

**Interaktion des Wachstumsfaktors FGF-2 mit dem survival of
motoneuron (SMN) Protein**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer.nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Alexander-Francisco Bruns

geboren am 04.I.1977, in Hannover

2007

Referent: PD Dr. Peter Claus

Abteilung Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Gerd Bicker

Institut für Physiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 21.III.2007

**Was wir selbst tun können,
das dürfen wir Gott nicht überlassen.**

Gorch Fock

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen FGF-2²³ und dem survival of motoneuron Protein genauer charakterisiert. Beide Proteine interagieren direkt und bevorzugt im Zellkern miteinander. Die Bindedomäne von FGF-2²³ überlappt sowohl mit einer Nukleinsäure-bindenden Domäne als auch mit der Interaktionsdomäne von Gemin2. Während FGF-2²³ nicht mit U2 snRNA um die Bindung an SMN kompetiert, kompetiert es mit Gemin2. Dabei wird Gemin2, eine Kernkomponente des SMN-Komplexes, aus diesem verdrängt. Auf zellulärer Ebene macht sich diese Verdrängung durch die verringerte Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern bemerkbar. Dies gilt zum einen für das hier gewählte Zellkulturmodell, in dem FGF-2²³ überexprimiert wird. Zum anderen auch für transgene Mäuse, die alle Isoformen des humanen FGF-2 überexprimieren. Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluß der RG-Motive, die charakteristisch für die hochmolekularen Isoformen von FGF-2 sind, auf die intranukleäre Lokalisation von FGF-2 untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die korrekte intranukleäre Lokalisation der hochmolekularen Isoformen des Fibroblastenwachstumsfaktors-2 sowohl von der Anzahl der RG-Motive als auch von der Kernlokalisationssequenz im Carboxyterminus des Proteins abhängt. Die RG-Motive von FGF-2 sind ein Substrat der Protein-Arginin-Methyltransferase 1 (Klein et al., 2000). Während PRMT1 RG-Motive asymmetrisch methyliert, erfolgt durch die Protein-Arginin-Methyltransferase 5 eine symmetrische Methylierung der RG-Motive (Herrmann et al., 2005; Rho et al., 2001). PRMT5 methyliert verschiedene Sm-Proteine, die eine Kernkomponente der U snRNPs darstellen. Diese Methylierung erhöht zudem die Spezifität der Bindung an das survival of motoneuron Protein (Brahms et al., 2001; Friesen et al., 2001). Die in dieser Arbeit gewonnenen *in vitro* Daten sprechen dafür, daß FGF-2²³ in einem Komplex mit PRMT5 vorliegt und von PRMT5 methyliert werden kann. Die Methylierung der RG-Motive beeinflusst die Lokalisation von FGF-2. FGF-2 läßt sich immunocytochemisch in der Zelle gleichmäßig verteilt nachweisen. Nach Einsatz des Methylierungshemmers AdOx läßt sich immunocytochemisch weniger FGF-2 im Zellkern finden. Mit Hilfe dieser Arbeit konnte ein tieferer Einblick in die Biologie des Fibroblastenwachstumsfaktors-2 und der Interaktion dieses Wachstumsfaktors mit dem SMN-Protein gewonnen werden.

Schlagworte: FGF-2, SMN, Kernkörper

Summary

In this dissertation work the interaction between the fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and the survival of motoneuron protein was characterised. Both proteins interact directly and preferentially in the nucleus. The binding domain of FGF-2²³ is overlapping with a binding domain for nucleic acids as well as with a binding domain of the protein Gemin2. Whilst FGF-2²³ does not compete with U2snRNA for binding on SMN, it competes with Gemin2. As a result of this competition Gemin2, which is a core component of the SMN-complex, is displaced out of this complex. On a cellular level this displacement can be noted by a loss of SMN-positiv nuclear bodies. This can be observed in the cell culture model we have chosen, in which FGF-2²³ is overexpressed. Also transgenic mice overexpressing all human isoforms of FGF-2 display a loss of SMN-positiv nuclear bodies. Furthermore the influence of RG-motifs, which are characteristic for the high molecular weight isoforms of FGF-2, on the intranuclear localisation of FGF-2 was analysed in this study. The intranuclear localisation of FGF-2 is dependent on the number of RG-motifs present and a nuclear localisation sequence in the C-terminus of FGF-2, which is common to all isoforms of this growth factor. The RG-motifs of FGF-2²³ can be methylated asymmetrically by the type I protein-arginine-methyltransferase PRMT1 (Klein et al., 2000). The type II methyltransferase PRMT5 is able to methylate arginin-residues which reside in RG-motifs in a symmetrical manner (Herrmann et al., 2005; Rho et al., 2001). PRMT5 methylates several Sm-proteins, which are a core component of U snRNPs. This posttranslational modification increases the binding specificity of Sm-proteins to the SMN-protein dramatically (Brahms et al., 2001; Friesen et al., 2001). The *in vitro* data obtained in this study suggest that FGF-2²³ resides in a common complex with PRMT5 and can be methylated by this type II protein-arginine-methyltransferase. The methylation of FGF-2²³ has an influence on the localisation of this protein. FGF-2 is distributed equally in the cell as detected by immunocytochemical means. After inhibition of methylation by the use of AdOx the distibution pattern of FGF-2 changes. FGF-2 can be found to localise in the nucleus to a lesser extent. This study contributes to broaden the knowledge of the FGF-2 biology as well as of the interaction of this growth factor and the SMN-protein.

Key words: FGF-2, SMN, nuclear bodies

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1 Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2)	1
1.1.1 Die Isoformen von FGF-2 werden ausgehend von verschiedenen Startcodons translatiert und lokalisieren differentiell in der Zelle	2
1.1.2 FGF-2 entfaltet seine Wirkung sowohl durch Bindung an FGF-Rezeptoren als auch als intrazelluläres Protein	4
1.2 Das survival of motoneuron (SMN) Protein	6
1.2.1 Das Krankheitsbild der Spinalen Muskelatrophie (SMA)	7
1.2.2 Mutationen im <i>SMN1</i> -Gen sind verantwortlich für die Ausbildung der SMA	8
1.2.3 Das SMN-Protein lokalisiert in verschiedenen Strukturen	10
1.2.4 Die nukleozentrische Hypothese der SMA-Pathogenese	11
1.2.5 Die axonale Hypothese der SMA-Pathogenese	12
1.2.6 Es existieren verschiedene Tiermodelle der SMA	13
1.3 Ziel dieser Studie	15
2. Material & Methoden	16
2.1 Biochemische Methoden	16
2.1.1 Immunpräzipitation	16
2.1.2 Protein-Gelelektrophorese	17
2.1.3 Western Blot	17
2.1.4 Pull down assay	18
2.1.5 Pull down competition assay	19
2.1.6 RNA-Bindungsversuch	20
2.1.7 FGF-2 ²³ -Methylierungsversuch	20

Inhaltsverzeichnis

2.1.8 Proteinexpression	21
2.1.9 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen	21
2.2 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1 Plasmidkonstrukte und Subklonierung	23
2.2.2 Transformation von Bakterien	25
2.2.3 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	25
2.3 Zellbiologische Methoden	26
2.3.1 Zellkultur und Transfektion	26
2.3.2 Demethylierung mit Adenosindialdehyd	26
2.3.3 Immuncytochemie	27
2.3.4 Zählung der SMN-positiven Kernkörper und statistische Auswertung	27
2.3.5 Mikroskopie	28
3. Ergebnisse	32
3.1 FGF-2²³ bindet direkt an die Aminosäurereste 1-90 des survival of motoneuron Proteins	32
3.2 Die Bindung von U2 snRNA an SMN wird durch FGF-2²³ nicht beeinflusst	35
3.3 FGF-2²³ kompetiert mit Gemin2/SIP1 um die Bindung an SMN	36
3.4 Die Überexpression von FGF-2²³ in HEK293T-Zellen führt zu einer Reduktion von SMN positiven Kernkörpern	37
3.5 Transgene FGF-2 Mäuse weisen eine verringerte Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern auf	40
3.6 FGF-2²³ bindet bevorzugt im Zellkern an SMN	42
3.7 FGF-2²³ liegt mit PRMT5 in einem gemeinsamen Komplex vor	45
3.8 Die Typ II Proteinmethyltransferase PRMT5 kann FGF-2²³ <i>in vitro</i> methylieren	46
3.9 Die Inhibition der FGF-2-Methylierung beeinflusst die zelluläre Lokalisation von FGF-2	48
3.10 Die intranukleäre Lokalisation von FGF-2 ist abhängig von der Anzahl der RG-Motive im Aminoterminus der hochmolekularen Isoformen	50

4. Diskussion	53
4.1 Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 interagiert direkt mit dem survival of motoneuron Protein	53
4.1.1 FGF-2 ²³ liegt in einem gemeinsamen Komplex mit PRMT5 vor und kann durch diese TypII Methyltransferase <i>in vitro</i> methyliert werden	54
4.1.2 FGF-2 ²³ kompetiert nicht mit U2 snRNA jedoch mit dem Protein Gemin2 um die Bindung an SMN	55
4.1.3 FGF-2 ²³ bindet bevorzugt im Zellkern an SMN	57
4.1.4 FGF-2 ²³ übt einen Einfluß auf die Stabilität SMN-positiver Kernkörper aus	58
4.2 Weitere Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von FGF-2	59
4.2.1 Die Inhibition der Methylierung der RG-Motive bewirkt eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von FGF-2	63
4.3 Modell für FGF-2 ²³ -Funktion	64
5. Literaturverzeichnis	67
6. Anhang	86

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AdOx	Adenosindialdehyd
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bichinonsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
°C	Grad Celsius
DsRed	rot-fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
HG-Motiv	Histidin / Glycin-reiches Motiv
HMW	hochmolekulare Isoformen von FGF-2
hnRNP	heterologes nukleäres Ribonukleoprotein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
min	Minuten
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
M	molar
MBP	myelin basic protein
mM	millimolar
mRNA	Botenribonukleinsäure
nm	Nanometer
P	Phosphat
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
RG-Motiv	Arginin / Glycin-reiches Proteinmotiv
RGG	Arginin / Glycin / Glycin-reiches Proteinmotiv
RIPA	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

Abkürzungen

SMA	Spinale Muskelatrophie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMN	survival of motoneuron Protein
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline-Tween
TgFGF	transgen für FGF
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-Diamin (TEMED)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminoethan
tRNA	transferierende Ribonukleinsäure
U	Aktivitätseinheit eines Enzyms
U snRNP	Uridin-reiches kleines Ribonukleopartikel
U snRNA	Uridin-reiche kleine Ribonukleinsäure
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
V	Volt
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μM	mikromolar

1. Einleitung

1.1 Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2)

Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor-2 gehört zu der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren. Diese umfaßt beim Menschen und *Mus musculus* 22 Mitglieder, die von jeweils unterschiedlichen Genen codiert werden (Itoh und Ornitz, 2004). Die Fibroblastenwachstumsfaktoren FGF-11 bis FGF-14 werden auch Fibroblastenwachstumsfaktor-ähnliche Faktoren genannt (Goldfarb, 2005; Ornitz und Itoh, 2001). Die Fibroblastenwachstumsfaktoren nehmen in der vertebraten Embryonal- und Fetalentwicklung einen großen Einfluß auf die Entwicklung des Mesoderms (Bottcher und Niehrs, 2005). Ein großer Einfluß läßt sich auch in physiologischen Prozessen des adulten Organismus und in der Tumorgenese finden (Grose und Dickson, 2005). Die meisten Fibroblastenwachstumsfaktoren besitzen eine Signalsequenz für die Sekretion durch das endoplasmatische Retikulum (ER) beziehungsweise den Golgi-Apparat. Nach der Sezernierung in die extrazelluläre Matrix können die FGFs an spezifische FGF-Rezeptoren binden. Diese induzieren durch die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität die Ras/ERK-Signaltransduktionskaskade, was letztendlich zu Zellwachstum, Zelldifferenzierung oder Zellmigration führt (Eswarakumar et al., 2005; Hadari et al., 2001; Hadari et al., 1998; Powers et al., 2000). Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Fibroblastenwachstumsfaktoren ist die Bindung an Heparansulfatproteoglycane, die an der Bildung des stabilen FGF-FGFR-Komplexes beteiligt sind und FGFs gegen proteolytische Degradation und thermische Denaturierung schützen (Wiedlocha und Sorensen, 2004). FGF-2 ist neben FGF-1 und FGF-3 das am besten untersuchte Mitglied der FGF-Familie. Es ist als angiogener Faktor bekannt und als potentiell Onkoprotein fähig Tumorwachstum und Malignität zu beeinflussen (Powers et al., 2000). FGF-2 wird in fast allen Zelltypen exprimiert und je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium differentiell reguliert (Grothe und Unsicker, 1990; Grothe et al., 1990; Lobb, 1988). FGF-2 liegt in Rodentia in drei Isoformen vor, einer 18 kDa-Isoform und zwei hochmolekularen (HMW) Isoformen mit 21 kDa beziehungsweise 23 kDa. Diese werden auch HMW-FGF-2 genannt (Powell und Klagsbrun, 1991).

