wird.

5.20 SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor

Die Assoziation mit dem 17S U2 snRNP und die Inkorporation in distinkte spleißosomale Komplexe ließ eine Rolle von SMNrp beim Spleißprozess möglich erscheinen. Diese Möglichkeit wurde durch die Analyse des Spleißprozesses *in vitro* getestet. Hierzu wurde eine radioaktiv markierte prä-mRNA mit nukleärem Extrakt unter definierten Bedingungen inkubiert und die Spleißreaktion anschließend durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese analysiert. In einem initialen Experiment wurde getestet, ob steigende Mengen an gereinigtem

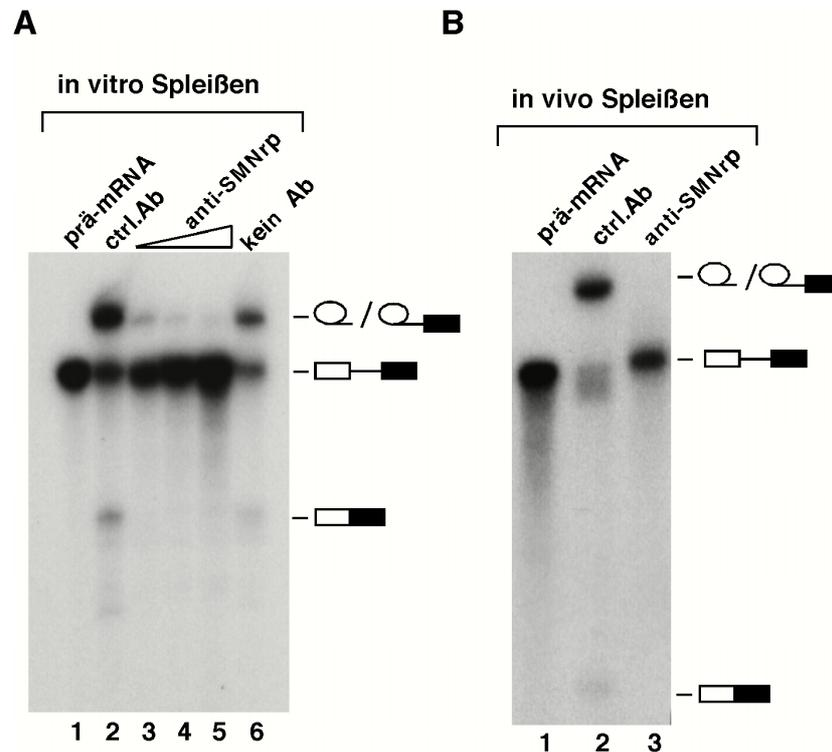


Abbildung 5.29: Anti-SMNrp Antikörper inhibieren das Spleißen von prä-mRNA Molekülen *in vitro* und *in vivo*. (A) Die *in vitro* Spleißreaktionen wurde zunächst für 30 min mit 5µg Kontroll-Antikörper (Spur 2) bzw. 1, 3 oder 5µg affinitätsgereinigten anti-SMNrp Antikörpern (Spuren 3-5) vorinkubiert. Anschließend wurde [³²P]-markierte pAD48 prä-mRNA dazugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die mRNA-Intermediate wurde dann durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie analysiert. Spur 6 zeigt eine Spleißreaktion ohne Antikörper, Spur 1 die prä-mRNA. (B) Spleißinhibition durch anti-SMNrp Antikörper *in vivo*. [³²P]-markierte pAD48 prä-mRNA wurde in *X.laevis* Oocytenkerne injiziert, die zuvor entweder mit 200ng Kontroll-Antikörper (Spur 2) oder anti-SMNrp Antikörpern (Spur 3) injiziert worden waren. Nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA aus den Kernen extrahiert und wie in (A) beschrieben analysiert.

anti-SMNrp Antiserum die Spleißreaktion inhibieren können. Wie in Abbildung 5.29A zu sehen ist, wurde die prä-mRNA im unbehandelten Kernextrakt gespleißt, was durch das Entstehen des Intron-Lariats und der gespleißten mRNA zu erkennen ist (Spur 6). Das Lariat-Exon-Intermediat, das im ersten Schritt des Spleißprozesses entsteht, wandert im verwendeten Gelsystem mit dem Lariat und konnte somit nicht als separate Bande erkannt werden (Fischer *et al.*, 1995). Interessanterweise wurde durch die Zugabe von anti-SMNrp Antikörpern, nicht aber durch Kontroll-Antikörper (anti-GST), die Spleißreaktion stark inhibiert, was durch das Fehlen der Spleißintermediate zu erkennen ist (Spuren 2-5).

Diese Antikörperinhibitionsstudien konnten auch *in vivo* mit Hilfe des *X. laevis* Oocytensystems bestätigt werden. Dazu wurde die [³²P]-markierte prä-mRNA in die Kerne der Oocyten injiziert, die eine Stunde zuvor mit anti-SMNrp bzw. Kontroll-Antikörpern (anti-GST) prä-injiziert worden waren. Wie in Abbildung 5.29B zu erkennen ist, führte die

Injektion von anti-SMNrp Antikörpern auch in diesem System zur vollständigen Inhibition der Spleißreaktion (Spur 3). Die hier dargestellten Antikörperinhibitionsstudien lieferten einen ersten Hinweis, dass SMNrp *in vitro* am Spleißprozess direkt beteiligt sein könnte.

Antikörperinhibitionsstudien liefern keinen direkten Beweis einer Beteiligung des betreffenden Proteins am Spleißprozess, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass nur eine indirekte Inhibition, zum Beispiel durch eine sterische Behinderung anderer Proteine während der Spleißreaktion, stattfindet. Um dieses Szenario auszuschließen wurden *in vitro* Spleißexperimente mit Kernextrakten, aus denen durch Immunodepletion spezifisch SMNrp entfernt wurde, durchgeführt (Abb.: 5.30). Anti-SMNrp bzw. Kontrollantikörper wurden dafür an eine Protein-G-Säulenmatrix gebunden und anschließend mit HeLa-Kernextrakt inkubiert. Die Menge des im Durchlauf verbleibenden SMNrps wurde anschließend durch Western Blot-Analysen untersucht. Wie in Abbildung 5.30A zu sehen ist, wurden auf diese Weise etwa 95% der endogenen SMNrp-Proteinmenge entfernt (Spuren 3 und 4), wohingegen die Menge des homologen SMN-Proteins (oder anderer Kontrollproteine) unverändert blieb (vergleiche obere und untere Teilabb. und nicht gezeigt). Die Menge von SMNrp blieb im Extrakt, der mit Kontroll-Antikörpern behandelt wurde, dagegen konstant (Spuren 1 und 2). Interessanterweise konnte nach Inkubation einer radioaktiv markierten prä-mRNA mit SMNrp-depletierten Extrakt kein Spleißintermediat detektiert werden, wohingegen im Kontroll-depletierten und im unbehandelten Extrakt die entsprechenden Spleiß-Intermediate zu erkennen waren (Abb.: 5.30B, Spuren 1-3 und 5). Das spezifische Entfernen von SMNrp, geht demnach mit einer Inhibition der Spleißreaktion vor der ersten Transesterifizierungsreaktion einher.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Spleißaktivität des SMNrp-depletierten Extraktes durch die Zugabe von rekombinantem SMNrp wiederhergestellt werden kann. Hierzu wurde der SMNrp depletierte Extrakt vor der Zugabe der radioaktiv markierten prä-mRNA mit rekombinantem, bakteriell exprimiertem SMNrp oder einer äquivalenten Menge Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert (Abb.: 5.30B). Bemerkenswerterweise konnte die Spleißaktivität durch die Zugabe des bakteriell exprimierten SMNrps partiell rekonstituiert werden, wohingegen die Zugabe von BSA keinen Effekt hatte (Spuren 6-8). Diese Daten definieren SMNrp als einen neuen essentiellen Spleißfaktor, der sehr wahrscheinlich im Kontext des 17S U2 snRNPs am Spleißprozess beteiligt ist.

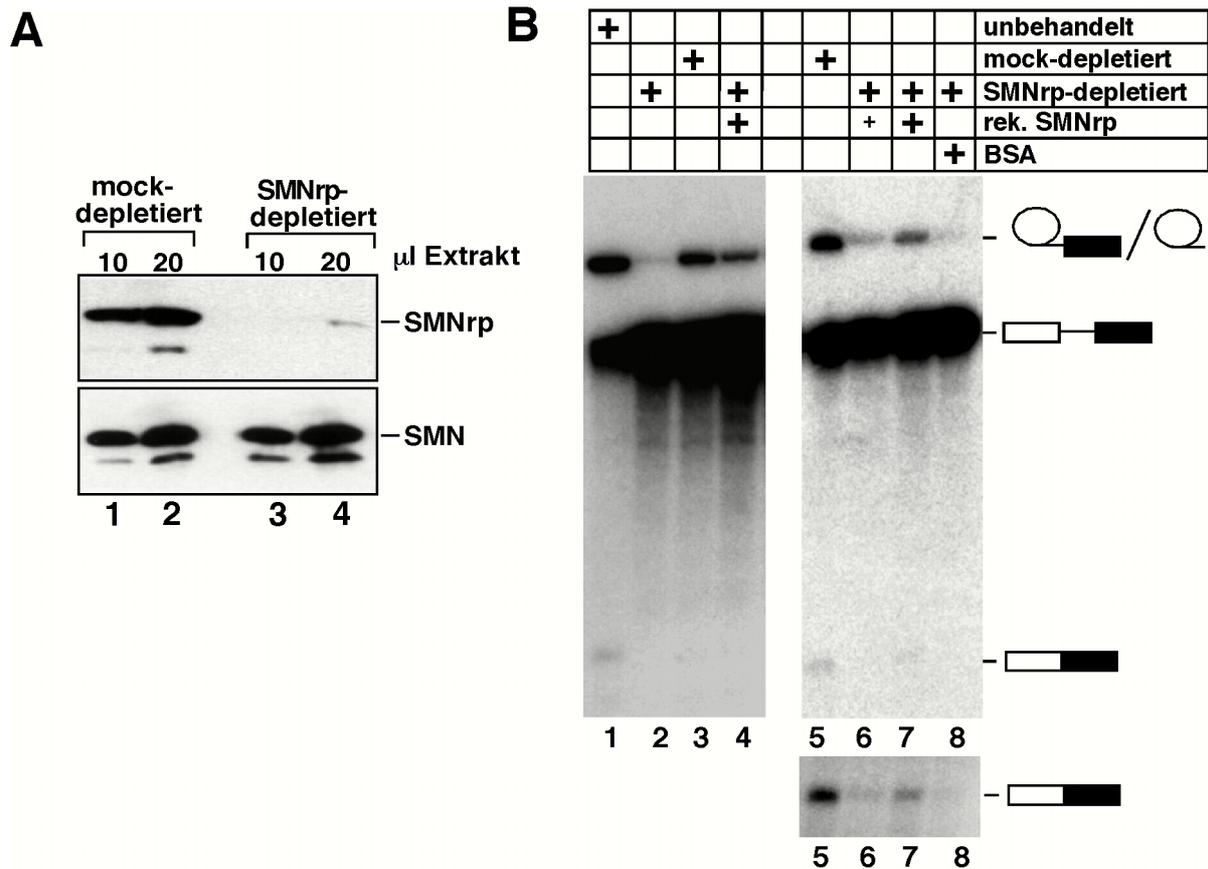


Abbildung 5.30: SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor. (A) Western blot-Analyse von SMNrp (obere Teilabb.) und SMN (untere Teilabb.) in Kontroll-depletierten (Spuren 1 und 2) oder SMNrp-depletierten (Spuren 3 und 4) Kernextrakten. (B) Rekonstitution der Spleißreaktion in SMNrp-depletiertem Kernextrakt durch rekombinantes SMNrp. SMNrp-depletierter (Spuren 2, 4 und 6-8), Kontroll-depletierter (Spuren 3 und 5) und unbehandelter (Spur 1) Kernextrakt wurde für die *in vitro* Spleißreaktionen verwendet. Zu den Reaktionen wurden entweder 1 (Spuren 4 und 6) bzw. 5 µg (Spur 7) rekombinantes SMNrp oder 5 µg BSA (Spur 8) gegeben. Um die gespleißte prä-mRNA besser erkennen zu können, ist der untere Teil der Autoradiographie in einer längeren Exposition dargestellt (Spuren 5-8).

5.21 SMNrp ist für die Ausbildung des funktionellen Spleißosoms notwendig

Es stellte sich als nächstes die Frage nach der genauen Funktion von SMNrp während des Spleißprozesses. SMNrp könnte direkt an der Katalyse der Spleißreaktion beteiligt, oder bereits für die Zusammenlagerung des Spleißosoms wichtig sein. Letzteres Szenario kann durch die Analyse der Spleißosomenzusammenlagerung in nativen Gelsystemen eingehend untersucht werden (Abb.: 5.31). Dazu wurde SMNrp- bzw. Kontroll-depletierter Kernextrakt mit radioaktiver prä-mRNA inkubiert und anschließend durch native Gelelektrophorese analysiert. Wie in Abbildung 5.31 zu sehen ist, konnten im Kontroll-depletierten Extrakt der prä-spleißosomale H-Komplex sowie im zeitlichen Verlauf die Komplexe A, B und C

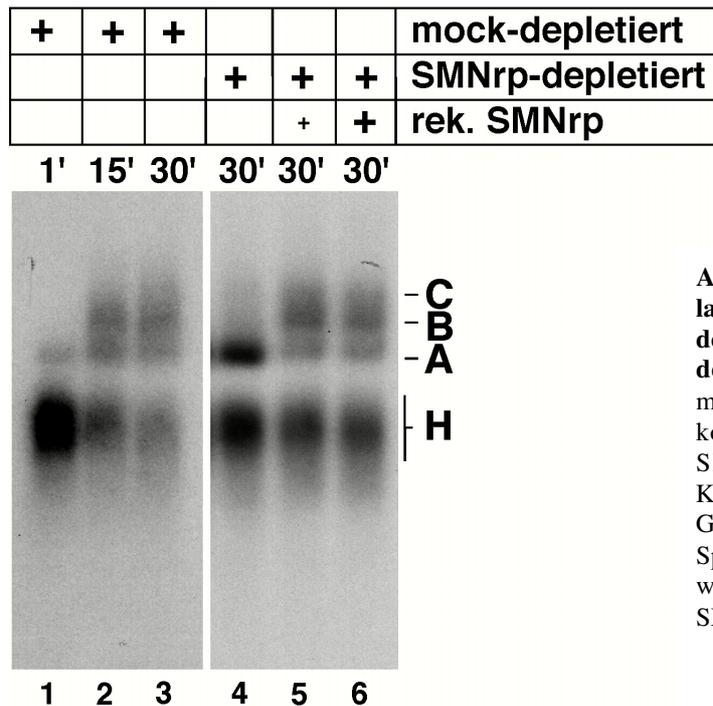


Abbildung 5.31: Die Zusammenlagerung des Spleißosoms ist im SMNrp-depletiertem Kernextrakt auf der Stufe des A-Komplexes arretiert. (A) [³²P]-markierte pAD48 prä-mRNA wurde mit kontroll-depletiertem (Spuren 1-3) oder SMNrp-depletiertem (Spuren 4-6) Kernextrakt inkubiert und durch native Gelelektrophorese analysiert. Die in den Spuren 5 und 6 gezeigten Spleißreaktionen wurden mit 1.5 bzw. 3µg rekombinatem SMNrp komplementiert.

ausgebildet werden (Spuren 1-3). Interessanterweise war im SMNrp-depletierten Extrakt zwar der Schritt vom Komplex H zum Komplex A zu beobachten, die folgenden Schritte waren aber nahezu vollständig blockiert (Spur 4).

Die Inhibition der Zusammenlagerung des Spleißosoms war äußerst spezifisch und nur auf das Fehlen von SMNrp zurückzuführen, da durch die Zugabe von bakteriell exprimiertem SMNrp zum SMNrp-depletierten Extrakt sowohl die Inkorporation in das 17S U2 snRNP (Abb.: 5.32, untere Teilabb.) als auch die Ausbildung der Komplexe B and C in diesem Extrakt beobachtet werden konnten (Abb.: 5.31, Spuren 5 und 6).

Die in diesem Abschnitt erhaltenen Resultate zeigten daher, dass SMNrp, als Komponente des 17S U2 snRNPs, essentiell für die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms (B-Komplex) ist.