1.1.1 FGF-2 wird ausgehend von verschiedenen Startcodons translatiert und lokalisiert differentiell in Zellen

Die verschiedenen Isoformen des Fibroblastenwachstumsfaktor-2 werden unter Nutzung verschiedener Startcodons von einer mRNA-Spezies translatiert (Prats et al., 1989; Touriol et al., 2003). Die 18 kDa-Isoform wird ausgehend von einem konventionellen Kozak AUG-Startcodon translatiert und stellt die Kernsequenz aller FGF-2-Isoformen dar. Die höhermolekularen Isoformen werden ausgehend von CUG-Startcodons translatiert, welche 5' des AUG-Startcodons liegen (Bugler et al., 1991; Florkiewicz et al., 1991; Prats et al., 1989). Die CUG-vermittelte Initiation der Translation wird durch *cis*-agierende Elemente, die in der mRNA-leader Sequenz lokalisiert sind, reguliert. Eine besondere Rolle spielt dabei eine interne ribosomale Zugangsstelle (IRES) (Creancier et al., 2000; Prats et al., 1992; Vagner et al., 1995). Die IRES stellt eine Alternative zur konventionellen Translationsinitiation dar. Bei dieser Form der Translationsinitiation bindet der 43S Initiationskomplex über die IRES direkt an das CUG-Startcodon (Komar und Hatzoglou, 2005). Ein weiterer wichtiger regulatorischer Faktor ist das heterogene Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1), das an das 5'-Ende der FGF-2 mRNA bindet. Diese beiden Faktoren erlauben eine Translation der FGF-2 mRNA auch unter Bedingungen, unter dem die klassische Translationsinitiation nicht funktioniert, wie zellulärem Streß oder viraler Infektion (Bonnal et al., 2005).

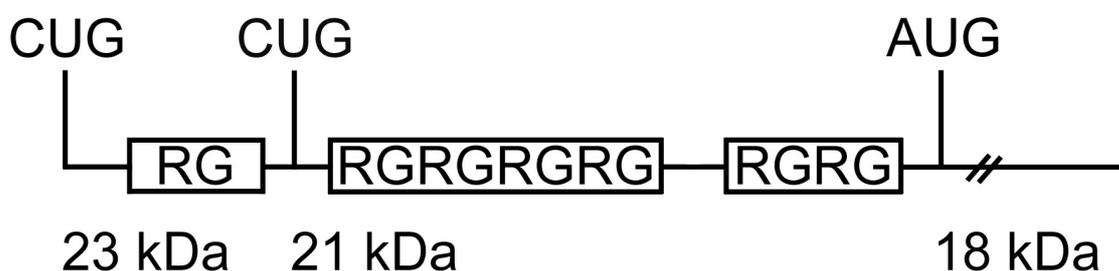


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Startcodons und RG-Motive des Fibroblastenwachstumsfaktors-2. Die verschiedenen Isoformen von FGF-2 werden ausgehend von einer mRNA-Spezies unter Nutzung verschiedener Startcodons translatiert. Charakteristisch für die Aminotermini der HMW-Isoformen sind RG-Motive. Die Länge des für die 23 kDa-Isoform spezifischen Aminoterminus' beträgt acht Aminosäurereste, im Falle der 21 kDa-Isoform 26 Aminosäurereste.

Einleitung

Ein Charakteristikum der aminoterminalen Verlängerung der hochmolekularen FGF-2-Isoformen sind Arginin / Glycin (RG)-reiche Motive. Wie in Abbildung 1 gezeigt, besitzt die 23 kDa-Isoform ein einzelnes RG-Motiv und zwei in Clustern vorliegende RG-Motive. Davon sind vier RG-Motive in einem gemeinsamen Cluster und bilden die zentrale RG-Motivdomäne des Proteins. Diese wird aminoterminal von einem einzelnen RG-Motiv und carboxyterminal von einer Domäne aus zwei RG-Motiven flankiert. Der Bereich zwischen den RG-reichen Domänen ist durch hydrophobe Aminosäuren gekennzeichnet. Die Argininreste des ersten RG-Motivs und der zentralen RG-reichen Sequenz sind dimethyliert (Klein et al., 2000). FGF-2²¹ besitzt nur die zentrale RG-reiche Sequenz sowie den carboxyterminal flankierenden RG-Cluster (Abb. 1). Die aminoterminalen Verlängerung der hochmolekularen Isoformen von FGF-2 ist als Kernlokalisationssequenz beschrieben (Arese et al., 1999; Bugler et al., 1991; Claus et al., 2003; Dono et al., 1998). Fusioniert man β -Galactosidase mit der aminoterminalen Verlängerung, so kann sie in den Zellkern transportiert werden (Quarto et al., 1991). Andere Gruppen charakterisieren eine RG-reiche Sequenz als Kernretentionssignal (Schmidt-Zachmann et al., 1993). Die RG-Motive vermitteln dabei Protein-Protein- oder Protein-RNA-Interaktionen, die das Protein im Zellkern hält. Die 18 kDa-Isoform, die keine RG-Motive besitzt, lokalisiert in immortalisierten Schwann-Zellen der Ratte im Nukleolus und co-lokalisiert mit dem Protein Coilin in Cajal-Körpern (Claus et al., 2003). Die Lokalisation in den Nukleoli wurde auch in anderen Studien immunocytochemisch in NIH3T3-Zellen (Dono et al., 1998) nachgewiesen. FGF-2¹⁸, das mit GFP fusioniert wurde, lokalisiert in COS-7- und HeLa-Zellen ebenfalls im Nukleolus (Sheng et al., 2004). Andere Studien hingegen kommen zu dem Ergebnis einer hauptsächlich cytoplasmatischen Lokalisation von FGF-2¹⁸ (Bugler et al., 1991; Foletti et al., 2003; Quarto et al., 1991; Renko et al., 1990). FGF-2²³, das über alle drei RG-reichen Domänen verfügt, ist in immortalisierten Zellen der Ratte chromatinassoziiert, punktuell im Zellkern verteilt und co-lokalisiert bei Überexpression mit SMN (Claus et al., 2003). In NIH3T3- und HEK293T-Zellen wird hingegen die Lokalisation von murinem mit EGFP fusionierten FGF-2²³ als nukleolär beschrieben (Foletti et al., 2003). Neben dieser Kernlokalisationssequenz im Aminoterminus der HMW-Isoformen gibt es eine zweiteilige Kernlokalisationssequenz im Carboxyterminus von FGF-2. Determiniert wird diese durch eine Sequenz basischer Aminosäurereste, ¹¹⁶RSRK und ¹²⁸KR. Diese Sequenz wird durch eine hydrophobe Region aus acht Aminosäureresten getrennt. In dieser zwei-

geteilten Kernlokalisationssequenz sind mehrere Aminosäurereste von Bedeutung. Werden die Arginine ¹¹⁶R und ¹¹⁸R durch Glycin ersetzt, so findet kein Transport von FGF-2¹⁸ und FGF-2²³ in den Zellkern statt (Claus et al., 2003). ¹¹⁹Lysin und ¹²⁹Arginin sind entscheidend für die Kernlokalisierung und die Lokalisation in den Nukleolus von FGF-2¹⁸, ¹²⁸Lysin spielt ebenfalls eine Rolle in der nukleolären Lokalisation (Sheng et al., 2004). Sowohl der RG-reiche Aminoterminus als auch die C-terminale Kernlokalisationssequenz sind für die Lokalisation der höhermolekularen Isoformen nötig (Foletti et al., 2003).

1.1.2 FGF-2 entfaltet seine Wirkung sowohl durch Bindung an FGF-Rezeptoren als auch als intrazelluläres Protein

Strukturuntersuchungen haben gezeigt, daß die 18 kDa-Isoform von FGF2, die die Kernsequenz aller FGF-2-Isoformen darstellt, zwölf antiparallele β -Faltblätter aufweist (Eriksson et al., 1991; Zhu et al., 1991). FGF-2 hat eine β -Kleeblattstruktur, in der die β -Faltblätter pyramidenförmig angeordnet sind (Faham et al., 1998). Die Faltblätter β 10 und β 11 enthalten mehrere basische Aminosäurereste, die die primäre Bindestelle für Heparin darstellen. Die Bindung an die FGF-Rezeptoren erfolgt durch die Faltblätter β 8 und β 9 (Baird et al., 1988; Eriksson et al., 1991; Plotnikov et al., 1999). FGF-2 bindet an alle vier bekannten FGF-Rezeptoren (FGFR), jedoch mit unterschiedlicher Affinität (Ornitz et al., 1996). Die FGF-Rezeptoren, die zu der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören, besitzen zwei bis drei Immunglobulinähnliche Domänen und eine Heparinbindestelle (Johnson et al., 1990; Lee et al., 1989; McKeehan et al., 1998). Durch gewebespezifisches alternatives Spleißen der mRNA der FGFR1-3 wird die carboxyterminale Hälfte der Immunglobulin-domäne III spezifiziert. Für den FGFR4 gibt es keine Spleißvarianten. Die daraus resultierenden Isoformen der FGFR, IIIb und IIIc (Chellaiah et al., 1994; Miki et al., 1992; Naski und Ornitz, 1998), weisen eine stark unterschiedliche Liganden-Rezeptor-Spezifität auf (Avivi et al., 1993; Gilbert et al., 1993; Orr-Urtreger et al., 1993; Scotet und Hous-saint, 1995; Yan et al., 1993). FGF-2 bindet mit hoher Spezifität an die c-Form der FGF-Rezeptoren. Eine wichtige Rolle in der FGF-Biologie spielt die Interaktion zwischen FGF und Heparin beziehungsweise Heparansulfatproteoglycan (HSPG) (Schlessinger et al., 1995; Yayon et al., 1991). In heparansulfatdefizienten Zellen kommt es zu keiner Bindung von FGF an die Rezeptoren, wodurch eine Dimerisierung der Rezeptoren nicht stattfinden kann. Dadurch wird eine Aktivierung der FGF-