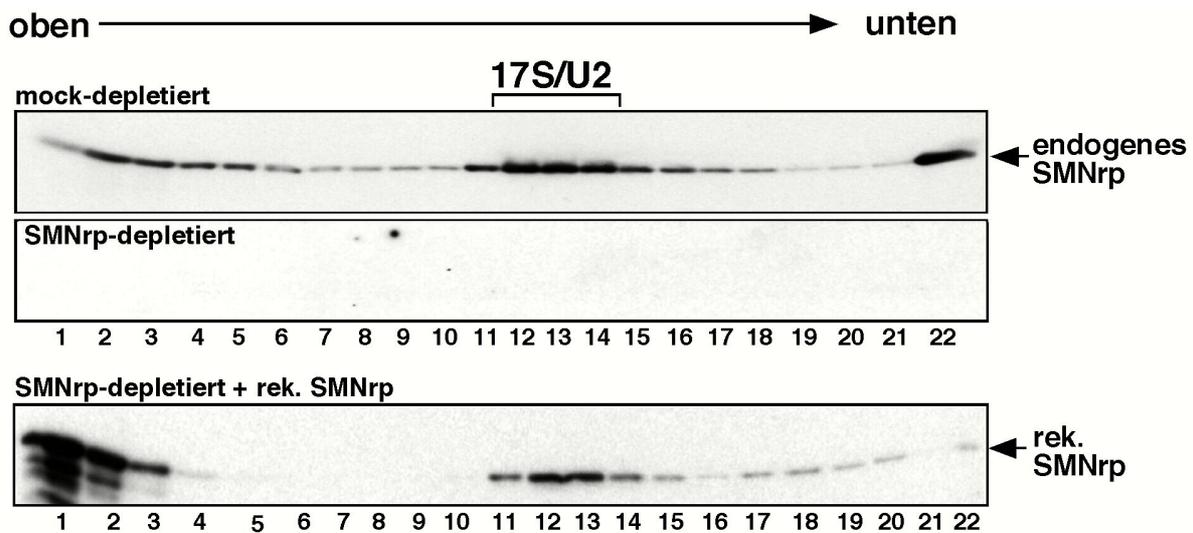


Abbildung 5.32: Rekombinantes SMNrp wird in SMNrp-depletiertem Kernextrakt in das U2 snRNP integriert. Kontroll-depletierter (obere Teilabb.), SMNrp-depletierter (mittlere Teilabb.) oder SMNrp-depletierter Kernextrakt, der mit rekombinantem His-SMNrp komplementiert worden war (untere Teilabb.) wurde durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und durch Western Blotting mit anti-SMNrp Antikörpern analysiert.

5.22 Zwei Domänen von SMNrp vermitteln essentielle Schritte bei der Zusammenlagerung des Spleißosoms

Ziel der folgenden Untersuchungen war es nun einzelne Sequenzabschnitte von SMNrp zu definieren, die für die 17S U2 snRNP-Assoziation bzw. die Spleißosomenausbildung notwendig sind. Sequenzvergleiche zwischen dem humanen SMNrp und dem putativen Ortholog in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* zeigten, dass der N-terminale Bereich und die Tudor-Domäne evolutionär hoch konserviert sind (Abb.: 5.33) und deshalb sehr wahrscheinlich essentielle Funktionen während des Spleißprozesses erfüllen. Um diese Hypothese zu testen wurden zwei anti-SMNrp-Antiseren hergestellt, die entweder spezifisch den N-Terminus (anti-SMNrp(N)), oder die Tudor-Domäne (anti-Tu) erkannten (Abb.: 5.35). Keines dieser Antiseren kreuzreagierte mit dem homologen SMN-Protein oder einem anderen Protein im HeLa-Kernextrakt (Spuren 1-8), was deren Einsatz für die Analyse des Spleißprozesses ermöglichte. Beide Antiseren inhibierten den ersten Schritt der Spleißreaktion (Spuren 1 und 3), wohingegen Kontrollantikörper gegen ein nicht verwandtes Protein (anti-GST) keinen Effekt auf die Spleißreaktion hatten (Spur 2 und 4). Diese Ergebnisse deuteten an, dass sowohl der N-Terminus als auch die Tudor-Domäne für die Funktion von SMNrp während der Spleißreaktion wichtig sind.

HsSMNrp	1	MSEDLAKQLASVKAQLQOQVEAALSNGNENEDLLKLLKKDLQEVTELETKDIL	50
SpSMNrp	1	MEKELEEFYKSQALAVQISLQKTPQNEELQLENDLKEELISLLENL	46
HsSMNrp	51	S---TOPSETLASSDS----FASTPPTH-SWKVGDKCMANW-SEGDGCYE	91
SpSMNrp	47	QESVENDKNLTFONSQNGVAGFNTSKPVHIDFTPENLVMARWVSGDYLFYP	96
HsSMNrp	92	AETEEID--EENGTAATTFAGYGNAEVTPLLNLKPVEEGRKAKEDSGNKP	139
SpSMNrp	97	SRLTAVSGFGANKKYTVQFLDYPDIETVSLKHLKAMPE-EKROEIEGNKE	145
HsSMNrp	140	MSKKEMIAQOREYKKKKALKKAQRILKELEQEREDQKVKWQOFNNRAYSKN	189
SpSMNrp	146	ILKKSTTIRSTPVRP---TKAISVASMSTSPSN-----YASRASSPD	185
HsSMNrp	190	KKGQVKRSIFASPE-SVTGKVG----VGTCGIADKPMTOYQDTSKYNVRH	234
SpSMNrp	186	MKSSAAVTANVSPIONVAQHVSTLPKISPIPPSNPPVPVSVSYSQKQKQ	235
HsSMNrp	235	LMPQ	238
SpSMNrp	236	LKPKAALEASQNSWKQFAARGVKTGRVGRKKIGESSIFKSTEDFPGRTN	285
SpSMNrp	286	PKNFGWVARSGHREKHIYNYREDEDS	311

Abbildung 5.33: Das humane (HsSMNrp) und das *S.pombe* (SpSMNrp) sind im Bereich der Tudor-Domäne und des N-Terminus homolog. Vergleich der Aminosäuren des human und des *S.pombe* SMNrp mit dem GAP (Genetics Computer Group) Computer-Programm. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäuren mit grauer Hintergrundfarbe dargestellt.

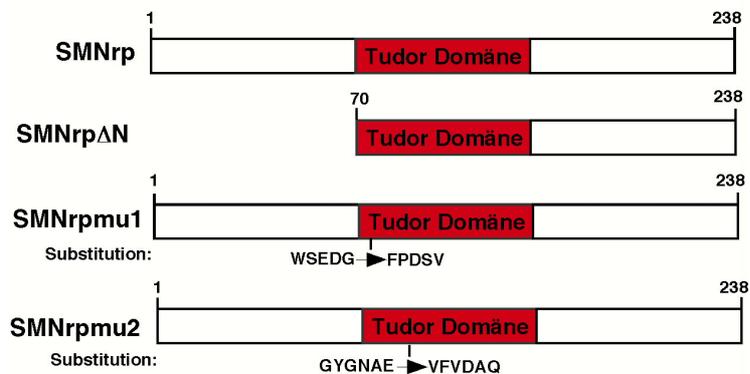


Abbildung 5.34: Mutierte SMNrp-Varianten. Bei SMNrpΔN wurde der N-Terminus deletiert, während SMNrpmu1 und SMNrpmu2 durch Aminosäuresubstitution hergestellt wurden.

Um nun genauere Einsicht in die Funktionsweise dieser Domänen zu erhalten, wurden verschiedene Mutanten von SMNrp hergestellt (Abb.: 5.34) und untersucht, ob sie die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms (B-Komplex) im SMNrp-depletierten Extrakt wiederherstellen können (Abb.: 5.36A). Die Deletion des N-Terminus (Aminosäuren 1-70; SMNrpΔN), sowie Aminosäuresubstitutionen der konservierten Aminosäuren 83-87 (SMNrpmu1) und 110-115 (SMNrpmu2) der Tudor-Domäne wurden hierfür herangezogen. Interessanterweise konnte, im Gegensatz zur Wildtyp-Form des Proteins, keine der Mutanten

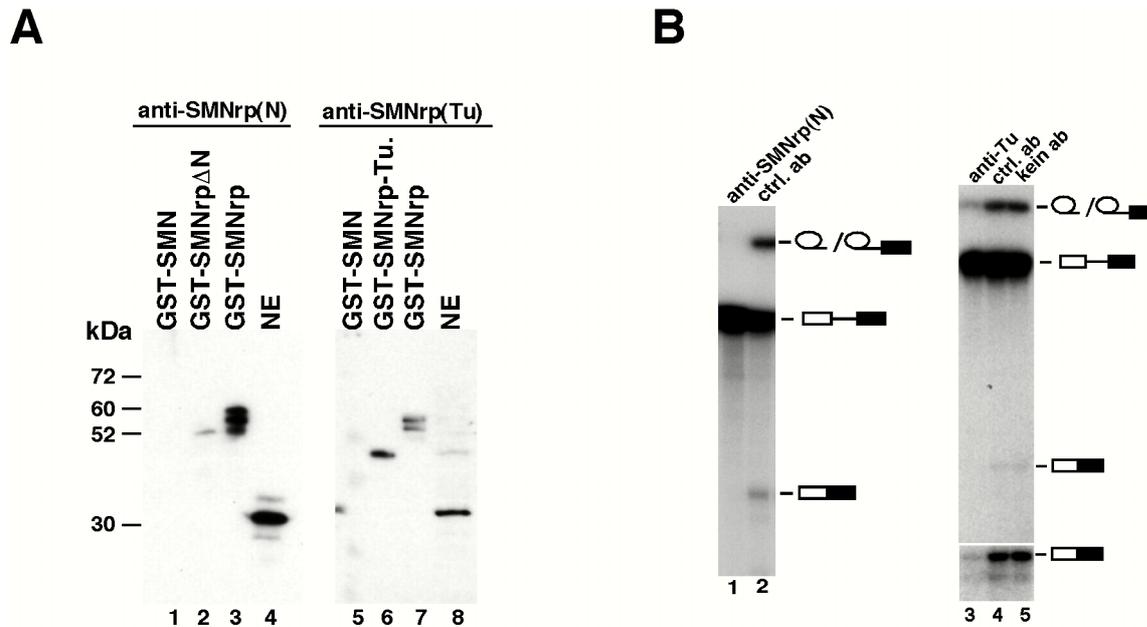


Abbildung 5.35: Antikörper gegen den N-Terminus und die Tudor-Domäne von SMNrp inhibieren die Spleißreaktion in vitro. (A) Western blot Analysen mit Antikörpern gegen den N-Terminus (Spuren 1-4) und die Tudor-Domäne (Spuren 5-8) von SMNrp. Rekombinantes GST-SMN (Spuren 1 und 5), GST-SMNrp (Spuren 3 und 7), GST-SMNrp, dem der N-Terminus fehlte (GST-SMNrp Δ N, Spur 2), die mit GST fusionierte Tudor-Domäne von SMNrp (GST-SMNrp-Tu., Spur 6) sowie HeLa-Kernextrakt (Spuren 4 und 8) wurden zur Spezifitätsuntersuchung der Antikörper herangezogen. (B) Antikörper gegen den N-Terminus oder die Tudor-Domäne von SMNrp interferieren mit der Spleißreaktion. HeLa-Kernextrakt wurde mit Puffer (Spur 5), mit Antikörpern gegen den N-Terminus (Spur 1), die Tudor-Domäne (Spur 3) oder gegen ein nicht verwandtes Protein (Spuren 2 und 4) inkubiert. Die Spleißreaktion wurde wie in vorangegangenen Abbildungen analysiert. Um das gespleißte Produkt besser erkennen zu können, ist der untere Teil der Autoradiographie in einer längeren Exposition dargestellt.

die Ausbildung des funktionellen Spleißosoms im SMNrp-depletierten Extrakt vermitteln (Abb.: 5.36A, Spuren 5, 6 und 8). Darüber hinaus verhielten sich die Proteine SMNrp Δ N und SMNrpmu1 dominant negativen gegenüber dem endogenen SMNrp, wenn sie im Überschuß zu nicht behandeltem Kernextrakt gegeben wurden (Abb.: 5.36B, Spuren 2 und 3). Es ist daher zu vermuten, dass sowohl der N-terminale Bereich, als auch die Tudor-Domäne von SMNrp essentielle Interaktionen während des Spleißprozesses vermitteln bzw. ermöglichen. Da SMNrp mit dem U2 snRNPs assoziiert ist und dadurch ins Spleißosom integriert wird stellte sich die Frage, ob die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Mutationen mit einer veränderten Wechselwirkung von SMNrp mit dem U2 snRNP einhergehen. Um dies zu beantworten wurden Sedimentationsanalysen mit den oben beschriebenen mutierten SMNrp-Proteinen durchgeführt. SMNrp-depletierter Kernextrakt, der entweder mit rekombinantem SMNrp, SMNrp Δ N oder SMNrpmu1 vor der Zentrifugation inkubiert wurde, diente hierfür als Grundlage (Abb.: 5.37). Nur ein sehr schwaches SMNrp-Signal konnte dabei im SMNrp-

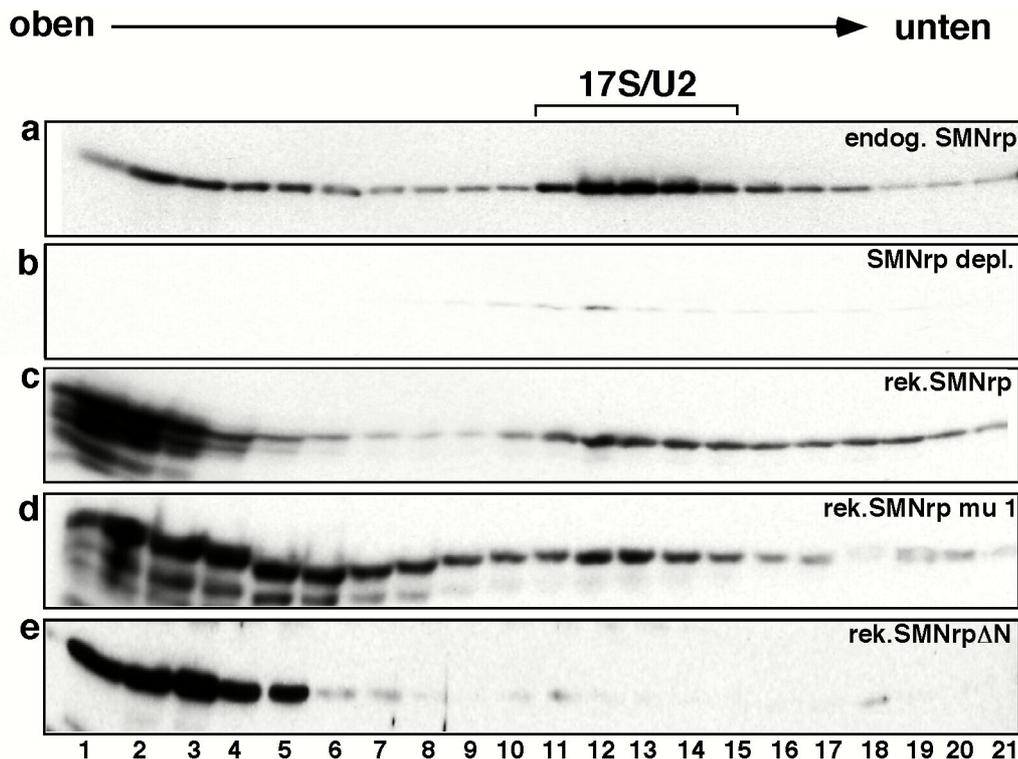


Abbildung 5.37: Interaktionsanalysen von SMNrp-Mutanten mit dem 17S U2 snRNP. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von SMNrp-depletiertem Kernextrakt, der mit Puffer (Teilabb.: B), mit 0.5µg rekombinatem SMNrp (Teilabb.: C), SMNrpmu1 (Teilabb.: D) oder SMNrpΔN (Teilabb.: E) komplementiert wurde. In Teilabbildung A ist die Zentrifugation des Kontroll-depletierten Extrakte dargestellt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und SMNrp durch Western Blotting mit anti-SMNrp Antikörpern analysiert.

ist und die Tudor-Domäne über deren Funktion bislang noch keine Aussagen getroffen werden können.

5.23 Assoziation von SMNrp mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP *in vitro*

Die Transition vom spleißosomalen Komplex A zum Komplex B ist durch die Rekrutierung des [U4/U6.U5]-tri-snRNPs gekennzeichnet. Aufgrund der essentiellen Funktion von SMNrp in diesem Schritt schien es denkbar, dass SMNrp neben der Interaktion mit dem 17S U2 snRNPs auch mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP wechselwirken kann. Eine solche Interaktion müßte jedoch sehr schwach bzw. transient sein, da Dichtegradientenzentrifugationen keine stabile Assoziation zwischen SMNrp und dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP gezeigt haben (siehe Abb.: 5.26). Um einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen SMNrp und dem tri-snRNP zu erhalten, wurden Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt (Abb.: 5.38). Hierzu wurde GST-SMNrp an Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend

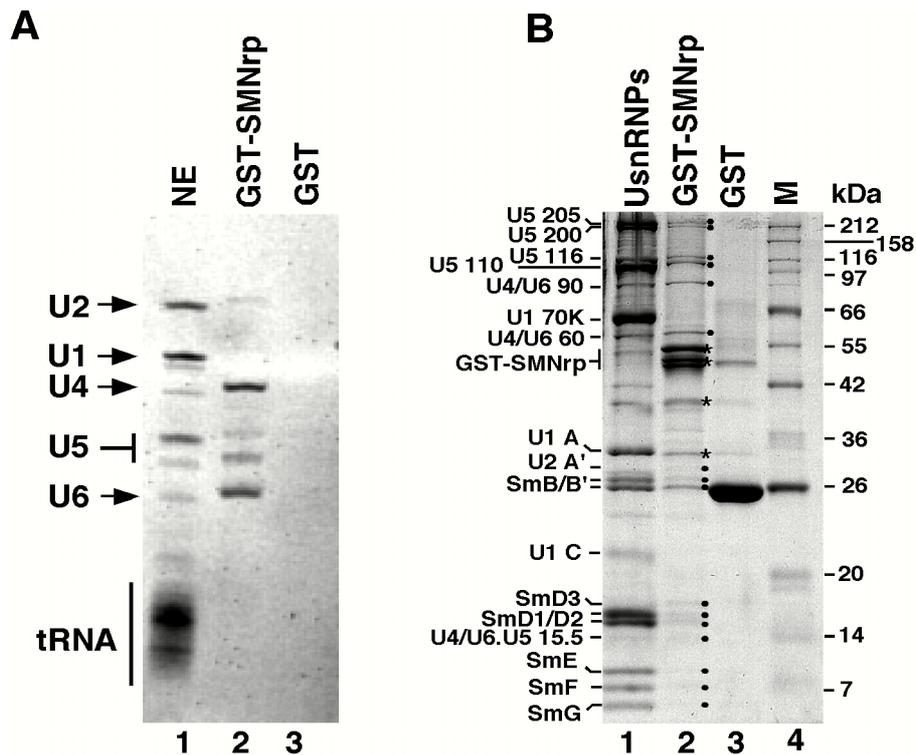


Abbildung 5.38: Rekombinantes SMNrp interagiert sowohl mit dem U2 snRNP als auch mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP *in vitro*. (A) GST-SMNrp oder GST alleine wurde durch Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit HeLa-Kernextrakt inkubiert. Die RNAs vom Kernextrakt (Spur 1), von der GST-SMNrp-Säule (Spur 2) und der GST-Säule (Spur 3) wurden extrahiert, durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. (B) Protein-Komponenten der in (A) dargestellten Elutionen (Spuren 2 und 3). Proteine von gereinigten U snRNPs sind in Spur 1 dargestellt. Spur 4 zeigt einen Molekulargewichts-Marker.

mit spleißaktivem Kernextrakt inkubiert. Die gebundenen U snRNPs wurden mit Glutathion eluiert, und anschließend entweder durch RNA-Gelelektrophorese oder SDS-PAGE analysiert. Interessanterweise konnten neben der U2 snRNA auch die U4, U5, U6 snRNAs im Eluat detektiert werden (Abb.: 5.38A, Spur 2). Diese Interaktion war sehr spezifisch, da zum einen keine signifikanten Mengen an U1 snRNP, dem abundantesten U snRNP im Kernextrakt, gefunden wurden und zum anderen in einer Kontrollbindungsstudie an GST alleine keine U snRNAs zu finden waren (Spuren 2 und 3). Neben den eluierten U snRNAs enthielt das Eluat spezifische U snRNP-Proteine, die als die U5 spezifische Proteine 220, 200, 116 und 110 kDa, die U4/U6 spezifische Proteine 90 und 60 kDa, das [U4/U6.U5]-tri-snRNP spezifische Protein 15,5 kDa, das U2 spezifische Protein A' sowie alle Sm-Proteine (B/B', D1, D2, D3, E, F, und G) identifiziert wurden (Abb.: 5.38B, Spur 2). Das Ergebnis dieses *in vitro* Bindungsexperimentes lieferte den ersten Hinweis, dass SMNrp nicht nur mit dem U2 snRNP sondern auch mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP wechselwirken kann.

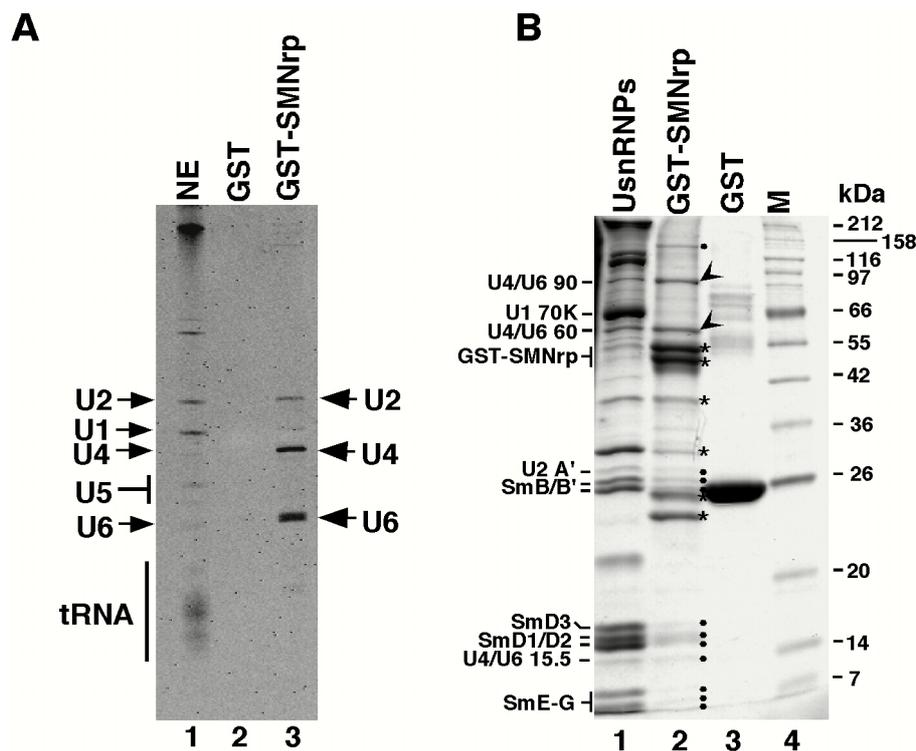


Abbildung 5.39: SMNrp interagiert mit dem U4/U6 & snRNP *in vitro*. (A) GST-SMNrp interagiert mit den U4/U6 und U2 snRNA in Kernextrakten, in denen der [U4/U6.U5]-tri-snRNP dissoziiert wurde. Die RNAs des Kernextraktes (Spur 1), der GST-Säule (Spur 2) und der GST-SMNrp-Säule (Spur 3) wurden extrahiert, durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. (B) Proteinkomponenten der in (A) dargestellten Säuleneluate. GST-SMNrp Degradationsprodukte sind durch Sterne, U2 spezifische Proteine sowie Sm-Proteine durch Punkte und die U4/U6-spezifischen Proteine 60kDa und 90kDa durch Pfeile gekennzeichnet (Spur 2). In Spur 3 ist die Proteinelution einer GST-Kontrollsäule dargestellt. Spur 1 zeigt Proteine aus gereinigten U snRNPs und Spur 4 einen Molekulargewichts-Marker.

Es stellte sich nun die Frage welche spezifische Faktoren des tri-snRNPs die Interaktion mit SMNrp vermitteln. Experimente anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass der [U4/U6.U5]-tri-snRNP eine labiles Partikel ist und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in die U5 und U4/U6 snRNPs zerlegt werden kann (Utans *et al.*, 1992). Diese Beobachtung wurde zunächst ausgenutzt um herauszufinden, ob SMNrp mit dem U4/U6 snRNP oder dem U5 snRNP in Wechselwirkung tritt. Hierzu wurden nun die vorangegangenen GST-SMNrp-Bindungsexperimente mit HeLa-Kernextrakt in dem der [U4/U6.U5]-tri-snRNP in den U5 und U4/U6 snRNP dissoziiert war, wiederholt (Abb.: 5.39). Erstaunlicherweise konnten unter diesen Bedingungen nur die snRNAs U2, U4 und U6 im Eluat der GST-SMNrp-Matrix identifiziert werden (Abb.: 5.39A, Spur 3). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen war die Analyse der gebundenen Proteine. Neben den Sm-Proteinen war ein 60kDa und ein 90kDa

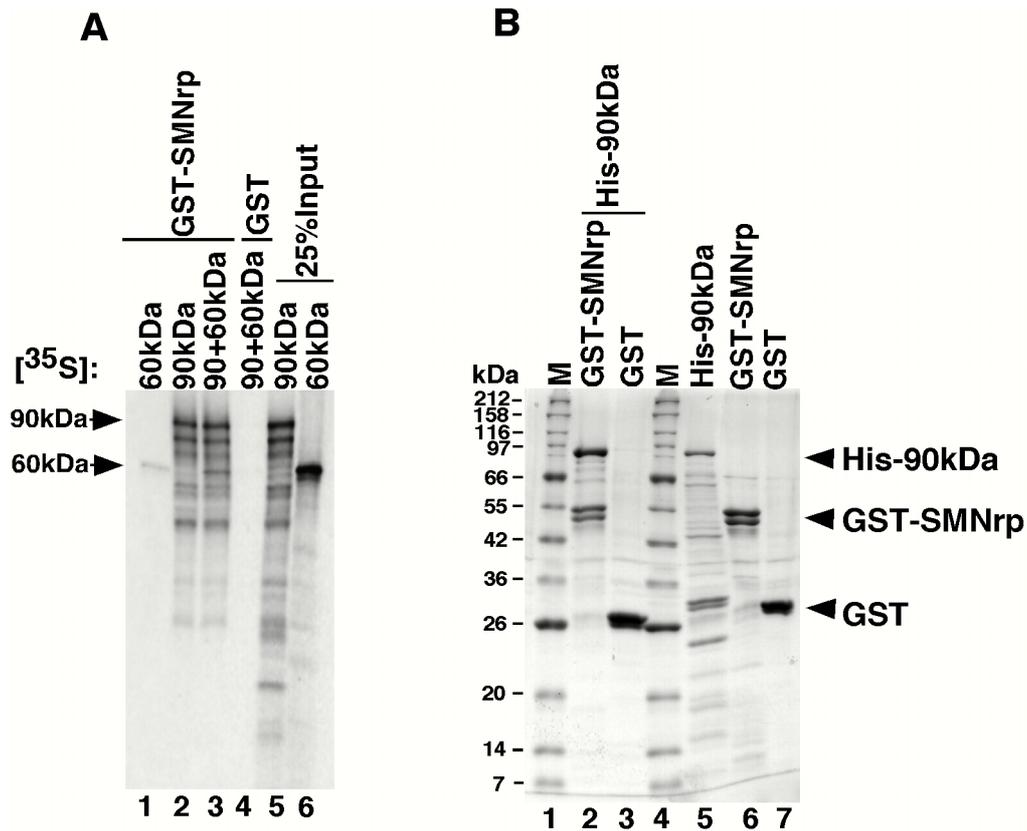


Abbildung 5.40: SMNrp interagiert direkt mit dem U4/U6-90kDa Protein. (A) GST-SMNrp (Spuren 1-3) oder GST alleine (Spur 4) wurde durch Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit [³⁵S]-markiertem U4/U6-60 kDa Protein (Spur 1), U4/U6-90kDa Protein (Spur 2) oder einer Mischung aus beiden (Spuren 3 und 4) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Spuren 5 und 6 zeigen 25% der eingesetzten, [³⁵S]-markierten Proteine. (B) GST-SMNrp (Spur 2) oder GST alleine (Spur 3) wurde durch Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit rekombinatem, His-fusioniertem U4/U6-90kDa-Protein inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die eingesetzten Proteine sind in den Spuren 5-7 dargestellt. Die Spuren 1 und 4 zeigen Molekulargewichtsmarker.

schweres Protein die Hauptproteinkomponenten des Eluats (Abb.: 5.39B, Spur 2). Diese beiden Proteine sind in der Literatur als Komponenten des U4/U6 snRNPs beschrieben (Lauber *et al.*, 1997). Dies legte den Schluss nahe, dass eine Komponente des U4/U6 snRNPs und nicht des U5 snRNPs mit SMNrp interagiert. Das 60 kDa und das 90 kDa Protein waren neben den Sm-Proteinen die einzigen U4/U6-assoziierten Proteine, die in großen Mengen von der GST-SMNrp-Säule eluierten was vermuten ließ, dass SMNrp mit einem dieser Proteine direkt interagiert.

In der Tat konnte in *in vitro* Bindungsstudien beobachtet werden, dass das *in vitro* translatierte 90kDa-Protein effizient mit GST-SMNrp wechselwirkte (Abb.: 5.40A, Spur 2), wohingegen keine Bindung des 60kDa-Proteins detektiert wurde (Spur 1). An den GST-Fusionsanteil alleine band keines der beiden Proteine (Spur 4). Um nun eine direkte Wechselwirkung

zwischen SMNrp und dem 90kDa Protein zu untersuchen, wurden im folgenden Experiment bakteriell exprimierte und gereinigte Proteine für Bindungsstudien eingesetzt (Abb.: 5.40B). Auch in diesem Experiment wurde GST-SMNrp mit Hilfe von Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit rekombinatem 90kDa-Protein inkubiert. Wie in Abbildung 5.40B zu sehen ist, konnte tatsächlich eine stöchiometrische Menge 90kDa-Protein an GST-SMNrp gebunden werden (Spur 2), wohingegen keine Interaktion mit dem GST-Fusionsanteil alleine zu erkennen war (Spur 3).

Die hier dargestellten Resultate legten den Schluß nahe, dass SMNrp nicht nur mit dem 17S U2 snRNP sondern auch mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP wechselwirken kann wobei der Kontakt auf der tri-snRNP-Seite durch das 90kDa-Protein hergestellt wird. Es ist daher eine attraktive Hypothese, dass SMNrp die Rekrutierung des [U4/U6.U5]-tri-snRNPs und damit die Ausbildung des reifen Spleißosoms ermöglicht.

6 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Frage, wie sich spleißosomale U snRNPs aus ihren Einzelkomponenten (d.h. U snRNAs und Proteine) *in vivo* zusammenlagern. Bisher war diese Frage lediglich *in vitro* mit gereinigten Komponenten untersucht worden. Diese Studien zeigten, dass sich U snRNP-Proteine spontan (d.h. ohne Verbrauch von Energie) mit der U snRNA zu einem RNP-Partikel zusammenlagern, und dass hierfür keinerlei nicht-U snRNP-Faktoren notwendig sind (Raker *et al.*, 1999; Raker *et al.*, 1996). Demgegenüber stand aber die Beobachtung, dass Antikörper gegen Komponenten des SMN-Komplexes, die in *Xenopus laevis* Oocyten injiziert wurden, mit der Ausbildung von U snRNPs interferierten (Fischer *et al.*, 1997).

6.1 *In vitro* Testsysteme zur Analyse der U snRNP-Biogenese

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro*-Testsystem etabliert, das die detaillierte biochemische Analyse der U snRNP-Zusammenlagerung erlaubt. In diesem Rekonstitutionssystem wurden radioaktiv markierte U snRNAs mit *Xenopus laevis* Eiextrakt bzw. cytoplasmatischem HeLa-Extrakt inkubiert und die Komplexbildung durch native Gelelektrophorese untersucht. Verschiedene RNA-Protein-Komplexe, die als R1, R2 und M bezeichnet wurden, konnten in diesen Experimenten identifiziert werden. Aufschluß über die Zusammensetzung der einzelnen Komplexe lieferten sowohl Untersuchungen mit mutierten U1 snRNAs, die mit den U1-spezifischen Proteinen keine Wechselwirkungen mehr eingehen konnten, als auch „supershift“-Experimente mit Antikörpern gegen die Sm-Proteine. Beide Ansätze offenbarten, dass die Komplexe R2 und M im *X. laevis*-Eiextrakt Sm-Proteine enthalten. Darüber hinaus legte die Größe des M-Komplexes die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Komplex um das U1-Partikel, an das neben den Sm-Proteinen auch spezifische U1-Faktoren gebunden sind, handelt. Der im *X. laevis*-Eiextrakt und im HeLa-Extraktssystem auftretende R1-Komplex enthält dagegen nur das spezifische U1-A Protein (Abb.: 5.1 und 5.8).