Einleitung

Rezeptoren verhindert. In dem zur Zeit gültigen Modell wird angenommen, daß FGF und ein FGF-Rezeptor einen Komplex mit niedriger Affinität zueinander bilden, der durch Heparin stabilisiert und minimal aktiviert wird. Dieser Komplex, auch Minimalkomplex genannt, erlaubt vermutlich transiente Rezeptordimerisation und eine Signaltransduktion bei hoher Ligandenkonzentration. In der Gegenwart von Heparansulfat, das eine 6-O- und eine 2-O-Sulfatgruppe aufweist, wird der FGF/FGFR-Komplex stabilisiert und aktiviert. An diesen, durch Heparansulfat stabilisierten Komplex, bindet ein weiteres FGF-Molekül. Dadurch entsteht ein stabiler FGF/FGF-Rezeptor-Komplex (Hsu et al., 1999; Plotnikov et al., 1999; Pye und Gallagher, 1999). Die Dimerisierung der FGF-Rezeptoren führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase durch *trans*-Phosphorylierung zwischen den beiden Rezeptormonomeren. Nachfolgend wird über die Aktivierung der Src-homologen-2-phosphatase (SHP2) die Ras/ERK-Signaltransduktionskaskade aktiviert, was zur differentiellen Genexpression führt (Hadari et al., 2001; Hadari et al., 1998). Durch die Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskade, aber auch durch die direkte Interaktion mit intrazellulären Faktoren, ist FGF-2 in der Lage ein breites Spektrum an biologischen Vorgängen, wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Morphogenese zu beeinflussen (Grothe et al., 1998; Hadari et al., 1998; Hama et al., 2001; Muller-Ostermeyer et al., 2001; Szebenyi und Fallon, 1999). FGF-2¹⁸ hat kein Signal für die Sekretion durch den ER/Golgi-Sekretionsweg wie andere FGFs. Dennoch kann es durch unkonventionelle Sekretionsmechanismen sezerniert werden und somit sein Wirkungsspektrum zum einen als para- und autokriner Faktor durch die Bindung an FGF-Rezeptoren und der dadurch folgenden Aktivierung der Ras/ERK-Signaltransduktionskaskade entfalten. Zum anderen kann FGF-2¹⁸ nach Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes oder direkt nach der Translation als intrakriner Faktor wirken. Ohne Internalisierung kann zwar eine Differenzierung durch die Ras/ERK-Signaltransduktionskaskade induziert werden, Zellproliferation hingegen nicht (Bossard et al., 2003). FGF-2¹⁸ interagiert mit der β -Untereinheit der Kinase CK2 und beeinflusst dessen Aktivität (Bonnet et al., 1996). In proliferierenden Zellen ist Nukleolin das Hauptsubstrat von CK2. Nukleolin ist ein wichtiger Faktor für die Transkription ribosomaler RNA (rRNA), der Reifung ribosomaler RNA und der Ribosomenassemblierung (Jordan, 1987). Durch diese Interaktion kann FGF-2¹⁸ sowohl die ribosomale Gentranskription als auch die Ribosombiogenese beeinflussen (Bonnet et al., 1996; Bouche et al., 1994; Bouche et al., 1987). Ein weiteres intranukleäres Protein, mit

dem FGF-2¹⁸ interagiert, ist der Transkriptionsfaktor upstream binding factor (UBF), der essentiell für die Transkription ribosomaler RNA ist. FGF-2¹⁸ ist mit UBF im Nucleolus assoziiert und beeinflusst die rRNA-Transkription sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Sheng et al., 2005). Interessanterweise interagiert FGF-2 mit der 66 kDa Untereinheit des Spleißfaktors SF3a (Gringel et al., 2004). SF3a66 bindet an die C-terminale Region von FGF-2 sowohl der 18 kDa- als auch der 23 kDa-Isoform. Dies könnte auf eine Funktion von FGF-2 in der Regulation des alternativen Spleißens hinweisen. Während über spezifische Effekte der 21 kDa-Isoform nichts bekannt ist, weist die 23 kDa-Isoform verschiedene biologische Effekte auf. So vermittelt die Überexpression von FGF-2²³ in NIH/3T3-Zellen einen serum-unabhängigen Wachstumsphänotyp (Arese et al., 1999; Bikfalvi et al., 1995; Gualandris et al., 1999) und führt zu einer Strahlungsresistenz in HeLa-Zellen (Cohen-Jonathan et al., 1997). In neonatalen Herzmyocyten induziert die Überexpression von FGF-2²³ eine erhöhte Proliferation der Zellen und eine Veränderung des Zellkerns, die sich durch Chromatinkondensation ausdrückt (Pasumarthi et al., 1996). Schwann-Zellen, die in einem *in vivo* Modell für die Regeneration peripherer Nerven als Transplantate eingesetzt werden, zeigen distinkte Effekte, je nachdem welche Isoform in diesen Zellen überexprimiert wird: Während die 18 kDa-Isoform den Myelinisierungsprozess inhibiert, fördern die HMW-Isoformen die Regeneration der sensorischen Nerven und üben einen positiven Effekt auf die Myelinisierung der regenerierenden Axone aus (Haastert et al., 2006). FGF-2²³ co-lokalisiert zudem interessanterweise mit dem survival of motoneuron Protein (SMN) in SMN-positiven Kernkörpern und bindet über seinen argininreichen Aminoterminus direkt an den Aminoterminus von SMN (Claus et al., 2004; Claus et al., 2003). Das Gen, das für dieses Protein codiert, ist in der monogenetischen Krankheit Spinale Muskelatrophie deletiert.

1.2 Das survival of motoneuron (SMN) Protein

Das funktionelle SMN-Protein besteht aus 294 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. Die Expression ist ubiquitär und weist nur geringe gewebe-spezifische und entwicklungsregulatorische Unterschiede auf (Gabanella et al., 2005; Jablonka et al., 2001). In *Mus musculus* ist die Aktivität des SMN-Proteins im Zentralen Nervensystem (ZNS) jedoch während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung am höchsten. Es fällt danach auf ein basales und gleichbleibendes Niveau ab (Gabanella et al., 2005). In somatischen Zellen lokalisiert SMN perinukleär,

im Zellkern hingegen in definierten Foci. Charakteristisch für das SMN-Protein ist dessen Oligomerisierung und die Bildung eines stabilen Multiproteinkomplexes, den SMN-Komplex. Dessen am besten untersuchte Funktion besteht in der Assemblierung von Uridin-reichen kleinen nukleären Ribonukleoproteinen, den U snRNPs. Diese üben eine wichtige Funktion beim Spleißen von pre-mRNA aus (Yong et al., 2004b). In neuester Zeit wird zudem eine axonale Funktion für das SMN-Protein postuliert. In Axonen könnte SMN in der Biogenese von Ribonukleinkomplexen beteiligt sein, die wichtig für den Transport bestimmter RNAs sind (Briese et al., 2005; Monani, 2005). Neue Ergebnisse weisen zudem auf einen Einfluß des SMN-Proteins auf das Aktin-Cytoskelett hin (van Bergeijk et al., 2006).

1.2.1 Das Krankheitsbild der SMA

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessive, neurodegenerative Erkrankung, die als SMA Typ I zumeist tödlich verläuft (Pearn, 1978; Roberts et al., 1970). Charakteristisch für SMA ist die Degeneration der α -Motoneurone in den Vorderhornzellen des Rückenmarks und damit einhergehend eine Atrophie der innervierten Muskulatur. Mit einer Inzidenz von 1 zu 6000-10000 ist die Spinale Muskelatrophie die häufigste genetische Todesursache bei Kindern (Pearn, 1978; Talbot, 1999). Man unterscheidet fünf Typen der Spinalen Muskelatrophie: SMA Typ 0 ist pränatal und führt zu frühem, neonatalen Tod (Dubowitz, 1999; MacLeod et al., 1999). SMA Typ I, auch als Werdnig-Hoffman-Krankheit bekannt, ist durch eine generelle Muskelschwäche charakterisiert, die vor dem sechsten Lebensmonat auftritt. Davon betroffene Kinder lernen nie das eigenständige Gehen oder Sitzen und haben eine Lebenserwartung von acht Monaten. Kinder mit SMA Typ II haben eine Lebenserwartung von mehr als zwei Jahren und können selbständig sitzen. An SMA Typ III (Kugelberg-Welander-Krankheit) erkrankte Kinder können selbständig gehen und stehen (Schmalbruch und Haase, 2001). Eine Sonderform stellt die SMA Typ IV dar, hier entwickeln die Patienten erst im Alter von circa 30 Jahren die ersten Symptome, eine milde Schwäche der proximalen Muskeln. Die SMA Typ IV ist möglicherweise nur symptomatisch mit der SMA verwandt (Pearn et al., 1978).

1.2.2 Mutationen im *SMN1*-Gen sind verantwortlich für die Entwicklung der Spinalen Muskelatrophie

Zwar manifestiert sich die Spinale Muskelatrophie in einem heterogenen Krankheitsbild, die Ursache ist jedoch auf einen Defekt des *SMN*-Gens, einem essentiellen Gen in Metazoa, zurückzuführen. Das *SMN*-Gen ist in der Region q13 des Chromosoms 5 lokalisiert und liegt dort in zwei Kopien vor: *SMN1* liegt als telomere Kopie vor, *SMN2* ist die invertierte centromere Kopie (Brzustowicz et al., 1992; Brzustowicz et al., 1990; Lefebvre et al., 1995). Beide Gene weisen eine hohe Ähnlichkeit auf (Monani et al., 1999). Unabhängig vom Typ der Spinalen Muskelatrophie ist in 95 % der Patienten das *SMN1*-Gen deletiert. Die übrigen 5 % tragen Punktmutationen im *SMN1*-Gen. Die am besten untersuchten Punktmutationen sind Y272C und E134K. Beide Mutationen verursachen einen SMA Typ I Phänotyp. Die Mutation Y272C liegt in der evolutionär hoch konservierten Y/G Box von SMN, einem Bereich im Carboxyterminus, der wichtig für die Oligomerisierung des SMN-Proteins ist. Sie reduziert neben der Fähigkeit zur Oligomerisierung auch die Fähigkeit sogenannte Sm-Proteine zu binden (Lorson et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999). Diese sind eine der Kernkomponenten der U snRNPs und wurden ursprünglich in Patienten mit systemischen Lupus erythematoses entdeckt, da Sm-Proteine mit Sm-serotyp Antikörpern reagieren können (Tan, 1989). In Patienten, die die Mutation Y272C tragen, ist der Proteinspiegel des SMN-Proteins vergleichbar mit dem von Patienten, die eine Deletion von *SMN1* aufweisen (Lefebvre et al., 1997). In DT40-Zellen, einer B-Zelllinie des Huhns, die eine einfache Herstellung von Gen-Knockouts erlaubt, beeinflusst die Mutante Y272C die Viabilität der Zelle jedoch nicht, wenn sie statt des endogenen SMN konstitutiv überexprimiert wird (Wang und Dreyfuss, 2001). Der in Patienten auftretende Effekt ist deswegen wahrscheinlich auf die verminderte Fähigkeit zur Oligomerisierung zurückzuführen, was sich in der Instabilität des Proteins ausdrückt (Lorson et al., 1998; Wang und Dreyfuss, 2001). Die Mutante E134K ist in der sogenannten Tudor-Domäne des SMN-Proteins lokalisiert. Die Tudor-Domäne liegt in vielen Proteinen vor, die RNA oder Einzelstrang-DNA binden können und wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Ponting, 1997). Bei dieser Mutante ist die Interaktion mit den Sm-Proteinen *in vitro* gestört (Buhler et al., 1999; Selenko et al., 2001), jedoch ist auch in diesem Fall die Viabilität bei DT40-Zellen, die diese Mutante konstitutiv überexprimieren nicht beeinträchtigt. In dem DT40-Zellmodell ist noch dazu weder

Einleitung

die Oligomerisierung von SMN noch die Bindung von SMN an Sm-Proteine gestört (Wang und Dreyfuss, 2001). Es stellt sich die Frage, weshalb das *SMN2*-Gen nicht den Verlust des *SMN1*-Gens kompensieren kann. Das *SMN2*-Gen weist im siebten Exon auf der +6 Position eine C/T-Transition auf (Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999), wodurch ein Exonischer Spleißhemmer (ESS) entsteht, der das Spleißen des Exon 7 reprimiert (Kashima und Manley, 2003). Der Hauptteil des daraus resultierenden Proteins ist um die 16 Aminosäurereste, für die das Exon 7 codiert, verkürzt und wird aufgrund seiner Instabilität schnell degradiert. Nur ein geringer Anteil des vom *SMN2*-Gens ausgehend translatierten Proteins entspricht dem funktionellen Protein, welches das Transkript des *SMN1*-Gens darstellt. (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997). Der Krankheitsphänotyp ist abhängig vom Anteil an funktionellem Protein, das vom *SMN2*-Gen ausgehend translatiert wird. Dies läßt folgende Schlußfolgerung zu: Je mehr Kopien des *SMN2*-Gens vorhanden sind, desto mehr funktionelles SMN-Protein ist vorhanden und desto milder ist der Phänotyp der Krankheit (Feldkotter et al., 2002; McAndrew et al., 1997).