6.2 Die U snRNP-Biogenese ist ein aktiver Prozess

Mehrere experimentelle Evidenzen zeigten, dass die U snRNPs in den beschriebenen *in vitro* Rekonstitutionssystemen nicht spontan, sondern in einem aktiven und Faktor-vermittelten Prozess zusammengelagert werden.

Zum einen wird für die Ausbildung der Sm-core-Domäne Energie benötigt. Die Inkubation bei 4°C und die Depletion von ATP aus dem Extrakt verhinderten die Ausbildung der Sm-core-Domäne. Durch die Readdition von ATP konnte die U snRNP-Biogeneseaktivität des Extraktes dagegen rekonstituiert werden. ATP wird bei der Zusammenlagerung der U snRNPs sehr wahrscheinlich hydrolysiert, da ein Überschuß an ATP γ S, einem nur sehr langsam hydrolysierbaren ATP-Analogon, diesen Prozess stark inhibierte. Diese Daten zeigen, dass die Ausbildung der U snRNPs in den verwendeten Rekonstitutionssystemen, und somit sehr wahrscheinlich auch *in vivo*, ein aktiver Prozess ist, der Energie in Form von ATP verbraucht (Abb.: 5.2).

Zum anderen ist die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne in den U snRNP-Rekonstitutionssystemen *in vitro* von Faktoren wie SMN und Gemin2 abhängig. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch verschiedene experimentelle Ansätze belegt werden. Erstens interferieren Antikörper gegen SMN und Gemin2 mit der Ausbildung der Sm-core-Domäne. Mikroinjektionsstudien, die im *X. laevis*-Oocyten-system durchgeführt wurden, zeigten, dass auch *in vivo* diese Antikörper die U snRNP-Biogenese inhibieren (Fischer *et al.*, 1997). Zweitens ging die Immundepletion von SMN und Gemin2 sowohl aus dem *X. laevis*-Eiextrakt als auch aus HeLa-Cytoplasmaextrakt mit dem Verlust der U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität einher. Durch diese biochemischen Untersuchungen konnte erstmals eine direkte Beteiligung dieser Proteine an der U snRNP-Biogenese nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise konnte durch die Rückgabe von rekombinantem SMN und Gemin2 zum depletierten Extrakt die U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität nicht rekonstituiert werden (Abb.: 5.3 und 5.4). Diesen Resultaten zu Folge sind SMN und Gemin2 zwar notwendig, alleine aber nicht ausreichend für die Ausbildung der Sm-core-Domäne. Dies ließ vermuten, dass im Kontext von zellulären Extrakten weitere Faktoren, die in den beschriebenen Experimenten mit SMN und Gemin2 kodepletiert wurden, essentiell für die Ausbildung der U snRNPs sind.

6.3 Ein makromolekularer Proteinkomplex wird für die U snRNP-Zusammenlagerung benötigt

Die Vermutung, dass SMN und Gemin2 Teile größerer Proteinkomplexe sein könnten, wurde durch mehrere Beobachtungen gestützt: erstens wurde von Liu *et al.* (1997) nachgewiesen, dass SMN und Gemin2 im Cytoplasma mit Sm-Proteinen assoziiert sind. Zweitens zeigten Sedimentationsanalysen, dass ein Komplex, der SMN und Gemin2 enthält, im Bereich von ca. 20S sedimentiert (nicht gezeigt). Dies deutete erstmals auf die Existenz eines

makromolekularen SMN-Komplexes hin, der schliesslich in der vorliegenden Arbeit durch Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte. Dieser Protein-Komplex enthält neben den bereits bekannten Proteinen SMN, Gemin2 (Liu *et al.*, 1997), dp103/Gemin3 (Campbell *et al.*, 2000; Charroux *et al.*, 1999; Grundhoff *et al.*, 1999) und den Sm-Proteinen B/B', D1, D2, D3, E, F und G auch bisher nicht identifizierte Proteine: p175, Gemin4/GIP1, Gemin6, das unr-interacting protein (unrip, Hunt *et al.*, 1999) sowie das Hitzeschockprotein hsc70 (Abb.: 5.5)(Hartl *et al.*, 2002).

Interessanterweise konnte der gereinigte SMN-Komplex die U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität des Extraktes wieder vollständig rekonstituieren (Abb.: 5.7). Diese Studien definieren den SMN-Komplex als einen für die U snRNP-Biogenese essentiellen Faktor. Die Tatsache, dass alle Sm-Proteine Komponenten des SMN-Komplexes sind, führte zu der Annahme, dass der SMN-Komplex diese Proteine direkt auf die U snRNA überträgt und somit möglicherweise allein für die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne ausreichend ist. Durch die Inkubation des gereinigten SMN-Komplexes mit U snRNAs konnte diese Fragestellung in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der SMN-Komplex ist alleine notwendig und hinreichend um die Sm-core-Domäne *in vitro* zusammenzulagern (Abb.: 5.10). Ein Übertragen der Sm-Proteine auf die U snRNA durch den SMN-Komplex konnte auch *in vivo* durch „pulse-chase“-Experimente nachgewiesen werden. In diesen Studien wurden die zellulären Proteine *in vivo* radioaktiv markiert und es zeigte sich, dass die Sm-Proteine nur transient mit dem SMN-Komplex interagieren und im zeitlichen Verlauf einem hohen Umsatz unterliegen. Gleichzeitig kann in diesem Zeitraum eine Zunahme der radioaktiv markierten Sm-Proteine in reifen U snRNPs beobachtet werden (Abb.: 5.11). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch *in vivo* ein direkter Transfer der Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf die U snRNA stattfindet.

6.4 Der SMN-Komplex überträgt die Sm-Proteine in einem Schritt auf die U snRNA

Die Beobachtung, dass die Sm-Proteine direkt vom SMN-Komplex auf die U snRNA übertragen werden, erlaubte die Analyse dieses Vorgangs im Detail. Studien mit isolierten Sm-Proteinen *in vitro* hatten aufgezeigt, dass die Anlagerung der Sm-Proteine an die Sm-Bindungsstelle der U snRNA in zwei aufeinanderfolgenden Schritten erfolgt. Im ersten Schritt entsteht dabei ein stabiles Partikel, das sogenannte „subcore“, das neben den Sm-Proteinen D1, D2, E, F und G auch die U snRNA enthält. Die Assoziation eines SmB/B'.D3-

Heterodimers führt schließlich im zweiten Schritt zur Formierung der vollständigen Sm-core-Domäne (Raker *et al.*, 1999; Raker *et al.*, 1996).

Interessanterweise war ein SMN-Komplex, von dem durch Hochsalz-Behandlung die Sm-Proteine B/B' und D3 entfernt worden waren, nicht in der Lage, eine stabile „subcore“-Struktur auszubilden. Die „Wiederbeladung“ dieses SMN Δ B/B'.D3-Komplexes mit gereinigten Sm-Proteinen resultierte dagegen in einer nahezu vollständigen Wiederherstellung der Zusammenlagerungsaktivität (Abb.: 5.12 und 5.13). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass der SMN-Komplex alle Sm-Proteine in einem Schritt auf die U snRNA übertragen werden.

Sm-Proteine, die aus U snRNPs isoliert werden, liegen in heterooligomeren Komplexen vor. Dabei wechselwirken die Sm-Proteine B/B' und D3 (SmB/B'.D3), D1 und D2 (SmD1.D2) und E, F und G (SmE.F.G) miteinander (Raker *et al.*, 1996). Es gibt nun erste experimentelle Hinweise, dass die Sm-Proteine auch am SMN-Komplex als heterooligomere Komplexe vorliegen. So legt die Beobachtung, dass durch Hochsalz-Behandlung spezifisch die Sm-Proteine B/B' und D3 vom SMN-Komplex gelöst werden können, den Schluss nahe, dass diese beiden Proteine zu einem stabilen Komplex assoziiert sind. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass bereits am SMN-Komplex die Sm-Proteine in heterooligomeren Komplexen vorliegen. Das Ziel weiterführender Studien ist, herauszufinden, ob der SMN-Komplex an der Ausbildung dieser heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe beteiligt ist, oder ob die Sm-Proteine bereits vor der Interaktion mit dem SMN-Komplex miteinander wechselwirken.

6.5 Der pICln-Komplex modifiziert Argininreste der Sm-Proteine B/B', D1 und D3

Obwohl der gereinigte SMN-Komplex alleine ausreicht, um die Sm-core-Domäne auszubilden, gab es verschiedene experimentelle Hinweise, dass *in vivo* noch weitere Faktoren daran beteiligt sind. Erstens kann der gereinigte SMN-Komplex nur sehr ineffizient die gebundenen Sm-Proteine an die U snRNA abliefern. Im Kontext des Extraktes läuft dieser Vorgang hingegen in einer effizienten Reaktion ab. Zweitens benötigt der SMN-Komplex im Gegensatz zu den Extraktsystemen für die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne keine Energie in Form von ATP. Drittens wurde in früheren Experimenten und gezeigt, dass Modifikationen von Arginin-Resten in den Sm-Proteinen B/B', D1 und D3 die Voraussetzung für die Interaktion mit SMN sind (Brahrs *et al.*, 2001; Friesen *et al.*, 2001a). Diese Beobachtungen legten den Schluß nahe, dass weitere Faktoren notwendig sind, um die Sm-

Proteine auf den SMN-Komplex zu übertragen und die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne dadurch energieabhängig machen.

Ein Faktor, der neben dem SMN-Komplex eine Rolle bei der Ausbildung von U snRNPs spielen könnte, wurde bereits 1999 von Pu et al. beschrieben. Initiale Untersuchungen wiesen diesem Protein eine Assoziation mit nukleotidsensitiven Chlorid-Kanälen zu, und es wurde daher als pICln (protein, current (I), chloride (Cl), nukleotide-sensitive) bezeichnet (Krapivinsky *et al.*, 1994). Weiterführende Studien belegten allerdings, dass pICln *in vivo* mit Sm-Proteinen assoziiert ist und die Ausbildung der Sm-core-Domäne in *Xenopus laevis*-Oocyten unterdrücken kann (Pu *et al.*, 1999). Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Affinitätschromatographie versucht, einen putativen pICln-Komplex aufzureinigen (Abb.: 5.15). Durch diese Strategie ist es gelungen, einen Proteinkomplex zu identifizieren, der neben pICln ein neues WD-Motiv-enthaltendes Protein (in der vorliegenden Arbeit als WD45 bezeichnet), die Typ-II-Arginin-Methyltransferase PRMT5 (protein arginine methyltransferase 5) und alle Sm-Proteine enthält. Die überraschende Koreinigung einer Typ-II-Arginin-Methyltransferase, die symmetrische Dimethylarginine (sDMA) erzeugt, führte zur Vermutung, dass der pICln-Komplex die funktionelle Einheit ist, die Sm-Proteine symmetrisch dimethyliert. Verschiedene experimentelle Ansätze konnten diese Vermutung bestätigen. Erstens erzeugt die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Enzymaktivität symmetrische Dimethylarginine in rekombinanten Sm-Proteinen (Abb.: 5.14). Zweitens ko-fraktioniert die Methyltransferaseaktivität in Gelfiltrationsstudien mit dem pICln-Komplex (nicht gezeigt). Drittens ist der gereinigte pICln-Komplex in der Lage spezifisch rekombinante Sm-Proteine zu methylieren und schliesslich inhibieren Antikörper gegen PRMT5 diese Aktivität (Abb.: 5.14 und 5.15). Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, so ist es sehr wahrscheinlich, dass PRMT5 als Komponente des pICln-Komplexes die Methyltransferase ist, die *in vivo* spezifisch Sm-Proteine symmetrisch dimethyliert.

PRMT5 ist die einzige bislang bekannte Typ-II-Arginin-Methyltransferase, die Arginine symmetrisch dimethyliert. Alle anderen bekannten Arginin-Methyltransferasen (PRMT1-4 und PRMT6) zeichnen sich durch eine Methylierungsaktivität aus, die asymmetrische Dimethylarginine generiert (Typ-I-Arginin-Methyltransferasen) (McBride and Silver, 2001). Solche Enzyme methylieren Arginine in RGG-Motiven zahlreicher Substrat-Proteine. Demgegenüber erkennen und modifizieren Typ-II-Arginin-Methyltransferasen Arginine in RG-Paaren und neben den Sm-Proteinen ist bislang nur das Myelin-basic-Protein (MBP) als Substrat für solche Methyltransferasen bekannt (McBride and Silver, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der isolierte pICln-Komplex *in vitro* nur die Sm-Proteine B/B', D1 und D3, nicht aber Histone oder MBP, wie es für PRMT5 allein beschrieben wurde (Friesen *et al.*, 2001b; Pollack *et al.*, 1999), methylieren kann. Hieraus resultiert die Frage, wodurch die Substratspezifität von PRMT5 bezüglich der Sm-Proteine hervorgerufen wird (Abb.: 5.14). Aufgrund der vorgelegten Daten ist es sehr wahrscheinlich, dass Faktoren wie pICln oder WD45 die Substratspezifität von PRMT5 steuern. Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass pICln eine direkte und stabile Interaktion mit den Sm-Proteinen, also dem Substrat von PRMT5, eingehen kann (Abb.: 5.17). Der pICln-Komplex ist demnach die funktionelle Einheit, die Sm-Proteine methyliert und es ist sehr wahrscheinlich, dass PRMT5 noch in weiteren Protein-Komplexe integriert ist, die eine andere Substratspezifität vermitteln.

Interessanterweise werden Sm-Proteine sehr viel stärker methyliert, wenn sie vorher mit rekombinantem pICln inkubiert wurden (Abb.: 5.16). pICln geht dabei eine stabile Wechselwirkung mit den Sm-Motiven der Sm-Proteine ein. Die RG-Domäne dieser Proteine alleine, die nicht mit pICln interagiert, wird hingegen sehr viel weniger effizient modifiziert. Drei mögliche zelluläre Mechanismen könnten diese Beobachtung erklären. Zum einen könnte pICln als „Brückenglied“ zwischen dem Substrat (Sm-Proteine) und der Methyltransferase fungieren und dadurch die effiziente Modifikation gewährleisten. Ebenfalls denkbar erscheint, dass pICln direkt die Aktivität von PRMT5 stimuliert. Solche allosterischen Wechselwirkungen sind für eine Vielzahl von Enzymen beschrieben. Schließlich ist auch nicht ausgeschlossen, dass durch die Interaktion von pICln mit den Sm-Motiven die RG-Domänen der Sm-Proteine in eine definierte räumliche Konformation gebracht werden, die die effiziente Methylierung durch PRMT5 ermöglicht. Interaktionsstudien, die die Wechselwirkungen innerhalb des pICln-Komplexes aufzeigen, werden daher auch weitere Einsichten in die PRMT5-vermittelte symmetrische Dimethylierung von Sm-Proteinen erlauben.

6.6 Der SMN-Komplex und der pICln-Komplex kooperieren bei der Zusammenlagerung von U snRNPs

Pu *et al.* (1999) konnte zeigen, dass in der *Xenopus laevis*-Oocyte der Großteil der Sm-Proteine an pICln gebunden vorliegt. In diesen Zellen werden große Mengen von verschiedenen Proteinen vorab synthetisiert, um ein rasches Wachsen unmittelbar nach der Befruchtung zu gewährleisten. Der pICln-Komplex könnte demzufolge für die „Lagerung“ von Sm-Proteinen im Cytoplasma, vermutlich in inaktiver Form, zuständig sein und die Sm-

Proteine erst bei Bedarf an den SMN-Komplex abgeben. In somatischen Zellen findet man dagegen nur geringe Mengen von Sm-Proteinen an den pICln-Komplex gebunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass alle neu synthetisierten Sm-Proteine in diesen Zellen sofort in U snRNPs integriert werden. Die sDMA-Modifizierung von Sm-Proteinen scheint daher nicht die einzige Funktion des pICln-Komplexes zu sein.