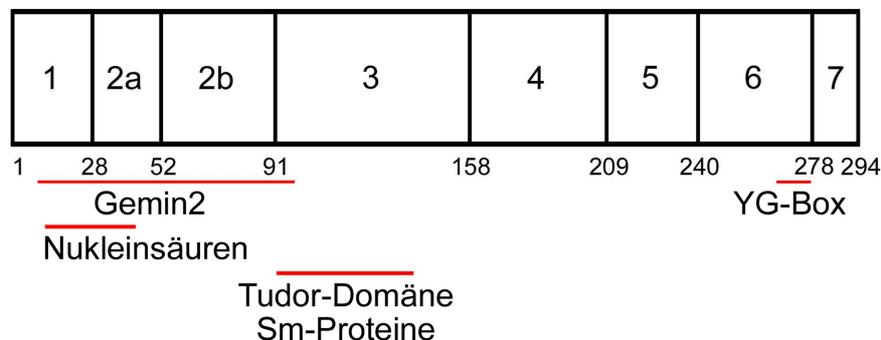


Abbildung 2: Die Exonstruktur des SMN-Proteins und wichtige Bindedomänen. Gezeigt sind die Exone, die für das SMN-Protein codieren, und die jeweiligen Aminosäurereste. Desweiteren sind die wichtigsten Interaktionsdomänen des SMN-Proteins gezeigt. An den Aminoterminus des SMN-Proteins können das Protein Gemin2, eine Kernkomponente des SMN-Komplexes, und Nukleinsäuren binden. An die Tudordomäne können sogenannte Sm-Proteine, eine Kernkomponente der U snRNPs, binden. Die YG-Box spielt eine Rolle für die Oligomerisierung des SMN-Proteins.

1.2.3 Das SMN-Protein lokalisiert in verschiedenen Strukturen

Lokalisationsstudien in somatischen Zellen haben gezeigt, daß das SMN-Protein im Cytoplasma der Zelle perinukleär, im Zellkern hingegen in definierte Substrukturen lokalisiert. Im adulten Gewebe und in vielen Zelllinien, wie COS-7-Zellen, lassen sich zumeist Kernkörper finden, die Coilin als Marker für Cajal-Körper und SMN als Marker für sogenannte Gems zugleich aufweisen oder in denen beide Markerproteine teilweise überlappen. Man spricht dann von mit Cajal-Körpern identischen oder teilweise überlappenden Strukturen. In embryonalem Gewebe und bestimmten Zelllinien, wie HeLa PV-Zellen, sind diese beiden Strukturen voneinander unabhängig (Carvalho et al., 1999; Liu und Dreyfuss, 1996; Young et al., 2001; Young et al., 2000a). Die Bildung dieser Strukturen ist abhängig von der Co-Expression der Proteine SMN und Gemin2, den Kernkomponenten des SMN-Komplexes (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997; Paushkin et al., 2002). Gems können in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand der Zelle mit Cajal-Körpern, die reich an mRNA-Prozessierungsfaktoren und Transkriptionsfaktoren sind, verschmelzen (Carvalho et al., 1999; Liu und Dreyfuss, 1996; Malatesta et al., 2004; Matera, 2003). Während Cajal-Körper demnach in der Maturation von U snRNPs eine Rolle spielen, ist für Gems keine Funktion bekannt. Die Ausbildung der SMN-positiven Foci steht vermutlich auch im Zusammenhang mit der Fähigkeit des SMN-Proteins Oligomere bilden zu können. SMM besitzt zwei Oligomerisierungsdomänen. Die erste Oligomerisierungsdomäne befindet sich im Bereich der Aminosäurereste 52-91 (Young et al., 2000), die zweite wird durch eine YG-Box bestimmt (Lorson et al., 1998).

Immuncytochemische Studien in primären Neuronen der Ratte haben gezeigt, daß SMN sowohl in Dendriten als auch in Axonen *in vivo* vorkommt. Dabei lokalisiert das SMN-Protein in granulären Strukturen, die über die axonalen Ausläufer bis in die Wachstumskegel hinein lokalisiert sind (Bechade et al., 1999; Pagliardini et al., 2000; van Bergeijk et al., 2006).

1.2.4 Die nukleozentrische Hypothese der SMA-Pathogenese

Welche Funktion hat das SMN-Protein in der Zelle? Die am besten untersuchte Funktion besteht in der Assemblierung von U snRNPs, die eine wichtige Rolle beim Spleißen von pre-mRNA haben. Phosphoryliertes SMN (Grimmler et al., 2005) bildet mit den Proteinen Gemin2-8 und unrip den SMN-Komplex. Gemin2, Gemin3, Gemin5 und Gemin7 binden direkt an SMN (Baccon et al., 2002; Charroux et al., 1999; Grimmler et al., 2005; Gubitz et al., 2002; Liu et al., 1997). Gemin3 und Gemin7 binden ihrerseits an die Proteine Gemin4 beziehungsweise Gemin6 (Baccon et al., 2002; Charroux et al., 2000). Gemin8 bindet wie auch unrip an das Gemin6/Gemin7-Heterodimer (Carissimi et al., 2005; Carissimi et al., 2006). Neu translatierte Sm-Proteine binden zuerst an das Protein pICln (protein, current, chloride, nukleotidsensitiv) und dem Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5)-Komplex, die gemeinsam bestimmte Argininreste der Proteine SmB und SmD1-3 symmetrisch dimethylieren. Anschließend erfolgt eine Bindung an den SMN-Komplex (Brahms et al., 2000; Friesen et al., 2001; Friesen et al., 2002; Meister et al., 2001). Der SMN-Komplex vermittelt die Assemblierung des Heptamerrings bestehend aus den Sm-Proteinen SmB, SmD1-3, SmE, SmF und SmG auf Uridin-reiche kleine Kern-RNAs (U snRNA), wodurch die U snRNPs entstehen. Dieser Prozeß ist ATP-abhängig (Meister et al., 2002; Yong et al., 2004b). Aufgereinigte Sm-Proteine können *in vitro* selbständig auf den U snRNAs in Form eines Heptamerrings assemblieren (Yong et al., 2004a). Der SMN-Komplex dient nicht nur als Plattform für die U snRNP-Assemblierung, sondern sorgt auch für eine strikte Spezifität der Assemblierung (Yong et al., 2004b). U snRNAs werden im Zellkern durch die RNA-Polymerase II transkribiert und weisen eine kurze Extension am 3'-Ende auf (Meister und Fischer, 2002; Pellizzoni et al., 2002). Der Export der U snRNAs in das Cytoplasma wird durch Interaktion mit PHAX und dem Cap-Binding-Komplex ermöglicht (Ohno et al., 2000; Segref et al., 2001). Weitere cytoplasmatische Schritte der U snRNP-Biogenese sind die Hypermethylierung der 7-Monomethylguanosin (m⁷G)-Haubenstruktur an den 5'-Enden der U snRNAs zu 2,2,7-Trimethylguanosin und die Prozessierung der 3'-Enden der snRNA. Der Sm-Heptamerring und die hypermethylierte Haubenstruktur der U snRNA dienen als Kernimportsignal. Der SMN-Komplex, der während der gesamten cytoplasmatischen Phase mit den U snRNPs assoziiert bleibt (Massenet et al., 2002), interagiert mit den Proteinen Snurportin1 und Importin β und ermöglicht dadurch den Kernimport der U snRNPs (Narayanan et al., 2004;

Narayanan et al., 2002). Nach dem Import in den Zellkern werden die U snRNPs in den Cajal-Körpern weiter modifiziert, indem sie einer 2'-O-Ribosemethylierung und einer Pseudouridylierung unterworfen werden (Jady et al., 2003; Kiss, 2004). Der SMN-Komplex assembliert den Sm-Heptamererring sowohl auf snRNAs der großen (U1, U2, U4 und U5) als auch der kleinen (U11 und U12) spleißeosomalen U snRNPs (Golembe et al., 2005; Yong et al., 2004a; Yong et al., 2002). Auch das U7 snRNP, das wichtig für die Prozessierung des 3'-Endes der Histon pre-mRNA ist, wird durch den SMN-Komplex assembliert (Pillai et al., 2003). Ein charakteristisches Merkmal der U1, U2, U4 und U5 snRNAs ist die hochkonservierte Sm-Sequenz, die von zwei Haarnadelstrukturen flankiert wird. Die Sm-Bindestelle wird durch einen Bereich von vier bis sechs Uridinresten, die von einem Adenosinrest und einem Guanosinrest flankiert werden, charakterisiert (Raker et al., 1996). Die Bindung an den SMN-Komplex erfolgt bei der U1 snRNA mit hoher Affinität durch die erste Haarnadelstruktur (SL1) am 5'-Ende der RNA (Yong et al., 2002). Im Gegensatz dazu binden die U2, U4 und U5 snRNAs über Domänen nahe ihres 3'-Endes, der Sm-Bindestelle und den beiden flankierenden Haarnadelstrukturen, an den SMN-Komplex (Golembe et al., 2005; Yong et al., 2004a). Das Protein, welches die Bindung der U snRNA vermittelt, ist Gemin5 (Battle et al., 2006). Die Sequenz der Sm-Bindestelle der U7 snRNA weicht zwar nur geringfügig von der entsprechenden kanonischen Sequenz der U1-5 snRNAs ab. Jedoch führt ein Austausch zur Inaktivierung der U7 snRNA. Die Sequenz mit der U7 snRNA an den SMN-Komplex bindet ist bisher nicht bekannt.