Die Sm-Proteine B/B', D1 und D3 müssen erst methyliert werden, bevor sie an den SMN-Komplex binden können (Friesen *et al.*, 2001a). Dies setzt aber voraus, dass die Sm-Proteine nach der Synthese zunächst mit dem pICln-Komplex interagieren müssen bevor sie auf den SMN-Komplex übertragen werden können (Friesen *et al.*, 2001a). Wie also gelangen die Sm-Proteine vom pICln-Komplex zum SMN-Komplex? Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass dies in einem Verbund aus pICln- und SMN-Komplexen erfolgt. Hierfür liefert die gezeigte Ko-Reinigung des SMN-Komplexes über anti-pICln-Affinitätschromatographie einen starken Hinweis (SMN/pICln-Komplex oder Assemblosom; Abb.: 5.19). Dadurch wurde erstmals gezeigt, dass diese beiden Komplexe direkt miteinander in Kontakt treten. Es ist zu vermuten, dass beim Kontakt beider Komplexe die (methylierten) Sm-Proteine vom pICln-Komplex auf den SMN-Komplex übertragen werden. Da der SMN-Komplex in der in Abbildung 5.19 gezeigten Aufreinigung gegenüber dem pICln-Komplex unterrepräsentiert vorliegt, ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Komplexe nur transient miteinander wechselwirken.

Darüber hinaus scheint aber die Interaktion zwischen beiden Komplexen auch noch direkte Konsequenzen für die Aktivität des SMN-Komplexes zu haben. Die Analyse der Assemblierungsaktivität zeigte, dass der SMN/pICln-Komplex die Sm-core-Domäne effizienter zusammenlagern kann als der SMN-Komplex alleine. Diese beiden Komplexe bilden dabei eine funktionelle Einheit und es kann darüber hinaus auch eine ATP-Abhängigkeit der U snRNP-Zusammenlagerung beobachtet werden. Vermutlich wird erst durch das Zusammenspiel der beiden Komplexe eine effiziente Ausbildung der Sm-core-Domäne im Cytoplasma erreicht (Abb.: 5.19).

6.7 Modell der assistierten Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne

Aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen, kann ein Modell für die SMN-vermittelte Biogenese der U snRNPs postuliert werden (Abb.: 6.1). Demnach binden neu synthetisierte Sm-Proteine zunächst über eine direkte Interaktion mit pICln an den pICln-Komplex. Dort katalysiert PRMT5 die symmetrische Methylierung von Argininen in den Sm-Proteine B/B', D1 und D3. Im nächsten Schritt tritt der pICln-Komplex mit dem SMN-Komplex in direkten Kontakt wodurch der Transfer der Sm-Proteine vom pICln-Komplex auf

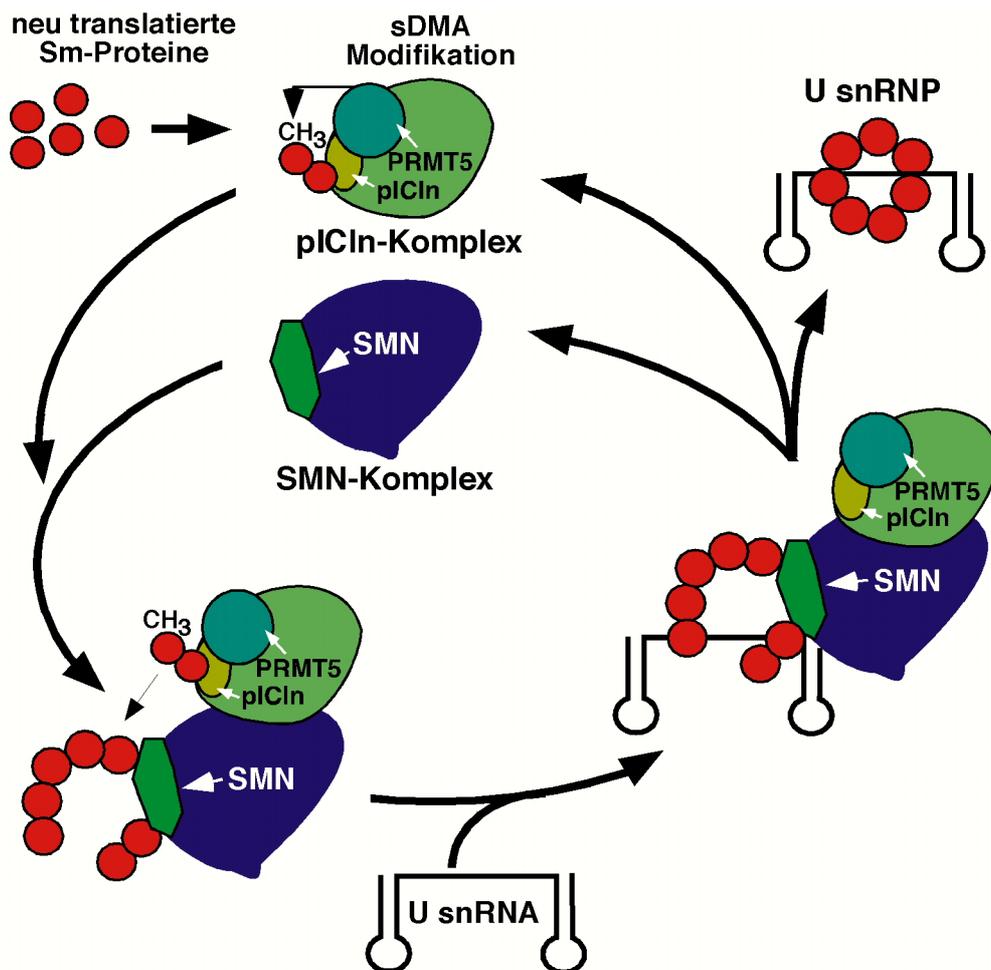


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Faktor-vermittelten Zusammenlagerung spleißosomaler U snRNPs. Neu synthetisierte Sm-Proteine binden zunächst über eine direkte Interaktion mit pICln an den pICln-Komplex. Dort katalysiert PRMT5 die symmetrische Methylierung von Argininen in den Sm-Proteine B/B', D1 und D3. Im nächsten Schritt tritt der pICln-Komplex mit dem SMN-Komplex in direkten Kontakt wodurch der Transfer der Sm-Proteine vom pICln-Komplex auf den SMN-Komplex ermöglicht wird. SMN spielt dabei als direkter Interaktionspartner der Sm-Proteine B/B', D1 und D3 eine zentrale Rolle. Zum SMN/pICln-Komplex wird die aus dem Zellkern exportierte U snRNA rekrutiert. Als nächstes wird ein vollständiger Satz der sieben Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F, und G in einem Schritt auf die U snRNA transferiert, was in der Ausbildung der Sm-core-Domäne resultiert. Das zusammengelagerte U snRNP dissoziiert nun vom SMN/pICln-Komplex ab und wird in den Zellkern transportiert, wo es seine Funktion im Spleißprozess ausübt. Im nächsten Schritt lösen sich der pICln- und der SMN-Komplex voneinander und stehen für einen neuen U snRNP-Biogenese-Zyklus bereit.

den SMN-Komplex ermöglicht wird. SMN spielt dabei als direkter Interaktionspartner der Sm-Proteine B/B', D1 und D3 eine zentrale Rolle. Ob alle Sm-Proteine ausschließlich an SMN binden, oder ob noch weitere Komponenten hierbei eine Rolle spielen ist gegenwärtig unklar. Zum SMN/pICln-Komplex wird die aus dem Zellkern exportierte U snRNA rekrutiert. Als nächstes wird ein vollständiger Satz der sieben Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F, und G in einem Schritt auf die U snRNA transferiert, was in der Ausbildung der Sm-core-Domäne

resultiert. Das zusammengelagerte U snRNP dissoziiert nun vom SMN/pICln-Komplex ab und wird in den Zellkern transportiert, wo es seine Funktion im Spleißprozess ausübt. Im nächsten Schritt lösen sich der pICln- und der SMN-Komplex voneinander und stehen für einen neuen U snRNP-Biogenese-Zyklus bereit. Ob U snRNP-spezifische Proteine, wie zum Beispiel U1-A oder U2-A', die auch Komponenten des SMN-Komplexes sind, ebenfalls bei diesem Zusammenlagerungsprozess übertragen werden, ist gegenwärtig unklar.

Die Funktion des SMN-Komplexes während der Biogenese von U snRNPs besteht darin, die Sm-Proteine auf die Sm-Bindungsstelle der U snRNA zu übertragen. Der SMN-Komplex besitzt neben SMN und den Sm-Proteinen noch mindestens neun weitere Proteine und es stellte sich die Frage nach den individuellen Funktionen der einzelnen Komponenten während des Sm-Protein-Transfers auf die U snRNA. Interessanterweise ist dp103/Gemin3, eine putative ATP-abhängige DEAD-box Helikase, ein integraler Bestandteil des SMN-Komplexes (Campbell *et al.*, 2000; Charroux *et al.*, 1999; Grundhoff *et al.*, 1999). Solche Enzyme sind entweder in der Lage RNA-Sekundärstrukturen oder Protein-RNA-Komplexe aufzulösen (Jankowsky *et al.*, 2001). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass dp103/Gemin3 in einer ATP-abhängigen Art und Weise am Zusammenlagerungsprozess direkt beteiligt ist. Dp103/Gemin3 könnte dabei Proteine, wie zum Beispiel Transportfaktoren, die an die U snRNA gebunden sind, ablösen und erst dadurch die Assemblierung der Sm-core-Domäne ermöglichen. Darüber hinaus sind U snRNAs durch ausgeprägte Sekundärstrukturen gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang könnte dp103/Gemin3 solche Strukturen auflösen um eine effiziente Bindung der Sm-Proteine an die U snRNA zu ermöglichen. In beiden Fällen würde ATP ein essentieller Kofaktor für die U snRNP-Biogenese sein, wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

Eine weitere Komponente des SMN-Komplexes, für die eine ATP-Abhängigkeit nachgewiesen wurde, ist hsc70. Dieses klassische Chaperon unterstützt die schnelle und korrekte Faltung von Proteinen und verbraucht dabei Energie (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Die Sm-core-Domäne ist durch eine sehr stabile und kompakte Struktur gekennzeichnet. Möglicherweise sind Faktoren wie hsc70 unerlässlich um die korrekte Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne zu gewährleisten. Interessanterweise wird eine strikte ATP-Abhängigkeit nur dann beobachtet, wenn der SMN-Komplex mit dem pICln-Komplex assoziiert ist. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, dass dp103/Gemin3 oder hsc70 durch den Kontakt mit dem pICln-Komplex aktiviert werden.

Das hier aufgeführte Modell läßt die Frage offen, wie die Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf die U snRNA übertragen werden. Denkbar wäre, dass der SMN-Komplex die Sm-Proteine

zunächst in einer definierten Konfiguration hält. Nachdem die U snRNA gebunden hat, könnte sich der SMN-Komplex strukturell umlagern, was schließlich den Ringschluß der Sm-Proteine um die U snRNA erlaubt. Wenn dieses Modell richtig ist, dann wäre die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne ähnlich der „clamp-loading“-Reaktion wie sie bei der Replikation von DNA beobachtet wird (Ellison and Stillman, 2001). Klammern (engl.: „clamps“) sind Protein-Oligomere (zum Beispiel die β -Untereinheit der DNA-Polymerase aus *E.coli* oder das humane PCNA-Protein), die aktiv auf die DNA übertragen werden, was zu einer Stabilisierung der Interaktion zwischen der DNA-Polymerase und ihrem DNA-Substrat führt. Die zelluläre Maschinerie, die diese Klammern überträgt (engl.: „clamp-loader“), bestehen aus mehreren Untereinheiten, welche die Komponenten der Klammern binden und in einer ATP-abhängigen Art und Weise offen halten, so dass die DNA in die fertige Klammer eingeschlossen werden kann. Die Hydrolyse des gebundenen ATPs erlaubt dabei die Freisetzung des „clamp-loaders“ und den Ringschluß um die DNA. Detaillierte biochemische Untersuchungen bezüglich der Ausbildung der Sm-core-Domäne durch den SMN-Komplex, könnten zeigen, ob hier ein dem „clamp-loading“-Prozess ähnlicher Mechanismus vorliegt.

6.8 Der SMN/pICln-Komplex als generelle RNP-Zusammenlagerungsplattform?

Neben dem U1 snRNP werden durch den SMN/pICln-Komplex auch die U2, U4 und U5 snRNPs zusammengelagert. Interessanterweise wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schümperli (Universität Bern) herausgefunden, dass das U7 snRNP ebenfalls in einer SMN-abhängigen Reaktion zusammengelagert wird. Das U7 snRNP spielt eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von Histon-mRNAs und ist in seiner Grundstruktur den spleißosomalen U snRNPs ähnlich. Dieses RNP-Partikel bildet eine Sm-core-Domäne an der U7 snRNA aus, in der die Sm-Proteine D1 und D2 durch LSm10 und LSm11 ersetzt sind (Pillai *et al.*, 2001). Interessanterweise konnten diese beiden neuen LSm-Proteine auch als Komponenten des SMN-Komplexes identifiziert werden. Darüber hinaus zeigten neueste Untersuchungen, dass die Zusammenlagerung des U7 snRNPs strikt ATP- und SMN-Komplex-abhängig ist und damit eine weitere Übereinstimmung zur Zusammenlagerung der spleißosomalen U snRNPs aufweist (nicht gezeigt). Der SMN-Komplex kann also neben den Sm-Proteinen auch noch andere Substrat-Proteine, wie zum Beispiel LSm9 und LSm10, binden und diese auf U snRNAs übertragen. Ob für die Ausbildung des U7 snRNPs auch die Funktion des pICln-Komplexes benötigt wird, ist gegenwärtig unklar.

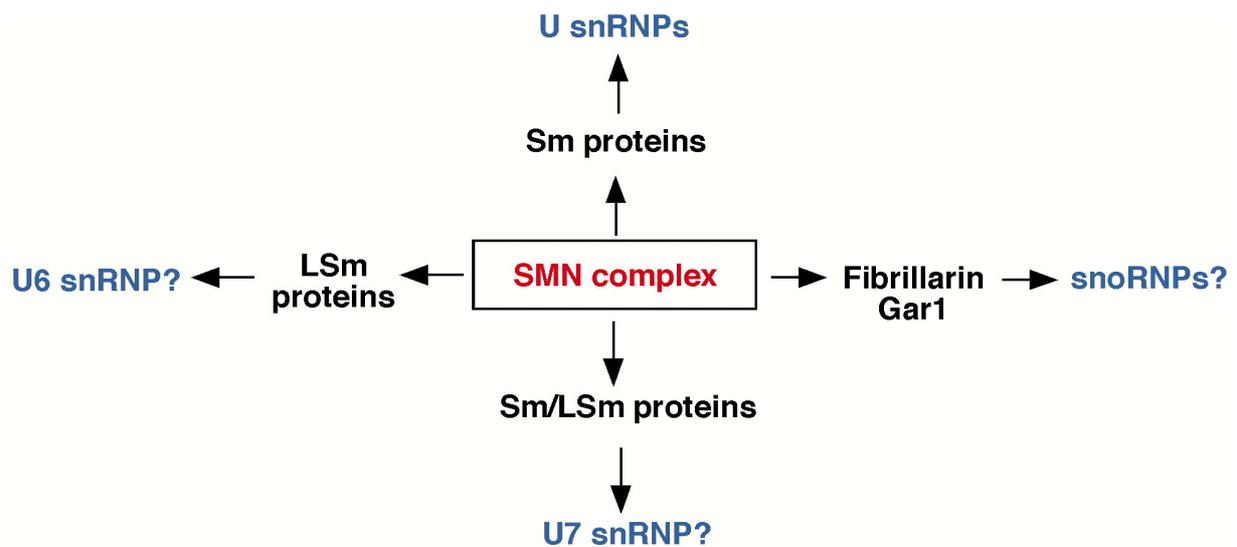


Abbildung 6.2: Übersicht über die mögliche Beteiligung des SMN-Komplexes an der Ausbildung verschiedener RNA-Protein-Komplexe. Der SMN-Komplex könnte zusammen mit dem pICln-Komplex neben der Zusammenlagerung spleißosomaler U snRNPs auch an der Ausbildung der U6 und U7 snRNPs beteiligt sein. Darüber hinaus spricht die Interaktion von SMN mit Fibrillarin und GAR1 für eine Funktion bei der Zusammenlagerung von snoRNPs.