1.2.5 Die axonale Hypothese der SMA-Pathogenese

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß das SMN-Protein *in vitro* in Axonen und Wachstumskegeln von neuronähnlichen P19-Zellen, embryonalen Karzinomzellen der Maus, akkumuliert (Fan und Simard, 2002). Immunocytochemische Studien in primären Motoneurone der Ratte haben gezeigt, daß SMN sowohl in Dendriten als auch in Axonen *in vivo* vorkommt (Bechade et al., 1999; Pagliardini et al., 2000). Desweiteren wurde anhand von Untersuchungen an kortikalen Neuronen des Huhns und spinalen Motoneuronen der Ratte gezeigt, daß das SMN-Protein in granulären Strukturen, bestehend aus Ribonukleoproteinen, vorkommt, die mit Mikrotubuli assoziieren und eine bidirektionale Bewegung zwischen Zellkörper und Wachstumskegel aufweisen (Zhang et al., 2003). Im Allgemeinen ist die axonale Funktion von SMN

bisher jedoch wenig untersucht. Die Bewegung dieser granulären Strukturen ist abhängig vom Cytoskelett (Zhang et al., 2003). SMN bindet in Axonen an das Protein hnRNP-R (Rossoll et al., 2002). Dieses Protein kann *in vitro* an β -Aktin-mRNA binden (Rossoll et al., 2003). Primäre Motoneurone von transgenen SMA-Mäusen (Monani et al., 2000) weisen kürzere Axone und einen kleineren Wachstumskegel auf. Die Dendriten hingegen zeigen keine Beeinträchtigung. Zudem ist in den untersuchten Mäusen SMA-Mäusen eine geringere Menge an β -Aktin-mRNA und β -Aktin in den Wachstumskegeln im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu finden (Rossoll et al., 2003). Für die Motilität der Wachstumskegel scheint die Lokalisation der β -Aktin-mRNA (Zhang et al., 2001) und die lokale Proteinsynthese (Campbell und Holt, 2001) von Bedeutung zu sein. Die Proteine Gemin2 und Gemin3 co-lokalisieren mit dem SMN-Protein in granulären Strukturen in Axonen, Dendriten und Wachstumskegeln von primären hippocampalen Neuronen und Motoneuronen (Zhang et al., 2006). Aus den bis dahin bekannten Daten und den Ergebnissen ihrer Studie postulieren sie ein Modell, in dem ein SMN-Gemin-Komplex in neuronalen Fortsätzen eine wichtige Rolle bei der korrekten Lokalisation/Translation von zum Beispiel β -Aktin-mRNA in den Wachstumskegeln spielt. In neuronalen Fortsätzen könnte also SMN eine Rolle bei der Assemblierung von mRNPs (messenger Ribonukleoproteinpartikel) spielen, wie es für die Assemblierung der U snRNPs gezeigt wurde. Ein weiterer Interaktionspartner von SMN, der für die axonale Funktion von SMN von Bedeutung sein könnte, ist Profilin (Giesemann et al., 1999). Profilin ist in die Aktinpolymerisation und die Motilität des Wachstumskegels involviert, diese Prozesse sind wichtig für das Auswachsen der Axone (Gutsche-Perelroizen et al., 1999; Kim et al., 2001; Wills et al., 1999). Eine Überexpression von SMN in PC12-Zellen führt interessanterweise zu verlängerten Neuriten und hat einen Einfluss auf das Aktin-Cytoskelett (van Bergeijk et al., 2006).

1.2.6 Es existieren verschiedene Tiermodelle der SMA

Um mehr über die Pathogenese und Mechanismen der Spinalen Muskelatrophie zu erfahren, hat man mehrere Tiermodelle generiert, die im folgenden kurz vorgestellt werden sollen. Da der Mensch als einzige Spezies zwei Kopien des *SMN*-Gens besitzt und das SMN-Protein eine wichtige Funktion in der Zellviabilität erfüllt, erwies sich das Tiermodell als schwieriger Ansatz, die Krankheit SMA im Tiermodell zu untersuchen. In *Schizosaccharomyces pombe* äußert sich die Deletion des *smn1⁺*-Gens, dem Ortholog des humanen *SMN*-Gens, in einem letalen Phänotyp (Owen et

al., 2000). Wird im Nematoden *Caenorhabditis elegans* das SMN-Protein durch RNA-Inhibition herunterreguliert, so führt dies zu einem variablen Phänotyp. Dieser reicht von embryonaler Letalität bis hin zu Koordinationsstörungen in der Bewegung und mangelndem Muskeltonus bei den Nachkommen (Miguel-Aliaga et al., 1999). In *Drosophila melanogaster* kommt es nach Deletion des *SMN*-Orthologs zu später larvaler Letalität und zu Defekten an der motorischen Endplatte (Chan et al., 2003).

Vielversprechender ist das Modell des Zebrafischs *Danio rerio*, da in diesem vertebrierten Modellorganismus die Entwicklung der Motoneurone sehr gut charakterisiert ist. Durch den Einsatz von anti-sense Morpholinos kann ein niedriger Spiegel des Smn-Proteins induziert und die Situation der SMA simuliert werden. Wird der Spiegel des Smn-Proteins in diesem Tiermodell herabgesetzt, so führt dies zu Defekten in der Zielfindung der Motoneurone. Weiterhin sind die mit anti-sense Morpholinos behandelten Motoneurone verkürzt und atypisch verzweigt. Die in diesem Modell gefundenen Effekte sind zellautonom. Wird Smn nur in den Motoneuronen herunterreguliert, so ist die muskuläre Entwicklung nicht gestört. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, daß die Spinale Muskelatrophie ein Defekt in der neuronalen Entwicklung ist (McWhorter et al., 2003). Erstaunlicherweise wirkt sich nicht nur die Herabsetzung des Smn-Proteinspiegels durch anti-sense Morpholinos in einem Defekt der Motoneurone aus. Werden die Proteine pICln und Gemin2, beides Proteine, die an der Biogenese der U snRNPs beteiligt sind, herunterreguliert, so tritt im Zebrafischmodell ein ebensolcher Effekt auf. Werden in Embryonen, in die anti-sense Morpholinos gegen Smn und Gemin2 injiziert wurden, aufgereinigte U snRNPs injiziert, so wird die Ausbildung der axonalen Defekte verhindert (Winkler et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen, daß das korrekte Auswachsen der Axone im Zebrafischmodell unabhängig von der Biogenese der U snRNPs ist (Carrel et al., 2006). Das Tiermodell mit dem größten Wert für die Erforschung humaner Erkrankungen ist ohne Zweifel das Mausmodell. Im Falle der Spinalen Muskelatrophie wurden in den letzten Jahren mehrerer solcher Modelle generiert, von denen die wichtigsten hier vorgestellt werden sollen. Die Deletion des murinen *Smn*-Gens, welches dem humanen *SMN1*-Gen entspricht, führt zu einem embryonal letalen Phänotyp, wenn es homozygot deletiert wird (Schrank et al., 1997). Um dieses Problem zu umgehen, wurde das funktionelle Smn-Protein in Mäusen selektiv in Neuronen unter Anwendung des Cre-loxP-Systems in Kombination mit dem Neuron-spezifischen Enolasepromotor deletiert. Diese Mäuse exprimieren heterozygot ein im Carboxyterminus deletier-

Einleitung

tes Smn-Protein. Dieses entspricht dem humanen SMN-Protein, das durch das *SMN2*-Gen codiert wird. Die Deletion des funktionellen Smn-Proteins resultiert in Denervierung der Muskulatur, Abnormalität im Bewegungsmuster und einer Lebenserwartung von 25 Tagen (Frugier et al., 2000). Weitere Untersuchungen dieser Mutante haben gezeigt, daß eine massive Akkumulation von Neurofilamenten in den terminalen Axonen der Motoneurone sowie ein starkes Absterben der Axone der Motoneurone stattfindet (Cifuentes-Diaz et al., 2002). In einem weiteren Mausmodell wurde das humane *SMN2*-Gen auf einem *Smn*^{-/-}-Hintergrund exprimiert. In diesem Modell zeigen die Mäuse mit einer geringen Kopienanzahl des *SMN2*-Gens schwere Defekte der Motoneurone und sterben kurz nach der Geburt. Bei hoher Kopienzahl des *SMN2*-Gens (8-16 Kopien) kommt es zu keiner Ausprägung eines SMA-Phänotyps (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000). Die Schwere des von den Mäusen entwickelten Phänotyps ist demnach abhängig von der Kopienzahl in der das *SMN2*-Protein vorliegt.

1.3 Ziel dieser Studie

In dieser Studie sollte basierend auf Co-Lokalisations- und Immunpräzipitationsdaten (Claus et al., 2003) eine mögliche direkte Interaktion zwischen FGF-2²³ und SMN untersucht und genauer charakterisiert werden. Diese Charakterisierung sollte die Frage klären, an welche Domäne des SMN-Proteins die Bindung stattfindet, ob es eine Konkurrenz zwischen FGF-2²³ und anderen Bindungspartnern gibt und in welchem Kompartiment der Zelle die Bindung stattfindet. Zudem sollte in dieser Studie untersucht werden, welche funktionelle Konsequenz sich aus einer möglichen direkten Bindung der beiden Proteine ergibt.

In einem zweiten Projekt sollte die subzelluläre Lokalisation der 23 kDa-Isoform in Abhängigkeit der RG-reichen Domäne untersucht werden. Da bekannt war, daß FGF-2²³ durch die Protein-Arginin-Methyltransferase 1 (PRMT1) methyliert werden kann, sollte in diesem Teilprojekt zudem die Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von dem Methylierungszustand des FGF-2 Proteins untersucht werden. Desweiteren sollte überprüft werden, ob FGF-2²³ durch PRMT5 methyliert werden kann, da diese posttranslationale Modifikation im Falle von Sm-Proteinen die Spezifität der Bindung an das SMN-Protein erhöht.

2. Material & Methoden

2.1 Biochemische Methoden

2.1.1 Immunpräzipitation

Zur Gewinnung des Gesamtzellextrakts aus HEK293T-Zellen wurden diese 20 Stunden nach der Transfektion zweimal mit PBS [Phosphat buffered saline: 150 mM NaCl, 11,74 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2,49 mM KH₂PO₄ (alles Biochrom)] gewaschen, bevor 1 ml RIPA-Puffer [Radioimmunpräzipitations-Puffer: 10 mM Tris-Base (Roth), 137 mM NaCl (Roth), 2 mM EDTA, 25 mM β-Glycerophosphat (Sigma-Aldrich), 1 mM Natriumorthovanadat (Sigma-Aldrich), 1 % Triton-X-100 (Roche), 1 % Natriumdesoxycholat (Fluka), 1x Complete™ Proteaseinhibitoren (Roche), pH 7,5 mit 30 % HCl (Fluka)] pro 60 ml Zellkulturschale hinzugegeben wurde. Das erhaltene Lysat wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C und 14000xg zentrifugiert. Kernextrakte und cytoplasmatische Extrakte transfizierter HEK293T-Zellen wurden 20 Stunden nach Transfektion mit dem NE-PER®-Kit (Pierce) gemäß Herstellerangaben gewonnen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Reagenz (Pierce) bestimmt. 20 – 25 µg Protein wurden als Ladekontrolle verwendet, 100 – 150 µg Protein wurden für die Immunpräzipitation verwendet. Die Lysate wurden mit 0,5 µg α-SMN Antikörper beziehungsweise 2 µg α-FLAG M2 Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nachfolgend wurden die Lysate mit Protein-G Sepharose (Amersham Biosciences) versetzt und eine Stunde bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die an die Protein-G Sepharose gebundenen Proteinfractionen wurden dreimal mit eiskaltem RIPA-Puffer und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die erhaltenen Pellets wurden für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Laemmlipuffer [125mM Tris-Base (Roth) pH 8,8 mit 30 % HCl (Fluka), 4 % SDS (Roth), 20 % (v/v) Glycerol (Sigma-Aldrich), 10 % (v/v) Mercaptoethanol (Fluka), 2mM EDTA (Sigma-Aldrich), 0,05 % (v/v) Bromphenolblau (Roth)] versetzt und fünf Minuten bei 94 °C inkubiert.

2.1.2 Protein-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden 12,5 % Polyacrylamidgele für die Auftrennung von Proteinkomplexen verwendet. Das 12,5 % Trenngel [5,25 ml Acrylamidlösung (40 % Acrylamid / Bisacrylamid, Vernetzungsgrad 29:1, BioRad), 6 ml Trenngelpuffer [1 M Tris-Base (Roth), 0,3 % (w/v) SDS (Roth), pH 8,8 mit 30 % HCl (Fluka)], 6,35 ml H₂O, 9 µl TEMED (Sigma), 180 µl 10 % APS (Sigma)] wurde mit einem 5 % Sammelgel [1,3 ml Acrylamidlösung (40 % Acrylamid / Bisacrylamid, Vernetzungsgrad 29:1, BioRad), 1 ml Sammelgelpuffer [375 mM Tris-Base (Roth), 0,6 % (w/v) SDS (Roth), pH 6,8 mit 30 % HCl (Fluka)], 3,7 ml H₂O, 3 µl TEMED (Sigma), 60 µl 10 % APS (Sigma)] überschichtet. Der Gellauf fand bei konstanter Spannung von 200 V in einer Protean II System-Kammer (BioRad) unter Verwendung des Netzteils Powerpac 200 (BioRad) in Elektrodenpuffer [25 mM Tris-Base (Roth), 192 mM Glycin (Roth), 0,1 % SDS (w/v), pH 8,3] statt.

2.1.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteinfractionen durch SDS-PAGE wurden diese auf eine Hyperbond™ ECL[®] Nitrocellulosemembran (Amersham) im Nass-Blotverfahren für eine Stunde bei konstanter Spannung von 125 V in Transferpuffer [25 mM Tris-Base (Roth), 192 mM Glycin (Roth), 20 % Methanol (v/v) (JT Baker)] geblottet. Benutzt wurde eine Protean II System-Kammer (BioRad) und das Netzteil Powerpac 200 (BioRad). Die ECL-Membran wurde kurz in TBS-T [Tris buffered saline-Tween: 20 mM Tris-Base (Roth), 137 mM NaCl (Roth), 0,1 % (v/v) Tween-20 (Roth), pH 7,6 mit 30 % HCl (Fluka)] gewaschen und anschließend in TBS-T-Puffer, der mit 5 % (w/v) Milchpulver (Heirler) versetzt wurde, für eine Stunde geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in TBS-T / 5 % (w/v) Milchpulver. Nach dreimaligem Waschen des Blots mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-T / 5 % (w/v) Milchpulver. Anschließend wurde die Membran sechsmal für je fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mit ECL-Reagenz (Amersham) oder in Fällen in denen besondere Sensitivität gefragt war mit SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensivity Substrate (Pierce) jeweils nach Herstellerangaben. Die Exposition erfolgte auf einen Röntgenfilm (Kodak) im Zeitraum von einer Sekunde bis über Nacht. Entwickelt wurde der Film für eine Minute in Entwickler (Kodak). Anschließend folgte die

Fixierung in Fixiererlösung (Kodak) für ebenfalls eine Minute. Um den Blot erneut mit einem Antikörper zu inkubieren, wurde die Membran zwei Mal mit TBS-T für je fünf Minuten gewaschen und anschließend mit Glycinpuffer [100 mM Glycin (Roth), pH 2,5] für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte ein Waschschrift mit TBS-T für fünf Minuten, bevor die Membran erneut mit TBS-T / 5 % Milchpulver geblockt wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

2.1.4 Pull down assay

Gleiche Mengen an rekombinantem Wildtyp-SMN-Protein beziehungsweise SMN-Deletionsmutanten auf einer GST-Matrix (Novagen) wurden in 300 µl modifiziertem RIPA-Puffer [RIPA-Puffer mit 0,5 % (w/v) Milchpulver] mit rekombinantem FGF-2²³ für 25 Minuten auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für zwei Minuten bei 3000xg zentrifugiert und dreimal mit RIPA-Puffer sowie dreimal mit PBS für je fünf Minuten gewaschen. Die GST-Matrix wurde nachfolgend in 2x Laemmlipuffer aufgenommen, bei 94 °C für fünf Minuten aufgekocht und zwei Minuten bei 19500xg zentrifugiert. Wurde statt des rekombinanten FGF-2²³ ein Extrakt aus Schwann-Zellen benutzt, die FGF-2²³-DsRed konstitutiv überexprimieren, so wurde das rekombinante SMN-Protein zunächst für 30 Minuten in Blockierlösung [Modifizierter RIPA-Puffer mit 1 M NaCl (Roth), 0,1 % Nonidet P40 (Sigma), 3 % (w/v) Milchpulver] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Reaktionslösung für zwei Minuten bei 3000xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das rekombinante SMN-Protein mit 20 µl des Extraktes aus Schwann-Zellen in einem Gesamtvolumen von 300 µl Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz zweimal mit modifiziertem RIPA-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert, das Pellet in 2x Laemmlipuffer aufgenommen, für fünf Minuten bei 94 °C inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei 19500xg zentrifugiert. Die Analyse der Bindungsreaktion erfolgte durch die Auftrennung der Proben mit einem 12,5 % Polyacrylamidgel und dem nachfolgenden Western Blot auf eine Hybond™ECL[®] Nitrocellulosemembran (Amersham). Zur Detektion von FGF-2²³, das an rekombinantes SMN-Protein gebunden hat, wurde die Membran mit einem monoklonalen anti-FGF-2 Antikörper (BD Biosciences) in Kombination mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper

per (Sigma-Aldrich) und ECL[®]-Reagenz (Amersham) analysiert. Um zu zeigen, daß die gleichen Proteinmengen von rekombinantem SMN-Protein verwendet wurden, wurden die eingesetzten Mengen der rekombinanten Proteine auf ein weiteres Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue Lösung gefärbt.

2.1.5 Pull down competition assay

Rekombinantes Wildtyp-SMN auf einer GST-Matrix (Novagen) wurde für 30 Minuten bei 4 °C in modifiziertem RIPA-Puffer [RIPA mit 300 mM NaCl (Roth), 1 % BSA (Sigma-Aldrich)] inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Für die Bindungsreaktion wurden ein Mikrogramm Wildtyp-SMN mit 2,5 µg *in vitro* translatiertem Gemin2-SPORT6 und einer ansteigenden Menge an rekombinantem FGF-2²³ für zwei Stunden in 300 µl Gesamtvolumen modifiziertem RIPA [RIPA mit 300 mM NaCl (Roth), 1 % BSA (Sigma-Aldrich)] bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für zwei Minuten bei 3000xg und 4 °C abzentrifugiert. Die GST-Matrix wurde dreimal mit eiskaltem RIPA-Puffer [RIPA mit 300 mM NaCl (Roth)] und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend mit 2x Laemmli-Puffer [125 mM Tris-Base (Roth) mit 30 % HCl (Fluka) auf pH 8,8, 4 % Natriumdodecylsulfat (SDS, BioRad), 20 % Glycerol (Sigma-Aldrich), 10 % Mercaptoethanol (Fluka), 2 mM Ethylen-diamin-tetraacetat (EDTA, Sigma-Aldrich), 0,05 % Bromphenolblau (Roth)] versetzt, fünf Minuten bei 94 °C aufgekocht und auf einem 12,5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden wie oben beschrieben auf eine Hybond[™]ECL[®] Nitrocellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen anti-Gemin2 Antikörper (Sigma-Aldrich) in Kombination mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus Sekundärantikörper (Sigma-Aldrich) und mit dem SuperSignal[®]West Femto Maximum Sensivity Substrate (Pierce) analysiert. Anschließend wurde der Blot in Glycinpuffer gewaschen und mit einem monoklonalen anti-FGF-2 Antikörper in Kombination mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus Sekundärantikörper (Sigma-Aldrich) und ECL[®]-Reagenz (Amersham) analysiert.

2.1.6 RNA-Bindungsversuch

Die U2 snRNA-Matrize wurde durch PCR-Amplifikation mit den Primern PC157-U2_F 5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTTGGCTAAGA-3' und PC158-U2_R 5'-GGGTGCACCGTTCCGGAGGTAAGTCAATA-3' unter Verwendung von KlenThermTaqPlatinum Polymerase (GeneCraft) synthetisiert und das PCR-Produkt nachfolgend in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pGEM-T-U2 snRNA wurde anschließend sequenziert. Die U2 snRNA wurde *in vitro* mit T7 RNA-Polymerase (Stratagene) transkribiert und mit [α -³³P]rUTP (Hartmann Analytik) markiert. Für den Bindungsversuch wurden 10 μ g GST-Wildtyp-SMN-Fusionsprotein mit 25 ng der radioaktiv markierten U2 snRNA und einer steigenden Menge an rekombinantem FGF-2²³ inkubiert. Die Bindungsreaktion erfolgte für zehn Minuten in 400 μ l RB-Puffer [RNA-Bindepuffer: 150 mM NaCl (Roth), 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM Dithiothreitol (Sigma-Aldrich), 0,2 % (v/v) Nonidet P40 (Sigma-Aldrich)] auf Eis unter gelegentlichem Schütteln der Reaktion. Als unspezifische Inhibitoren wurden entweder 25 ng poly(dG-dC)·poly (dG-dC) (Amersham) oder tRNA (Sigma-Aldrich) benutzt. Die gebundenen Fraktionen wurden fünf Mal mit 800 μ l eiskaltem RB-Puffer gewaschen. Die RNA wurde von dem gebundenen Protein mit TRIzol[®] (Invitrogen) nach Herstellerangaben gelöst, aufgereinigt und nachfolgend durch Dot-Blotting visualisiert. Dazu wurden die aufgereinigten Fraktionen auf eine HybondTMN⁺-Membran (Amersham) übertragen, die anschließend für zwei Tage bei -80 °C auf einem Röntgenfilm exponiert wurde.

2.1.7 FGF-2²³-Methylierungsversuch

HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV2-FLAG-PRMT1 (Rho et al., 2001) transient transfiziert und nach 20 Stunden mit RIPA-Puffer lysiert. Desweiteren wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pCMV2-FLAG-PRMT5 (Rho et al., 2001) und pCMV2-FLAG-PRMT5(R368A) (Rho et al., 2001) transfiziert und ebenfalls nach 20 Stunden mit RIPA-Puffer lysiert. Die PRMTs wiesen ein FLAG-Epitop auf, mit dem es möglich war, diese durch Immunpräzipitation aufzureinigen. Die so aufgereinigten PRMTs wurden an Protein-G Sepharose (Amersham) gekoppelt und nachfolgend durch Western Blot untersucht. Für die Methylierung wurden 2,5 μ g FGF-2²³ beziehungsweise myelin basic protein (MBP, Sigma-Aldrich), das als Positivkontrolle für die Methylierung durch PRMT5 dient, mit 10 μ l FLAG-PRMT1 beziehungsweise

Material & Methoden

20 µl FLAG-PRMT5 und 0,25 µCi SAM [S-Adenosylmethionin: [carboxyl-¹⁴C], 10 µCi (Hartmann Analytik)] in einem Gesamtvolumen von 30 µl PRMT-Puffer [25 mM Tris-Base (Roth), pH 7,5 mit 30 % HCl (Fluka), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), pH 8,0, 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich), pH 8,0, 1x Complete™ Proteaseinhibitoren (Roche)] für zwei Stunden bei 30 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Ebenso wurde mit den entsprechenden Kontrollen verfahren. Die Methylierungsreaktion wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand mit Ladepuffer [40 % Sucrose (Roth), 0,1 % Bromphenolblau (Roth)] versetzt und einer Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem 8 % nativen Polyacrylamidgel unterworfen. Das Gel wurde kurz in H₂O gewaschen, für eine Stunde in Fixierlösung [10 % Glycerol (Sigma-Aldrich), 20 % Methanol (JT Baker), 70 % H₂O] fixiert und für 15 Minuten in Amplify (Amersham) inkubiert. Anschließend wurde das Gel acht Stunden bei 50 °C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition auf einen Röntgenfilm erfolgte für zwei Tage bei -80 °C.

2.1.8 Proteinexpression

Rekombinantes Wildtyp-SMN und die entsprechenden Deletionsmutanten in pET-41a wurden für die Proteinexpression in *Escherichia coli* BL21(DE3) transformiert. 2,5 ml Übernachtskulturen in LB-Medium (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich) mit 30 µg/ml Kanamycin (GibcoBRL) wurden zunächst zentrifugiert und mit 2 ml frischem 2x LB-Medium versetzt. Damit wurden 23 ml 2x LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin inokuliert und bis zum Erreichen einer OD (600 nm) von 0,6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG (Roth) induziert und die Bakterien für weitere drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für fünf Minuten auf Eis inkubiert, für 10 Minuten bei 4500xg zentrifugiert, einmal mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0 [20 mM Tris-Base (Roth) mit 30 % HCl (Fluka) auf pH 8,0] gewaschen und bei -20 °C eingefroren.