Das U6 snRNP unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den anderen spleißosomalen U snRNPs. So wird die U6 snRNA von der RNA-Polymerase III transkribiert und besitzt keine „klassische“ Sm-Bindungsstelle, sondern am 3'-Ende einen uridylsäurereichen Abschnitt. Um diesen Bereich bilden die sogenannten LSm-Proteine 2-8 (like Sm-proteins 2-8) eine heptamere Ringstruktur aus, die strukturell der Sm-core-Domäne sehr ähnlich ist (Achsel *et al.*, 1999; Salgado-Garrido *et al.*, 1999; Toro *et al.*, 2001). Die Biogenese des U6-Partikels findet darüber hinaus sehr wahrscheinlich ausschließlich im Zellkern statt. Kürzlich wurde von Friesen *et al.* (2000) und Brahm *et al.* (2002) gezeigt, dass LSm4 *in vivo* symmetrische Dimethylarginine trägt, und dass zumindest *in vitro* dieses Protein mit SMN wechselwirken kann. Dies stützt die These, dass möglicherweise der nukleäre SMN-Komplex an der Biogenese des U6 snRNPs beteiligt sein könnte. *In vitro*-Studien, wie sie in der vorliegenden Arbeit für die anderen spleißosomalen U snRNPs durchgeführt wurden, sollten hier bald Hinweise auf eine Beteiligung des SMN/pICln-Systems an der Biogenese dieses RNPs geben. Neben den U snRNPs enthalten Zellkerne eine große Zahl von snoRNPs (engl.: small nucleolar RNPs). Diese RNPs sind hauptsächlich in den Nukleoli lokalisiert und an der Prozessierung ribosomaler RNA sowie der Zusammenlagerung ribosomaler Untereinheiten beteiligt. Aufgrund charakteristischer Sequenzmerkmale der snoRNAs werden zwei Klassen

von snoRNPs unterschieden: die Box H/ACA und die Box C/D snoRNPs. Interessanterweise wurde sowohl von Jones *et al.* (2001) als auch von Pellizzoni *et al.* (2001) gezeigt, dass die mit beiden snoRNA-Klassen assoziierten Proteine Fibrillarin und GAR1 *in vivo* mit SMN interagieren. Möglicherweise stellen auch diese Proteine Substrate des SMN-Komplexes dar, was den Schluß nahe legt, dass auch die Biogenese der snoRNPs durch diesen Komplex vermittelt werden könnte. Bemerkenswerterweise ist das nukleäre SMN in sogenannten „Gems“ lokalisiert (Liu *et al.*, 1997). Neueste Untersuchungen haben belegt, dass Gems in vielen Fällen mit Cajal-bodies ko-lokalisieren (Boelens *et al.*, 1995; Liu and Dreyfuss, 1996). Diese nukleären Strukturen sind reich an RNA-Prozessierungsfaktoren und die Biogenese der snoRNPs läuft zumindest teilweise in diesen Bereichen ab. Interessant hierbei ist auch, dass das Telomerase-RNP, ein RNA-Protein-Komplex, der verkürzte Chromosomen-Enden verlängert, in höheren Eukaryonten Ähnlichkeit zu snoRNPs besitzt (Mitchell *et al.*, 1999). Der Gedanke liegt also nahe, dass der SMN/pICln-Komplex auch die Ausbildung dieser RNA-Protein-Partikel vermittelt. Der SMN/pICln-Komplex würde somit eine generelle zelluläre RNP-Zusammenlagerungsplattform darstellen (Abb.: 6.2).

6.9 Spinale Muskelatrophie und die U snRNP-Biogenese

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten konnten auch erstmals Einblicke in die Prozesse liefern, die zum Ausbruch der Spinalen Muskelatrophie führen. Der SMN-Komplex vermittelt in Kooperation mit dem pICln-Komplex die Zusammenlagerung von spleißosomalen U snRNPs und es stellte sich die Frage, ob die Reduktion der SMN-Menge, wie sie in SMA-Patienten beobachtet wird, zu einer Verminderung der U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität führt. Verschiedene experimentelle Ansätze konnten Aufschluss über diese Fragestellung geben. Erstens wurde durch Immunfluoreszenz beobachtet, dass sich in Zellen von SMA-Patienten weniger U snRNPs im Zellkern befinden als in Zellen von gesunden Personen. Darüber hinaus wurde durch die artifizielle Reduktion der SMN-Menge durch RNA-Interferenz (RNAi) in HeLa-Zellen ebenfalls eine Verminderung der nukleären U snRNPs festgestellt. Zweitens zeigten Extrakte von HeLa-Zellen, in denen der SMN-Level durch RNAi reduziert worden war, eine geringere U snRNP-Zusammenlagerungsaktivität wie Extrakte von unbehandelten Zellen (Abb.: 5.20 und 5.21). Diese Daten führten zur Vermutung, dass niedrige SMN-Protein-Mengen zu einer gestörten U snRNP-Biogenese führen. In einem dritten Ansatz wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sendtner (Universität Würzburg) Mausmodelle entwickelt, in denen sowohl *SMN* als auch *Gemin2* heterozygot deletiert waren. Dies hatte zur Folge, dass diese Mäuse eine starke

Reduktion der SMN- und Gemin2-Menge im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufwiesen. Diese Mäuse offenbarten eine starke Verminderung von U snRNPs in Zellkernen von Motorneuronen, den Zellen, die auch bei SMA-Patienten betroffen sind. Andere Zelltypen sind dabei weniger stark betroffen, was andeutet, dass Motorneuronen sensibler auf einen verminderten U snRNP-Level im Zellkern reagieren (Jablonka *et al.*, 2002). Dies legt nun die interessante Vermutung nahe, dass auch in SMA-Patienten selektiv Motorneuronen aufgrund reduzierter U snRNP-Mengen absterben. Motorneuronen sind Zellen mit einer hohen Proteinproduktion und folglich weisen diese Zellen eine hohe Spleißaktivität von mRNA-Vorläufern auf. Limitierende Mengen von spleißosomalen U snRNPs könnte zu einer Akkumulation von ungespleißter prä-mRNA und somit zur Apoptose der Zellen führen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass SMN mit Motorneuronen-spezifischen Faktoren assoziiert ist und eine verminderte SMN-Expression so zu einem selektiven Absterben der Motorneuronen führt. Biochemische Studien, die aufzeigen, wie der SMN-Komplex in Motorneuronen zusammengesetzt ist, werden weiteren Aufschluss über die molekularen Ursachen der Spinalen Muskelatrophie liefern.

6.10 SMNrp: ein Tudor-Domänen-Protein, das die Zusammenlagerung des Spleißosoms steuert

In den vorangegangenen Abschnitten wurde SMN als ein Zusammenlagerungsfaktor von spleißosomalen U snRNPs charakterisiert. In der Hoffnung, mehr über die Funktion dieser neuartigen Proteinklasse herauszufinden, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit nach homologen Proteinen gesucht. Mit Hilfe von Datenbankanalysen wurde ein Protein identifiziert, das im zentralen Bereich eine Homologie von 42% zu SMN aufweist, während die flankierenden Bereiche stark divergierten (< 2%). Dieses Protein besitzt wie SMN eine Tudor-Domäne und wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu SMN als SMNrp (SMN related protein) bezeichnet (Talbot *et al.*, 1998).

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Funktion von SMNrp wurde von Neubauer et al. (1998) geliefert. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass SMNrp eine Komponente von partiell gereinigten Spleißosomen ist. Es konnte aber nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob SMNrp tatsächlich eine Funktion beim Spleißen von prä-mRNA-Molekülen ausübt, oder ob es sich um eine nichtspezifische Verunreinigung in diesen Präparationen handelte (Neubauer *et al.*, 1998).

6.11 SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor

Durch verschiedene experimentelle Ansätze konnte in dieser Arbeit eine Funktion von SMNrp beim Spleißen nachgewiesen werden. Erstens ließ sich durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass SMNrp mit Perichromatinfibrillen assoziiert ist. In diesen subnukleären Strukturen findet neben der Transkription auch das Spleißen von prä-mRNA-Molekülen statt (Spector, 1996) (Abb.: 5.25). Zweitens inhibierten Antikörper, die gegen SMNrp gerichtet waren, die Spleißreaktion bereits vor der ersten Transesterifizierungsreaktion, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Abb.: 5.29). Drittens konnte ein direkter Beweis für eine Rolle von SMNrp beim Spleißen durch biochemische Studien erbracht werden. HeLa-Kernextrakt, aus dem SMNrp depletiert wurde, konnten das Spleißen von prä-mRNA Molekülen nicht mehr gewährleisten. Diese Inhibition konnte vollständig durch die Readdition von rekombinantem, bakteriell exprimierten SMNrp rückgängig gemacht werden (Abb.: 5.30). SMNrp ist demnach ein essentieller Spleißfaktor, dessen Funktion bereits vor der Katalyse der Spleißreaktion zu suchen ist.

Datenbankanalysen ergaben, dass SMNrp ein evolutionär konserviertes Protein ist und putative Orthologe in der Maus, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* existieren (Talbot *et al.*, 1998). Präliminäre Studien in der Spaltheife haben gezeigt, dass es sich bei spSMNrp (*S.pombe* SMNrp) um ein essentielles Gen handelt, dessen Verlust zu einer Akkumulation von prä-mRNA im Zellkern führt (S. Hannus, persönliche Mitteilung).

6.12 SMNrp ist mit dem U2 snRNP assoziiert

Mehrere Beobachtungen weisen darauf hin, dass SMNrp mit dem U2 snRNP assoziiert vorliegt. Zum einen wurde sowohl durch Dichtegradientenzentrifugation als auch durch anti-SMNrp Immunpräzipitation eine spezifische Interaktion von SMNrp mit dem U2 snRNPs beobachtet (Abb.: 5.26 und 5.27). Konsistent mit diesen Ergebnissen war zum anderen die Beobachtung, dass SMNrp mit den spleißosomalen Komplexen A und B während des Spleißzyklus assoziiert ist (Abb.: 5.28). Für beide Komplexe wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass sie das U2 snRNP enthalten (Kramer, 1996). Aufgrund der Instabilität in nativen Gelen es bislang unklar, ob SMNrp auch mit dem C-Komplex, d.h. mit dem katalytisch aktiven Spleißosom, der auch das U2 snRNP enthält (Kramer, 1996), interagiert. Die Proteinkomposition des U2-Partikels ist sowohl in der Hefe als auch im HeLa-System intensiv erforscht worden. Die Tatsache, dass SMNrp bislang nicht als integrales U2-Protein identifiziert worden war (Behrens *et al.*, 1993), kann einerseits in seiner Promiskuität in Gelen

begründet liegen (SMNrp komigriert mit dem U2 spezifischen Protein A' in SDS-Gelen) andererseits aber auch Zeichen einer transienten Wechselwirkung mit dem 17S U2 snRNP sein. Hierfür sprechen sowohl die geringe Abundanz dieses Proteins im Vergleich zu den anderen U2-Komponenten als auch die sehr Salz-sensitive Assoziation mit dem 17S U2 snRNP in Dichtegradientenzentrifugationen. Weitere Studien zur Identifizierung von Proteinkomponenten, die auf der U2-Seite die Interaktion mit SMNrp vermitteln könnten, sind im Gange und sollten bald Aufschluss über diese Frage geben.

Die Interaktionen der U2 spezifischen Proteine miteinander und die Assoziation mit der „branch point“-Region der prä-mRNA sind sowohl im Hefe- als auch im Spleißsystem der Säuger sehr gut verstanden (Kramer, 1996; Reed, 2000). Einige dieser Proteine, wie z.B. SAP60 oder SAP62 sind für die Rekrutierung des U2 snRNPs an den E-Komplex, und damit für die Ausbildung des prä-Spleißosoms (A-Komplex), von Bedeutung (Caspary and Seraphin, 1998; Caspary *et al.*, 1999; Hodges and Beggs, 1994; Reed, 1996). Im Gegensatz zu diesen Faktoren scheint SMNrp nicht an der Rekrutierung des U2 snRNPs zum E-Komplex beteiligt zu sein, da sich der A-Komplex auch in Extrakten bildet, aus denen SMNrp entfernt worden war (Abb.: 5.31). Demnach liegt die Funktion von SMNrp wohl bei späteren Schritten der Spleißosomen-Bildung.

6.13 SMNrp interagiert direkt mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP

Die Depletion von SMNrp blockiert die Umwandlung des A-Komplexes (prä-Spleißosom) in den B-Komplex (reifes Spleißosom). Dieser zentrale Schritt bei der Entstehung des reifen Spleißosoms ist durch die Rekrutierung des [U4/U6.U5]-tri-snRNP zum prä-Spleißosoms gekennzeichnet. Es war daher eine attraktive Spekulation, dass SMNrp hierbei eine Rolle spielen könnte. Obwohl nur sehr wenig über diesen Schritt bekannt ist, gibt es Hinweise, dass sowohl RNA-RNA als auch Protein-Protein Wechselwirkungen bei der Ausbildung des B-Komplexes von Bedeutung sind. In höheren Eukaryonten wird die Assoziation des [U4/U6.U5]-tri-snRNP an den A-Komplex von sogenannten SR-Proteinen unterstützt (Roscigno and Garcia-Blanco, 1995). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde kürzlich das tri-snRNP Protein Prp31 identifiziert, das an der Interaktion dieses snRNPs mit dem A-Komplex beteiligt sein könnte (Weidenhammer *et al.*, 1996). Die Analyse des humanen Prp31-Homologs (61K-Protein) im HeLa-System ergab, dass die Depletion dieses Proteins die Spleißosomenzusammenlagerung, ähnlich wie für SMNrp beobachtet, auf der Stufe des prä-Spleißosoms arretiert. Weiterführende Analysen ergaben jedoch, dass das 61K-Protein für die Ausbildung des tri-snRNPs verantwortlich ist und auf diese Weise für die Zusammenlagerung

des reifen Spleißosoms notwendig ist. Zusätzlich zu den beschriebenen Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten direkte Kontakte der U2 snRNA mit den snRNAs des [U4/U6.U5]-tri-snRNPs nachgewiesen werden, die ebenfalls bei der Ausbildung des funktionellen Spleißosoms eine essentielle Rolle spielen (Datta and Weiner, 1991; Sun *et al.*, 1998; Wolff and Bindereif, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch verschiedene Experimente nachgewiesen, dass SMNrp tatsächlich Kontakte zum tri-snRNP herstellen kann und damit möglicherweise als „Rekrutierungsfaktor“ für dieses Partikel wirken könnte. Einen ersten experimentellen Hinweis auf eine Interaktion von SMNrp mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP lieferten *in vitro* Bindungsstudien. Es konnte in diesen Experimenten nachgewiesen werden, dass die Inkubation von GST-SMNrp mit nukleären HeLa-Extrakten unter definierten Bedingungen zur Anlagerung des U2 snRNPs und des tri-snRNPs führt. Das U1-Partikel als häufigstes snRNP in Zellkernextrakten, war dagegen nur sehr schwach zu finden. Diese Ergebnisse sind mit der Hypothese konsistent, dass SMNrp seine Funktion bei der Spleißosomenzusammenlagerung durch Interaktion mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP erfüllt (Abb.: 5.38). In Extrakten, in denen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen das U5 snRNP vom U4/U6 snRNP gelöst worden war (Utans *et al.*, 1992), konnte gezeigt werden, dass SMNrp mit dem U4/U6 snRNP wechselwirkt (Abb.: 5.39). Interessanterweise interagiert das 90 kDa-Protein, eine Komponente des U4/U6 snRNPs, *in vitro* direkt mit SMNrp. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass das 90 kDa-Protein mit einem weiteren U4/U6 snRNP-spezifischen Protein, dem 60kDa-Protein, direkt wechselwirkt (Lauber *et al.*, 1997). Diese Interaktion ist durch die Bindung von SMNrp an das 90 kDa-Protein keineswegs beeinflusst. Es läßt sich *in vitro* sogar ein trimerer Komplex aus GST-SMNrp, 90 kDa- und 60 kDa-Protein herstellen (Abb.: 5.40). SMNrp könnte demnach tatsächlich als „Rekrutierungsfaktor“ für den tri-snRNP fungieren und über das 90 kDa-Protein eine Brücke zwischen dem prä-Spleißosom und diesem Partikel schlagen.

Bislang konnte allerdings keine Interaktion von SMNrp und dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP in den Fraktionen von Dichtegradientenzentrifugationen nachgewiesen werden. Dies schließt aber eine transiente Interaktion nicht aus, die sowohl durch die Extraktpräparation als auch durch die Zentrifugation zerstört worden sein könnte. Weitere Arbeiten, wie zum Beispiel Protein-Protein-Vernetzungsexperimente *in vivo*, sollten es ermöglichen, den genauen Mechanismus der SMNrp - tri-snRNP-Interaktion und damit die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms aufzuklären.