Rekombinantes FGF-2 in pTrcHis-A (Invitrogen) wurde für die Proteinexpression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)-trx transformiert. Dieser ermöglicht aufgrund der Expression des Proteins Thioredoxin eine erhöhte Solubilität *E. coli*-fremder Proteine. Eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich) mit 25 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) und 100 µg/ml Ampicillin (Roth) wurden zunächst zentrifugiert und mit 1 ml frischem 2x LB-Medium versetzt. Damit wurden 40 ml 2x LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und bis zum Erreichen einer OD (600 nm) von 0,8 bei 30 °C inkubiert. Die Proteinexpression

wurde mit 0,1 mM IPTG (Roth) induziert und die Bakterien für vier Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde nachfolgend für 15 Minuten bei 4500xg und 4 °C zentrifugiert.

Gemin2 wurde unter Benutzung des SP6-QuickCoupled-*in vitro*-Transkription/Translation-Systems (Promega) ausgehend vom cDNA-Klon Gemin2-pCMV-SPORT6 (IRAVp968A055103D6; RZPD, Berlin; (Lennon et al., 1996)) gemäß Herstellerangaben synthetisiert.

2.1.9 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung von GST-Fusionsproteinen wurden die aufgetauten *E. coli* BL21(DE3) Bakterienzellen mit dem BugBuster[®]-Reagenz (Novagen) [supplementiert mit 5KU Lysozym (Biomol) und 125 U Benzonase[®]Nuclease (Novagen), 1x Complete[™] Proteaseinhibitoren (Roche)] gemäß Herstellerangaben lysiert. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit einer GST-Agarose Matrix (Novagen) auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 3000xg und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die GST-Agarose Matrix einmal mit GST Bind/Wash Buffer [4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,3], zweimal mit supplementierten GST Bind/Wash Buffer [GST Bind/Wash Buffer mit 500 mM NaCl (Roth) und 0,1 % (v/v) Tween20 (Roth)] und einmal mit GST Bind/Wash Buffer gewaschen.

Zur Gewinnung von Histidin-markierten Proteinen wurde das Bakterienpellet in 2,5 ml Sonifizierungspuffer A [50 mM BNAP [200 mM NaH₂PO₄ (Roth), 200 mM Na₂HPO₄ (Roth), pH 7,0], 300mM NaCl (Roth)] supplementiert mit 1 mg/ml Lysozym (Biomol) resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden nun erneut zentrifugiert, das Pellet in modifiziertem Sonifizierungspuffer A [Sonifizierungspuffer A mit 1x Complete[™] Proteaseinhibitoren (Roche)] resuspendiert und 2 % (v/v) Triton-X-100 (Roche) hinzugegeben. Die Bakterienlösung wurde jeweils drei Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem mit Wasser gefülltem Becherglas aufgetaut. Um die chromosomale DNA zu scheren, wurden die Zellen mindestens dreimal auf Eis sonifiziert [30 Sekunden Impuls, 7 Zyklen, Impulsstärke: 40-50 %], anschließend für 40 Minuten bei 4 °C und 195 00xg zentrifugiert und der Überstand im flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem so gewonnenen Lysat wurde an-

Material & Methoden

schließlich mit Sepharose, an die Nickelionen gebunden waren, das Histidin-markierte FGF-2 aufgereinigt. Dazu wurden zunächst chelatierende Sepharosematrix (Chelating Sepharose™ Fast Flow, Pharmacia) gemäß Herstellerangaben mit NiSO₄ (Sigma-Aldrich) versetzt. Die Sepharose wurde anschließend mit Sonifizierungspuffer B [50 mM BNAP, pH 7,0, 1,5 M NaCl (Roth), 20 mM Imidazol (Sigma-Aldrich)] equilibriert und in eine Durchflusssäule (Terumo) gegeben. Dem Lysat wurde Imidazol (Sigma-Aldrich) bis zu einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben, sowie die NaCl-Konzentration auf 1,5 M NaCl erhöht, um die Aufreinigung des Hexa-Histidin-markierten FGFs zu verbessern. Die Sepharose wurde anschließend mit 200 Säulenvolumina Sonifizierungspuffer B und mit 200 Säulenvolumina modifiziertem Sonifizierungspuffer B [Sonifizierungspuffer B mit 10 % Glycerol (v/v) (Sigma-Aldrich)] bei 4 °C gewaschen. Zur Elution des Proteins wurde Elutionspuffer [50 mM BNAP, pH 7,0, 300mM NaCl (Roth), 10 % Glycerol (v/v) (Sigma), 300 mM Imidazol (Sigma-Aldrich)] verwendet. Um die erhaltenen Proteinmengen zu bestimmen wurde ein Aliquot sowohl der rekombinanten Proteine auf der GST-Agarose Matrix als auch der eluierten beziehungsweise *in vitro* translatierten Proteine einer SDS-PAGE unterzogen und das Polyacrylamidgel nachfolgend mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung [45 % Methanol (JT Baker), 10 % Essigsäure (JT Baker), 0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 (Merck)] gefärbt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidkonstrukte und Subklonierung

Für die Amplifikation von FGF-Isoformen wurde folgendes Programm verwendet: Initiale Denaturierung 94 °C, 5 min / Denaturierung 94 °C, 1 min / Annealing T_M-5 °C, 1 min / Elongation 72 °C, 1 min/kb / 27 Zyklen / finale Elongation 72 °C, 15 min. Da der 5'-Terminus der HMW FGF-2 codierenden Sequenz sehr G/C-reich ist, wurde eine dafür optimierte PCR benutzt. Der verwendete Ansatz enthielt 40 µM jedes dNTPs (Invitrogen), 50 pmol des jeweiligen Primers (MWG), PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen), 1x Q-Solution (Qiagen), 2 U der KlenThermTaqPlatinum Polymerase (Genecraft) und 0,5 µg des entsprechenden Plasmids. Die 21 kDa-Isoform von FGF-2 wurde durch PCR-Amplifikation mit den Primern PC164-FGF2-21-F und PC165-FGF2-21-R erhalten, wodurch das Plasmid pFGF-2²¹ entstand. FGF-2²³Δ8-

23-EGFP und pFGF-2²³Δ17-28-EGFP entstanden durch PCR-Mutation bei der Amplifikation von FGF-2²³ mit den Primern PC138-3xFLAG-23-F und PC139-3xFLAG-23-R. Daraus entstanden die Plasmide pFGF-2²³Δ17-28 und pFGF-2²³Δ8-23. In diesen Fällen diente das Plasmid pDsRed-23 als Matrize. Die FGF-2 Mutante FGF-2^{23-NT}R4/6H wurde mit den Primern PC220-FGF-R/H und PC43-NTERM-Xho amplifiziert. In diesem Fall diente als Matrize das Plasmid pGEM-T-NT¹⁻³⁴, das für den G/C reichen Aminoterminus von FGF-2²³ codiert. Daraus entstand das Plasmid pFGF-2^{23-NT}R4/6H. Die FGF-2 Mutante FGF-2^{23-NT}Δ21-27 wurde durch PCR-Amplifikation mit den Primern PC47-23F-Nhe und PC183-rev_1b beziehungsweise PC184-fwd_2b und PC181_sNT_rev erhalten. Als Matrize diente ebenfalls das Plasmid pGEM-T-NT¹⁻³⁴. PC47-23F-Nhe und PC183-rev_1b dienten dabei zur Amplifikation der Sequenz, die für die Aminosäuren 1-20 codiert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert. Daraus resultierte der Vektor pGEM-T-FGF-2^{23-NT}Δ21-27I. PC181_sNT_rev und PC184-fwd_2b dienten zur Amplifikation der Sequenz, die für die Aminosäuren 27-34 codiert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert. Daraus resultierte der Vektor pGEM-T-FGF-2^{23-NT}Δ21-27II. Beide PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pDsRed2 (BD Biosciences) kloniert, woraus der Vektor pFGF-2^{23-NT}Δ21-27 resultierte. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer sind in Tabelle 1 dargestellt. Sämtliche PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und nachfolgend in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert. Nach einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen wurde die PCR-Produkte in den Vektor pDsRed1 (BD Biosciences) beziehungsweise pEGFP-N1-3 (BD Biosciences) kloniert. Für die DNA-Analyse wurden ungefähr 100 ng DNA mit 1 U Enzym im dazugehörigen Puffer und der entsprechenden Temperatur für 30 Minuten verdaut. Für präparative Zwecke wurden 1-5 µg DNA mit 15 U des jeweiligen Enzyms (MBI Fermentas) im dazugehörigen Puffer (MBI Fermentas) und der entsprechenden Temperatur für drei Stunden verdaut. Die Subklonierung der PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T (Promega) erfolgte gemäß Herstellerangaben. Für die Subklonierung der PCR-Produkte in die Vektoren pDsRed1 und pDsRed2 beziehungsweise pEGFP-N1-3 wurde ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 gewählt. Die Ligationsreaktion erfolgte mit T4-DNA-Ligase (Promega) gemäß Herstellerangaben über Nacht bei 15 °C. Humanes Wildtyp-SMN (Aminosäurenreste 1-294) wurde durch PCR-Amplifikation mit den Primern

PC105-SMN-1-F und PC113-SMN-294-R erhalten, der Klon IMAGp998P0910174Q2 (RZPD) diente als Matrize. Die hier verwendeten Deletionsmutanten wurden mit den entsprechenden Primern hergestellt (siehe Tabelle 1), auch hier diente der Klon IMAGp998P0910174Q2 als Matrize für die PCR. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem Standard-Agarosegel analysiert [0,7-2 % Agarose (w/v) (Sigma-Aldrich) in TBE-Puffer [Tris-Borat-EDTA: 89 mM Tris-Base (Roth), 89 mM Borsäure (Merck), 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich)], 2×10^{-4} % (v/v) Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich)]. Die entsprechenden Banden wurden mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und nachfolgend in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert. Die sequenzierten PCR-Produkte wurden nachfolgend in den Vektor pET-41a (Novagen), der die aminoternale Markierung mit GST (Glutathion S-Transferase) erlaubt, im Leserahmen kloniert. Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tabelle 3 dargestellt.

2.2.2 Transformation von Bakterien

100 µl auf Eis aufgetaute, kompetente DH5α-Zellen wurden mit dem Ligationsansatz versetzt und für zehn Minuten im Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 42 °C für zwei Minuten einem Hitzeschock unterworfen und für weitere zwei Minuten im Eis inkubiert. Danach wurde der Bakteriensuspension 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika zugesetzt, für 1 h bei 37 °C inkubiert, zwei Minuten bei 8000xg zentrifugiert und in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde auf geeigneten LB-Agar-Platten mit Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Plasmid isolation aus *E. coli*

Für die Plasmid isolation wurden fünf Milliliter (Miniprep) oder 40 ml (Midiprep) LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie, die das jeweils gewünschte Plasmid enthielt, angeimpft und für 17 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Minipreps wurden 1,5 ml Zellsuspension im Eppendorfgefäß für 60 s bei 16100xg zentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer I [50 mM Tris-Base (Roth), pH 8,0, mit 30 % HCl (Fluka), 10 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml gekochte Ribonuklease A (Sigma-Aldrich)] resuspendiert. Danach wurden 300 µl Puffer II [200 mM NaOH (Fluka), 1 % SDS (BioRad)] dazugegeben.