Neueste Untersuchungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, dass in diesem Organismus keine schrittweise Zusammenlagerung des Spleißosoms an die prä-mRNA stattfindet. Die Reinigung eines prä-mRNA-freien spleißosomalen Komplexes, der alle am Spleißen beteiligten U snRNPs (U1, U2, U4, U5, U6) enthielt („penta-snRNP“), führte zu der Annahme, dass es in *S.cerevisiae* möglicherweise Spleißosomen gibt, die als vorgeformte Komplexe an die zu spleißenden Introns binden (Stevens *et al.*, 2002). Interessanterweise sind in diesem Organismus bislang keine Tudor-Domänen-Proteine wie SMNrp beschrieben worden. Es ist daher eine interessante Fragestellung, ob aufgrund des Fehlens von Tudor-Domänen-Proteinen in diesem Organismus kein schrittweises Zusammenlagern des Spleißosoms stattfindet, oder ob andere Proteine diese Funktion übernehmen. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass es auch im „penta-snRNP“ Faktoren gibt, die die Assoziation der einzelnen U snRNPs untereinander vermitteln. Die Identifizierung von funktionell SMNrp-homologen Proteinen in *S. cerevisiae* könnte weiteren Aufschluß über die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms liefern.

6.14 SMNrp besitzt verschiedene funktionelle Sequenzabschnitte

Die gleichzeitige Interaktion von SMNrp mit dem U2 snRNP und dem tri-snRNP legte die Vermutung nahe, dass dieses Protein unterschiedliche essentielle Sequenzbereiche besitzt. Durch Mutationsanalysen konnten in SMNrp tatsächlich mehrere relevante Abschnitte identifiziert werden. Erste Hinweise auf funktionelle Bereiche lieferte die Entdeckung des SMNrp-Homologs in *Schizosaccharomyces pombe*. Sowohl der N-Terminus als auch die Tudor-Domäne ist zwischen den beiden Proteinen stark konserviert (Abb.: 5.33). Dies führte zu Hypothese, dass diesen beiden Bereichen möglicherweise eine essentielle Funktion zukommt.

Ein Hinweis, dass die Tudor-Domäne von SMNrp ein funktionell relevanter Sequenzabschnitt ist, kam von der Untersuchung von SMNrp-Varianten, die Punktmutationen in dieser Domäne trugen (SMNrpmu1 und SMNrpmu2). Diese Mutanten vermochten nicht die Arretierung der Spleißosomen-Ausbildung auf dem A-Komplex in SMNrp-depletierten Extrakten aufzuheben, wie es durch die rekombinante wildtyp-Form von SMNrp beobachtet werden konnte (Abb.: 5.36). Sedimentationsanalysen mit rekombinanten Proteinen und HeLa-Kernextrakt zeigten, dass diese Mutanten in der Lage sind, mit dem U2-Partikel zu assoziieren (Abb.: 5.37). Demnach ist die Tudor-Domäne von SMNrp essentiell für die Funktion des Proteins. Sie ist aber nicht für die SMNrp-Integration in den U2 snRNP notwendig.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch dem N-Terminus (AS 1-70) eine funktionelle Relevanz zugeordnet werden. Hierbei wurde beobachtet, dass die Deletion dieses Bereiches (SMNrp Δ N) mit einem Funktionsverlust des Proteins einhergeht. SMNrp Δ N ist nicht mehr in der Lage, den A-Komplex-Arrest im SMNrp-depletierten Extrakt aufzuheben. Darüber hinaus wechselwirkt dieses Proteinfragment nicht mit dem U2 snRNP, wenn es in rekombinanter Form zu SMNrp-depletiertem Extrakt gegeben wird (Abb.: 5.36 und 5.37). Diese Befunde zeigten, dass der N-Terminus von SMNrp neben der Tudor-Domäne ein zweiter funktioneller Bereich ist. Dieser Sequenzabschnitt ist für die Bindung von SMNrp an das U2-Partikel verantwortlich.

6.15 SMNrp ist für die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms notwendig

Mit SMNrp wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Protein charakterisiert, das für die Assoziation des [U4/U6.U5]-tri-snRNP zum prä-Spleißosom notwendig ist. Während der Zusammenlagerung des Spleißosoms interagiert es dabei mit dem U2 snRNP und möglicherweise auch mit dem [U4/U6.U5]-tri-snRNP. Aus den in dieser Arbeit vorgelegten Daten läßt sich ein Modell zur Funktion von SMNrp ableiten (Abb.: 6.3). Nach der Assoziation des U1 snRNPs an die prä-mRNA und der Entstehung des E-Komplexes, wird das U2 snRNP Partikel rekrutiert. SMNrp ist in Abwesenheit von prä-mRNA mit dem U2 snRNP assoziiert und gelangt durch dieses Partikel zum prä-Spleißosom. Im so entstandenen

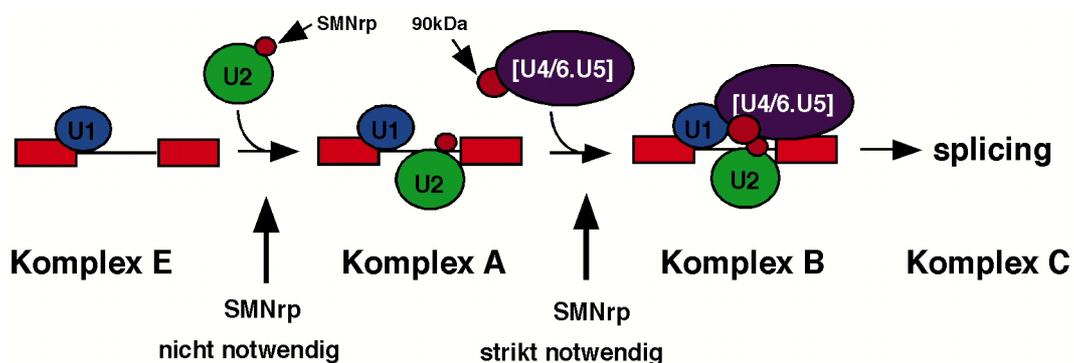


Abbildung 6.3: Modell der Funktion von SMNrp bei der Zusammenlagerung des Spleißosoms. Nach der Assoziation des U1 snRNPs an die prä-mRNA und der Entstehung des E-Komplexes, wird das U2 snRNP Partikel rekrutiert. SMNrp ist in Abwesenheit von prä-mRNA mit dem U2 snRNP assoziiert und gelangt durch dieses Partikel zum prä-Spleißosom. SMNrp ist dabei für die Bindung des U2 snRNPs an die prä-mRNA nicht notwendig. Im so entstandenen A-Komplex tritt SMNrp nun mit dem 90 kDa-Protein des [U4/U6.U5]-tri-snRNP in direkten Kontakt und vermittelt dadurch die Assoziation dieses Partikels an den A-Komplex. Für diesen Schritt ist SMNrp strikt notwendig.

A-Komplex tritt SMNrp nun mit dem 90 kDa-Protein des [U4/U6.U5]-tri-snRNP in direkten Kontakt und vermittelt dadurch die Assoziation dieses Partikels an den A-Komplex. Aufgrund der Größe des [U4/U6.U5]-tri-snRNPs ist es sehr wahrscheinlich, dass an diesem Schritt noch weitere Faktoren beteiligt sind. Durch die Instabilität des C-Komplexes im verwendeten Gel-System ist es gegenwärtig unklar, ob SMNrp auch im katalytisch aktiven Spleißosom zu finden ist, oder ob dieses Protein nur am Aufbau des reifen Spleißosoms beteiligt ist.

6.16 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zu SMN und SMNrp erlaubten erstmals Einblicke in die Funktionsweise von unterschiedlichen Tudor-Domänen-Proteine. Interessanterweise spielen beide Proteine im RNA-Metabolismus eine Rolle, wie bereits von Ponting et al. (1997) für die gesamte Proteinklasse vorgeschlagen wurde. Darüber hinaus sind beide Proteine sogar an der Ausbildung von RNA-Protein-Komplexen (RNPs) beteiligt. Diese Beobachtung führte zu der interessanten Hypothese, dass Tudor-Domänen-Proteine generell an der Zusammenlagerung von RNPs beteiligt sein könnten. Im Falle von SMN ist die Tudor-Domäne für die Bindung der Sm-Proteine, also den Proteinen, die aktiv an die U snRNA gebunden werden, verantwortlich (Buhler *et al.*, 1999). Diese Domäne ist bei SMN also für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich. Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften der Tudor-Domäne von SMNrp werden Aufschluß geben können, ob auch in diesem Fall eine Protein-Bindungsdomäne vorliegt und welche genaue Funktion sie bei der Ausbildung des Spleißosoms erfüllt.

Neben SMN und SMNrp gibt es noch weitere zelluläre Proteine, die eine Tudor-Domäne besitzen. Die funktionelle Analyse dieser Faktoren sollte zum weiteren Verständnis der Funktion dieser Proteinklasse beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M. and R, L. (1999) A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'- end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *Embo J*, **18**, 5789-5802.

Andreassi, C., Jarecki, J., Zhou, J., Coovert, D.D., Monani, U.R., Chen, X., Whitney, M., Pollok, B., Zhang, M., Androphy, E. and Burghes, A.H. (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet*, **10**, 2841-2849.

Behrens, S.E., Galisson, F., Legrain, P. and Luhrmann, R. (1993) Evidence that the 60-kDa protein of 17S U2 small nuclear ribonucleoprotein is immunologically and functionally related to the yeast PRP9 splicing factor and is required for the efficient formation of prespliceosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8229-8233.

Boelens, W.C., Palacios, I. and Mattaj, I.W. (1995) Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *RNA*, **1**, 273-283.

Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. and Luhrmann, R. (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *Rna*, **7**, 1531-1542.

Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L. and Lührmann, R. (2000) The C-terminal RG Dipeptide Repeats of the Spliceosomal Sm Proteins D1 and D3 Contain Symmetrical Dimethylarginines, Which Form a Major B-cell Epitope for Anti-Sm Autoantibodies. *J Biol Chem*, **275**, 17122-17129.

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**, 1259-1265.

Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S. and Clarke, S. (2001) PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem*, **276**, 32971-32976.

Bringmann, P. and Luhrmann, R. (1986) Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *Embo J*, **5**, 3509-3516.

Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmsen, K.C., Daniels, R., Davies, K.E., Leppert, M., Ziter, F., Wood, D. and et al. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*, **344**, 540-541.

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**, 2351-2357.

Burge, C.B., Tuschl, T. and Sharp, P.A. (1999) Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome. In Gesteland, R.F., Cech, T.R. and Atkins, J.F (eds), *The RNA World*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 525-560.

Campbell, L., Hunter, K.M., Mohaghegh, P., Tinsley, J.M., Brasch, M.A. and Davies, K.E. (2000) Direct interaction of Smn with dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum Mol Genet*, **9**, 1093-1100.

Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T. and Carmo-Fonseca, M. (1999) The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN. A link between snrnp biogenesis and the cajal (coiled) body. *J Cell Biol*, **147**, 715-728.

Caspary, F. and Seraphin, B. (1998) The yeast U2A'/U2B complex is required for pre-spliceosome formation. *Embo J*, **17**, 6348-6358.

Caspary, F., Shevchenko, A., Wilm, M. and Seraphin, B. (1999) Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *Embo J*, **18**, 3463-3474.

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**, 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**, 1177-1186.

Coovert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W. and Burghes, A.H. (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **6**, 1205-1214.

Datta, B. and Weiner, A.M. (1991) Genetic evidence for base pairing between U2 and U6 snRNA in mammalian mRNA splicing. *Nature*, **352**, 821-824.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-1489.

Eckerskorn, C. and Lottspeich, F. (1989) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia*, **28**, 92-94.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.

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

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475-483.

Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, **90**, 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**, 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**, 573-583.

Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G. (2001a) SMN, the Product of the Spinal Muscular Atrophy Gene, Binds Preferentially to Dimethylarginine-Containing Protein Targets. *Mol. Cell*, **7**, 1111-1117.

Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2001b) The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol*, **21**, 8289-8300.

Frugier, T., Tiziano, F.D., Cifuentes-Diaz, C., Miniou, P., Roblot, N., Dierich, A., Le Meur, M. and Melki, J. (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **9**, 849-858.

Gesteland, R.F., Cech, T.R. and Atkins, J.F (eds), *The RNA World*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Grundhoff, A.T., Kremmer, E., Türeci, Ö., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Müller-Lantzsch, N., Schubach, W.H. and Grässer, F.A. (1999) Characterisation of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.*, **27**, 19136-19144.

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**, 569-577.

Harlow, E. and Lane, D.P. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-1858.

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**, 2076-2088.

Hodges, P.E. and Beggs, J.D. (1994) RNA splicing. U2 fulfils a commitment. *Curr Biol*, **4**, 264-267.

Hsieh-Li, H.M., Chang, J.G., Jong, Y.J., Wu, M.H., Wang, N.M., Tsai, C.H. and Li, H. (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **24**, 66-70.

Huber, J., Dickmanns, A. and Luhrmann, R. (2002) The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J Cell Biol*, **156**, 467-479.

Hunt, S.L., Hsuan, J.J., Totty, N. and Jackson, R.J. (1998) unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.*, **13**, 347-448.

Jablonka, S., Bandilla, M., Wiese, S., Buhler, D., Wirth, B., Sendtner, M. and Fischer, U. (2001) Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **10**, 497-505.

Jablonka, S., Holtmann, B., Meister, G., Bandilla, M., Rossoll, W., Fischer, U. and Sendtner, M. (2002) Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10126-10131.

Jankowsky, E., Gross, C.H., Shuman, S. and Pyle, A.M. (2001) Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science*, **291**, 121-125.

Jones, K.W., Gorzynski, K., Hales, C.M., Fischer, U., Terns, R.M. and Terns, M.P. (2001) Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the core snoRNP protein fibrillarin. *submitted*.

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**, 375-387.

Kramer, A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*, **65**, 367-409.

Krapivinsky, G.B., Ackerman, M.J., Gordon, E.A., Krapivinsky, L.D. and Clapham, D.E. (1994) Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell*, **76**, 439-448.

Lauber, J., Plessel, G., Prehn, S., Will, C.L., Fabrizio, P., Groning, K., Lane, W.S. and Luhrmann, R. (1997) The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p. *Rna*, **3**, 926-941.

Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, 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 [see comments]. *Cell*, **80**, 155-165.

Lefebvre, S., Burlet, 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**, 265-269.

Lerner, E.A., Lerner, M.R., Hardin, J.A., Janeway, C.A. and Steitz, J.A. (1981) Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2737-2741.

Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J*, **15**, 3555-3565.

Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, **90**, 1013-1021.

Lorson, C.L. and Androphy, E.J. (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*, **9**, 259-265.

Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. and Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6307-6311.

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

Mattaj, I.W. (1988) U snRNP assembly und transport. In Birnstiel, M. (ed.) *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*. Springer Verlag, Berlin/NewYork, pp. 100-114.

McBride, A.E. and Silver, P.A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, **106**, 5-8.

Meister, G., Buhler, D., Laggerbauer, 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**, 1977-1986.

Melki, J., Abdelhak, S., Sheth, P., Bachelot, M.F., Burlet, P., Marcadet, A., Aicardi, J., Barois, A., Carriere, J.P., Fardeau, M. and et al. (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*, **344**, 767-768.

Mitchell, J.R., Cheng, J. and Collins, K. (1999) A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol*, **19**, 567-576.

- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H. and McPherson, J.D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, **8**, 1177-1183.
- Monani, U.R., Sendtner, M., Coover, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossol, W., Prior, T.W., Morris, G.E. and Burghes, A.H. (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **9**, 333-339.
- 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**, 891-901.
- Murray, A.W. (1991) Cell cycle extracts. In Kay, B.K. and Peng, H.B. (eds.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, Inc., New York, Vol. 36, pp. 581-604.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. and Mann, M. (1998) Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet*, **20**, 46-50.
- Pearn, J. (1978) Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet*, **10**, 260-265.
- Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B. and Dreyfuss, G. (2001) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol*, **11**, 1079-1088.
- 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**, 7540-7545.

Pillai, R.S., Will, C.L., Luhrmann, R., Schumperli, D. and Muller, B. (2001) Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *Embo J*, **20**, 5470-5479.

Plessel, G., Fischer, U. and Lurmann, 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**, 4160-4172.

Pollack, B.P., Kotenko, S.V., He, W., Izotova, L.S., Barnoski, B.L. and Pestka, S. (1999) The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem*, **274**, 31531-31542.

Ponting, C.P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci*, **22**, 51-52.

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**, 4113-4120.

Raker, V.A., Hartmuth, K., Kastner, B. and R, L. (1999) Spliceosomal U snRNP Core Assembly: Sm Proteins Assemble onto an Sm Site RNA Nonanucleotide in a Specific and Thermodynamically Stable Manner. *Mol Cell Biol*, **19**, 6554-6565.

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**, 2256-2269.

Reed, R. (1996) Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 215-220.

Reed, R. (2000) Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 340-345.

Rho, J., Choi, S., Seong, Y.R., Cho, W.K., Kim, S.H. and Im, D.S. (2001) Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J Biol Chem*, **276**, 11393-11401.

Roberts, D.G., Chavez, J. and Court, S.D.M. (1970) The genetic component in child mortality. *Arch. Dis.Child*, **45**, 33-38.

Roscigno, R.F. and Garcia-Blanco, M.A. (1995) SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *Rna*, **1**, 692-706.

Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S. and Seraphin, B. (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *Embo J*, **18**, 3451-3462.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Schmalbruch, H. and Haase, G. (2001) Spinal muscular atrophy: present state. *Brain Pathol*, **11**, 231-247.

Schrank, B., Gotz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G. and Sendtner, M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9920-9925.

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**, 27-31.

Sendtner, M. (2001) Molecular mechanisms in spinal muscular atrophy: models and perspectives. *Curr Opin Neurol*, **14**, 629-634.

Seraphin, B. (1995) Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *Embo J*, **14**, 2089-2098.

Singh, R. and Reddy, R. (1989) Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc Nat Acad Sci USA*, **86**, 8280-8283.

Spector, D.L. (1996) Nuclear organization and gene expression. *Exp Cell Res*, **229**, 189-197.

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**, 539-542.

Stevens, S.W., Ryan, D.E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D. and Abelson, J. (2002) Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol Cell*, **9**, 31-44.

Sun, J.S., Valadkhan, S. and Manley, J.L. (1998) A UV-crosslinkable interaction in human U6 snRNA. *Rna*, **4**, 489-497.

Talbot, K., Miguel-Aliaga, I., Mohaghegh, P., Ponting, C.P. and Davies, K.E. (1998) Characterization of a gene encoding survival motor neuron (SMN)-related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Hum Mol Genet*, **7**, 2149-2156.

Terns, M.P., Dahlberg, J.E. and Lund, E. (1993) Multiple cis-acting signals for export of pre-U1 snRNA from the nucleus. *Genes Dev*, **7**, 1898-1908.

Toro, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Seraphin, B. and Suck, D. (2001) RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *Embo J*, **20**, 2293-2303.

Urlaub, H., Raker, V.A., Kostka, S. and Luhrmann, R. (2001) Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *EMBO J*, **20**, 187-196.

Utans, U., Behrens, S.E., Luhrmann, R., Kole, R. and Kramer, A. (1992) A splicing factor that is inactivated during in vivo heat shock is functionally equivalent to the [U4/U6.U5] triple snRNP-specific proteins. *Genes Dev*, **6**, 631-641.

Weidenhammer, E.M., Singh, M., Ruiz-Noriega, M. and Woolford, J.L., Jr. (1996) The PRP31 gene encodes a novel protein required for pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1164-1170.

Will, C.L. and Luhrmann, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 290-301.

Wirth, B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat*, **15**, 228-237.

Wolff, T. and Bindereif, A. (1995) Mutational analysis of human U6 RNA: stabilizing the intramolecular helix blocks the spliceosomal assembly pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1263**, 39-44.

Yang, H., Moss, M.L., Lund, E. and Dahlberg, J.E. (1992) Nuclear processing of the 3'-terminal nucleotides of pre U1 snRNA in *Xenopus laevis* Oocytes. *Mol Cell Biol*, **12**, 1553-1560.

8 Anhang

8.1 Aminosäuresequenzen

```

1      MGQEPRTLPPSPNWYCARCSDAVPGGFLGFAARTSVFLVRVGPAGESPG 50
51     TPPFRVIGELVGHTERVSGFTFSHHPGQYNLCATSSDDGTVKIWDVETKT 100
101    VVTEHALHQHTISTLHWSPRVKDLIVSGDEKGVVFCYWFNRNDSQHLFIE 150
151    PRTIFCLTCSPHHEDLVAIGYKDGIVVIIDISKKGEVIHRLRGHDDEIHS 200
201    IAWCPLPGEDCLSINQEETSEEAEITNGNAVAQAPVTKGCYLATGSKDQT 250
251    IRIWSCSRGRGVMILKLPFLKRRGGIDPTVKERLWLTTLHWPSNQPTQLV 300
301    SSCFCGGELLQWDLTQSWRRKYTLFSASSEGNHSRIVFNLCPLQTEDDKQ 350
351    LLLSTSMDRDVKCWDIATLECSWTLPSLGGFAYSIAFSSVDIGSLAIGVG 400
401    DGMIRVWNTLSIKNNYDVKNFWQGVKSKVTALCWHPTKEGCLAFGTDDGK 450
451    VGLYDTYSNKPPQISSTYHKKTVYTLAWGPPVPPMSLGGEGDRPSLALYS 500
501    CGGEGIVLQHNPKLSGEAFDINKLIRDNTSIKYKLPVHTEISWKADGKI 550
551    MALGNEDGSIEIFQIPNLKLICTIQQHHKLVNTISWHHEHGSQPELSYLM 600
601    ASGSNNAVIYVHNLKTVIESSPESPVTTITEPYRTLSTGHTAKITVAWSPH 650
651    HDGRLVSASYDGTAVWDALREEPLCNFRGHQGRLLCVAWSPLDPDCIYS 700
701    GADDFCVHKWLTSMQDHSRPPQGKKSIELEKKRLSQPKAKPKKKKKPTLR 750
751    TPVKLESIDGNEEESMKENSGPVENGVSQDEGEEQAREPELPCGLAPAVS 800
801    REPVICTPVSSGFEEKSVTINNKVILLKKEPPKEKPETLIKKRKARSLLP 850
851    LSTSLDHRKEELHQDCLVLAATAKHSRELNEDVSADVEERFHLGLFTDRA 900
901    TLYRMIDIEGKGHLENGHPFLFQMLMLWKGDLKGVLQTAAERGELTDNLV 950
951    AMAPAAGYHVWLWAVEAFKQLCFQDQYVKAASHLLSIHKVYEAVELLKS 1000
1001   NHFYREAIAIAKARLRPEDPVLKDLYLSWGTVLERDGHYAVAAKCYLGAT 1050
1051   CAYDAAKVLAKKGDAASLRATAELAAIVGEDELSASLALRCAQELLLANN 1100
1101   WVGAEALQLHESLQQRVLFCLLELLSRHLEEKQLSEGKSSSSYHTWNT 1150
1151   GTEGPFVERVTAVWKSIFSLDTPQYQEAFOKLQNIKYPSATNNTPAKQL 1200
1201   LLHICHDLTLAVLSQOMASWDEAVQALLRAVRSYDSGSFTIMQEVYSAF 1250
1251   LPDGCDDLRLDGLDQSPATPAFKSLEAFFLYGRLYEFWWSLSRCPNSS 1300
1301   VWVRAGHRTLSVEPSQQLDTASTEETDPETSQPEPNRPSELDRLRLEEGE 1350
1351   RMLSTFKELFSEKHASLQNSQRTVAEVQETLAEMIRQHQSOLCKSTANG 1400
1401   PDKNEPEVEAEQPLCSSSQCKEEKNEPLSLPELTKRLTEANQORMAKFPE 1450
1451   SIKAWPFDPVLECLVLLLRSHFPGCLAQEMQQQAQELLQKYGNTKTYR 1500
1501   RHCQTFCM*

```

Abbildung 8.1: Aminosäuresequenz von p175.

```

1      MDLGPLNICEEMTILHGGFLLAEQLFHPKALAELTTKSDWERVGRPIVEAL 50
51     REISSAAAHSQPFAWKKKALIIIWAKVLQPHVTPSDTETRWQEDLFFSV 100
101    GNMIPTINHTILFELLKSLEASGLFIQLLMALPTTICHAELERFLEHVTV 150
151    D TSAEDVAFFLDIWWEVMKHKGHPQDPLLSQFSAMAHK YLPALDEFPHPP 200
201    KRLRSDPDACPTMPLLAMLRLGLTQIQSRILGPGRKCCALANLADMLTVF 250
251    ALTEDDPQEVSATVYLDKLATVISVWNSDTQNPYHQALAEKVKEAERDV 300
301    SLTSLAKLPSETIFVGCEFLHLLREWGEELQAVLRSSQGTSYDSYRLCD 350
351    SLTSFSQNATLYLNRTSLSKEDRQVVSELAECVRDFLRKTS TVLKNRALE 400
401    DITASIAMAVIQQKMDRHMEVCIYIFASEKKWAFSDEWVACLGSNRALFRE 450
451    PDLVLRLLLETVIDVSTADRAIPESQIRQVIHLILECYADLSLPGKNKVLA 500
501    GILRSWGRKGLSEKLLAYVEGFQEDLNTTFNQLTQSASEQGLAKAVASVA 550
551    RLVIVHPEVTVKKMCSLAVVNLGTHKFLAQILTAFFPALRFVEVQGPNSSA 600
601    TFMVSLKETVWMKFSTPKEEKQFLELLNCLMSPVKPQGIPVAALLEPDE 650
651    VLKEFVLPFLRLDVEEVDLSLRIFIQTLEANACREEYWLQTCSPFPLLFS 700
701    LCQLLDRFSKYWQLPKEKRCLSLDRKDLAIHILELLCEIVSANAETFSPD 750
751    VWIKSLSWLHRKLEQLDWTVGLRLKSFFEGHFKCEVPATLFEICKLSEDE 800
801    WTSQAHPGYGAGTGLLAWMECCCVSSGISERMLSLLVVDVGNPEEVRLFS 850
851    KGFLVALVQVMPWCSPQEWQRLHQLTRRLLEKQLLHVPYSLEYIQFVPLL 900
901    NLKPFAQELQLSVLFLRTTFQFLCSHSCRNWLPLEGWNHVVKLLCGSLTRL 950
951    LDSVRAIQAGPWVQGPEQDLTQEALFVYTQVFCHALHIMAMLHPEVCEP 1000
1001  LYVLALETLTCYETLSKTNPSVSSLLQRAHEQRFLKSIAEGIGPEERRQT 1050
1051  LLQKMSSF* 1058

```

Abbildung 8.2: Aminosäuresequenz von Gemin4/GIP1. Ein putativer Leucin-Zipper ist unterstrichen.

A

1	msewmkkgplewqdyiykevrvtasekney	30
31	kgwvlt dpvsanivlvn fledgmsvtgim	60
61	ghavqtvvetm negdhrvrek lmhlftsgdc	90
91	kayspedleerknslkkwleknhipitegg	120
121	daprtlcvagvltidppygpencsssneii	150
151	lsrvqd lieghltasq	166

B

1	MRKETPPPLVPPAAREWNLPPNAPACMERQLEAARYRSDG	40
41	ALLLGASSLSGRCWAGSLWLFKDP CAAPNEGFC SAGVQTE	80
81	AGVADLTWVG ERGILV ASDSGAVELWELDENETLIVSKFC	120
121	KYEHDDIVSTVSVLSSGTQAVSGSKD ICIKVWDLAQQVVL	160
161	SSYRAHAAQVTCVAASPHKDSVFLSCE DN RILL WD TRCP	200
201	KPASQIGCSAPGYLPTSLAWHPQOSEVVFVGDENGTVSLV	240
241	DTKSTSCVLSSAVHSQCVTGLVFSPHSV PFLASLSEDCSL	280
281	AVLDSSSELFRSQAHRDFVRDATWSPLNHSLLLTTVGWDH	320
321	QVVHHVVPTEPLPAPGPASVTE*	342

Abbildung 8.3: **A.** Aminosäuresequenz von Gemin6. **B.** Aminosäuresequenz von WD45. Das WD-Motiv ist hervorgehoben.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	mikro
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Centimeter
cpm	Zerfälle pro Minute (engl.: counts per minute)
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
d	desoxy
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	Dithiotreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
engl.:	englisch
et al.	und andere (lat.: et alterae)
Exon	Protein-kodierender Abschnitt innerhalb einer prä-mRNA
g	Gramm
GpppG	Guanylyl-(5'-5')-Guanosin-Triphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Intron	nicht kodierender Abschnitt innerhalb einer prä-mRNA
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k	kilo
kb	Basenpaare in Tausend
kDa	kiloDalton
l	Liter
m	Meter
M	molar
mA	milli Ampere
m ₃ G	N ² ,N ² ,N ⁷ -Trimethylguanosin
m ₇ G	N ⁷ -Monomethylguanosin
Mapp ^R	apparente Molekülmasse
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger-RNA)
P	Phosphat

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate-buffered saline)
pCp	Cytidin-3'-5'-Bisphosphat
prä-mRNA	Primärtranskript einer mRNA
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
SIP1	SMN interagierendes Protein 1
SMA	Spinale Muskelatrophie
<i>SMN</i>	Survival Motor Neurons Gen
<i>Smn</i>	Survival Motor Neurons Gen der Maus
SMN	Survival Motor Neurons Protein
snRNA	kleine nukleäre RNA (engl.: small nuclear RNA)
snRNP	kleines nukleäres RNP (engl.: small nuclear RNP)
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (engl.: small nucleolar RNA)
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (engl.: small nucleolar RNP)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
vol	Volumenanteil

w/v Gewichtsanteil am Gesamtvolumen

z.B. zum Beispiel

8.3 Buchstabensymbole für Aminosäuren und Nukleotide

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	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Nukleotidbasen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

8.4 Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Artikeln publiziert:

Meister, G., Buhler, D., Laggerbauer, 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**, 1977-1986.

Meister, G., Hannus, S., Plottner, O., Baars, T., Hartmann, E., Fakan, S., Laggerbauer, B. and Fischer, U. (2001) SMNrp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *EMBO J*, **20**, 2304-2314.

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**, 945-949.

Meister, G., Eggert, C., Buehler, D., Brahms, H., Kambach, C. and Fischer, U. (2001) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Current Biology*., **11**, 1990-1994.

Malatesta M., Scassellati C., Fakan S., **Meister G.**, Plöttner O., Bühler D., Sowa G., Martin T. and Fischer U (2002) Survival of motor neuron (SMN) protein accumulates in nuclear domains different from coiled (Cajal) bodies. *submitted to J Cell Science*

8.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Fischer, sowohl für die Überlassung des Themas als auch für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung bei allen auftretenden Problemen.

Herrn Prof. Dr. T. Bonhoeffer bin ich für die Vertretung dieser Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München sehr dankbar.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. S. Fakan (Universität Lausanne) für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei Dr. C. Kambach (Villingen, Schweiz) für die heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe und bei Prof. R. Lührmann (MPI für biophysikalische Chemie Göttingen) für die freundliche Überlassung von gereinigten U snRNPs bedanken.

Danken möchte ich auch Bernhard für die Hilfe beim Schreiben der Publikationen sowie für das Lesen der vorliegenden Dissertation und den hilfreichen Anregungen dazu. Die zahlreichen gemeinsamen Besuche beim FC Bayern und im Olympiastadion haben darüber hinaus meinen Blick auf die wirklich wichtigen Dinge im Leben gerichtet.

Bei Stefan, Oliver, Dirk, Michael, Gaby, Eva, Massimo, Farah, Christian und Martin möchte ich mich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit während meiner Doktorarbeit bedanken. Hervorheben möchte ich Gaby, die mich während der gesamten Zeit durch zahlreiche Klonierungen unterstützt hat.

Mein größter Dank gilt Katrin. Sie stellte für mich einen familiären Bezugspunkt dar, der mir den nötigen Abstand zur Arbeit gab und in dem sich das wirkliche Leben abspielte.

8.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Meister
Vorname: Gunter
Wohnort: Terofalstrasse 9, 80689 München
Geburtsdatum: 21. März 1974
Geburtsort: Hof/Saale
Familienstand: verheiratet, Sohn Jannis

Schulische Ausbildung und Wehrdienst

1994 Allgemeine Hochschulreife
1994-1995 Wehrdienst

Studium

1995-1997 Grundstudium Biologie an der Universität Bayreuth
1997 Vordiplom im Fach Biologie
1997-1999 Hauptstudium Biologie an der Universität Bayreuth
1999 Diplom im Fach Biologie, Hauptfach Genetik (Note 1.3)
1998-1999 Diplomarbeit am Max Planck Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Fischer.
Thema: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines „survival of Motor neurons“ (SMN) homologen Proteins

Promotion

1999-2002 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max Planck Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Fischer.
März 2002 Verleihung des „junior research awards“ des MPI für Biochemie für die Arbeiten zur Biogenese spleißosomaler U snRNPs.

8.7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

München im August 2002