Die so erhaltene Suspension wurde vorsichtig gemischt und 4 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer III [3 M Kaliumacetat (Sigma-Aldrich), pH 4,8 mit 30 % HCl (Fluka)] zugegeben, die Suspension kräftig gemischt und 15 min bei 14000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen, mit Isopropanol vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die so erhaltene Suspension 30 min bei 14000xg und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Ethanol (70 % JT Baker) gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Die Midiprep wurde mit dem Nucleobond AX 100-Kit (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in autoklaviertem H₂O aufgenommen und die Konzentration der DNA photometrisch in einem Beckmann-Photometer gemessen.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur und Transfektion

HEK293T-Zellen wurden in HEK/DMEM-Medium [HEK/Dubelcco's modified Eagle's Medium: DMEM High Glucose (PAA), 10 % fetales Kälberserum (v/v) (FCS Gold, PAA), 2 mM L-Glutamin (PAA), 1 mM Natriumpyruvat (PAA), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PAA)] bei 37 °C in einem befeuchteten 5 % CO₂ / 95 % O₂ Brutschrank kultiviert. Bei Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA [0,05 % (w/v) Trypsin, 0,83 mM EDTA (beides PAA)] abgelöst. Anschließend wurden die so behandelten Zellen in ein mit HEK/DMEM-Medium gefülltes 15 ml Reagenzgefäß (Falcon) überführt und für fünf Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Das Medium wurde nach dem Zentrifugieren entfernt, die Zellen in HEK/DMEM-Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:20 in neuen Kulturflaschen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Metafectene (Biontex) gemäß Herstellerangaben.

2.3.2 Demethylierung mit Adenosindialdehyd

HEK293T-Zellen wurden bis zur 60 %igen Konfluenz auf Glasplättchen (Menzel) kultiviert, die mit PLL (Poly-L-Lysin, Sigma-Aldrich): beschichtet waren, und nachfolgend für 24 Stunden mit AdOx [Adenosindialdehyd (Sigma-Aldrich), 0,5 M Stammlösung in

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)] in einer Endkonzentration von 20 μM inkubiert. Als Kontrolle diente die entsprechende Menge an DMSO. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 4 % PFA/PBS [8 % Paraformaldehyd (Fluka) in Phosphat buffered saline] fixiert und mittels Immuncytochemie analysiert.

2.3.3 Immuncytochemie

Die fixierten HEK-Zellen wurden für 10 Minuten in TBS [Tris buffered saline: 20 mM Tris-Base (Roth), 137 mM NaCl (Roth), pH 7,4 mit 30 % HCl (Fluka)] gewaschen und anschließend für eine Stunde in Blockierlösung [0,5 M TBS, pH 7,4, 3 % (w/v) Milchpulver (Heirler), 0,5 % Triton-X-100 (Roche)] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Alle Antikörper wurden in Blockierlösung verdünnt, die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für den angegebenen Zeitraum. Nach der Antikörperinkubation erfolgte jeweils ein Waschschrift von dreimal fünf Minuten mit TBS. Als Erstantikörper diente ein α -FGF-2 Antikörper (Sigma, Verdünnung 1:1000), die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden. Als Zweitantikörper diente ein α -rabbit-Cy2-Antikörper (Jackson/Dianova, Verdünnung 1:400). Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten. Zur Markierung der Zellkerne wurden die Zellen für 10 Minuten mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma, Verdünnung 1:1000) inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift von dreimal fünf Minuten mit TBS, die Überführung der Deckgläschen auf Objektträger (Menzel) und die Eindeckelung in ProLong Gold (Molecular Probes), um ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

2.3.4 Zählung der SMN-positiven Kernkörper und statistische Auswertung

Die Anzahl der SMN-positiven Kernkörper wurde in transfizierten HEK293T-Zellen in $n=3$ unabhängigen Experimenten gezählt. Pro Durchgang wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet. Die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper wurde mit dem Chi-Quadrat-Test auf statistische Signifikanz hin überprüft.

Folgende Anzahl an Zellen lagen den Daten zugrunde: SMN¹⁻²⁹⁴/Kontrolle: $n = 619$, SMN¹⁻²⁹⁴/FGF-2¹⁸: $n = 377$, SMN¹⁻²⁹⁴/FGF-2²³: $n = 636$, SMN²⁸⁻²⁹⁴/Kontrolle: $n = 557$, SMN²⁸⁻²⁹⁴/FGF-2¹⁸: $n = 501$, SMN²⁸⁻²⁹⁴/FGF-2²³: $n = 502$.

2.3.5 Mikroskopie

Die Epifluoreszenz der transfizierten Zellen wurden mit dem inversen Olympus IX-70 Fluoreszenzmikroskop (Olympus) beobachtet. Abbildungen der Zellen wurden mit einer gekühlten Slowscan CCD Colorview Kamera (Soft Imaging Systems) und dem Programm Analysis (Soft Imaging Systems) erstellt. Die Epifluoreszenz von Zellen auf Objektträgern wurden mit einem aufrechten Olympus BX-60 Mikroskop (Olympus) beobachtet. Abbildungen der Zellen wurden ebenfalls mit dem Programm Analysis (Soft Imaging Systems) erstellt. Als Kamera diente eine CCD Colorview 12-Kamera (Soft Imaging Systems). Für die Beobachtung grünfluoreszierender Proteine beziehungsweise des Cy2-Antikörpers wurde der Filter UMNB (Olympus, Anregungsspektrum: 470-490 nm; Sperrfilter: > 515 nm), für rotfluoreszierende Proteine der Filter UMNG (Olympus, Anregungsspektrum: 530-550 nm, Sperrfilter: > 590 nm) verwendet. Der Filter UMNU (Olympus, Anregungsspektrum: 360-370 nm, Sperrfilter: > 420) wurde für die Beobachtung der Kernfärbung mit DAPI, die sich blau darstellte, verwendet.

Material & Methoden

Name	Sequenz	Restriktions-schnittstelle	Amplifikation
PC164-FGF2-21-F PC165-FGF2-21-R	5'-ATTAAGCTTATGGGGGGCCGAGGCC-3' 5'-AATGAATTCTGCTCTTAGCAGACATT-3'	<i>Hind</i> III <i>Eco</i> RI	FGF-2 ²¹
PC138-3xFLAG-23-F PC139-3xFLAG-23-R	5'-ATTAAGCTTATGGCAGCCCGCGGGCGAGGCC-3' 5'-ATTGAATTCACGCTCTTAGCAGACA-3'	<i>Hind</i> III <i>Eco</i> RI	FGF-2 ²³ 3xFLAG FGF-2 ²³ Δ17-28 FGF-2 ²³ Δ8-23
PC47-23F-Nhe PC183-rev_1b PC184-fwd_2b PC181_sNT_rev	5'-TATGCTAGCGATCCGAGCTCATGGCAG-3' 5'-GCTCTAGACGGGGCTCCCCGGCCCCGA-3' 5'-GCTCTAGATCCCGGGGCGCGGA-3' 5'-CAGTGAGCGCAACGCAATTAATG-3'	<i>Nhe</i> I <i>Xba</i> I <i>Xba</i> I	FGF-2 ²³ Δ21-27
PC105-SMN-1-F PC107-SMN-90-R	5'-GAATTCATGATGGCGATGAGCAGCGGC-3' 5'-GTCGACATTGTAAGGAAGCTGC-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 1-90
PC105-SMN-1-F PC108-SMN-123-R	5'-GAATTCATGATGGCGATGAGCAGCGGC-3' 5'-GTCGACAACAGGTTTCTCTCTT-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 1-123
PC105-SMN-1-F PC113-SMN-294-R	5'-GAATTCATGATGGCGATGAGCAGCGGC-3' 5'-GTCGACAATTTAAGGAATGTGAGCACCT-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 1-294
PC105-SMN-1-F PC111-SMN-239-R	5'-GAATTCATGATGGCGATGAGCAGCGGC-3' 5'-GTCGACATCCAGAAGGAAATGG-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 1-239
PC106-SMN-28-F PC113-SMN-294-R	5'-GAATTCATGAGCGATGATTCTGAC-3' 5'-GTCGACAATTTAAGGAATGTGAGCACCT-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 28-294
PC112-SMN-235-F PC113-SMN-294-R	5'-GAATTCATGCCATTTCTTCTGGA-3' 5'-GTCGACAATTTAAGGAATGTGAGCACCT-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 235-294
PC133-SMN-79-F PC108-SMN-123-R	5'-TAGAATTCATGAGCCAAAAGAAGAATACTGC-3' 5'-GTCGACAACAGGTTTCTCTCTT-3'	<i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	SMN 79-123
PC157-U2-F PC158-U2-R	5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTGGCTAAGA-3' 5'-GGGTGCACCGTTCCGGAGGTACTGCAATA-3		U2snRNA

Tabelle 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer

Primärantikörper	Spezifität	Beschreibung	Hersteller	Verwendung
anti-SMN	SMN	Maus, monoklonal	BD Biosciences	Western Blot (1:5000), Immunpräzipitation (0,5 µg)
anti-FGF-2	FGF-2	Maus, monoklonal	BD Biosciences	Western Blot (1:1000)
anti-FGF-2	FGF-2	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich	Immuncytochemie (1:1000)
anti-FLAGM2	FLAG-tag	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	Western Blot (1:5000), Immunpräzipitation (2 µg)
anti-HistonH3	HistonH3	Kaninchen, polyklonal	Cell Signalling Technology	Western Blot (1:1000)
anti-Gemin2	Gemin2	Maus, monoklonal	BD Biosciences	Western Blot (1:1000)
anti-Gemin2	Gemin2	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	Western Blot (1:1000)

Sekundärantikörper	Spezifität	Beschreibung	Hersteller	Verwendung
Cy2	Ziege- anti-Kaninchen IgG	Cyanin- konjugiert, polyklonal	Jackson/Dianova	Immuncytochemie (1:400)
HRP	Ziege-anti-Maus IgG	HRP-konjugiert, polyklonal	Amersham	Western Blot (1:10000)
HRP	Maus- anti-Kaninchen IgG	HRP-konjugiert, polyklonal	Sigma-Aldrich	Western Blot (1:10000)

Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Material & Methoden

Protein	Konstrukt	Plasmid	Restriktionsschnittstellen
SMN 1-90	pSMN1-90	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 1-123	pSMN1-123	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 79-123	pSMN79-123	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 1-239	pSMN1-239	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 1-294	pSMN1-294	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 28-294	pSMN28-294	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 235-294	pSMN235-294	pET41a(+)	<i>EcoRI/SalI</i>
SMN 1-294-EGFP	pEGFP-SMN	pEGFP-N1	<i>EcoRI/BamHI</i>
SMN 28-294-EGFP	pEGFP-SMN ²⁸⁻²⁹⁴	pEGFP-N1	<i>EcoRI/BamHI</i>
FGF-2 ¹⁸	pEGFP-18	pEGFP-N1	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ¹⁸	pDsRed-18	pDsRed1	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²¹	pDsRed-21	pDsRed2	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³	pDsRed-23	pDsRed1	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ Δ8-23	pFGF-2 ²³ Δ8-23	pEGFP-N3	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ Δ17-28	pFGF-2 ²³ Δ17-28	pEGFP-N3	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ _{NT} Δ21-27	pDsRed-FGF-2 ²³ _{NT} Δ21-27	pDsRed2	<i>NheI/XhoI</i>
FGF-2 ²³ _{NT} R4/6H	pFGF-2 ²³ _{NT} R4/6H	pDsRed2	<i>NheI/XhoI</i>
AARGRAA	pDsRed-73/74	pDsRed2	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ 3xFLAG	pFGF-2 ²³ 3xFLAG=pAFBV	p3xFLAG	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²¹	pGEM-T-FGF-2 ²¹	pGEM-T	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ Δ8-23	pGEM-T-AFBI	pGEM-T	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ Δ17-28	pGEM-T-AFBII	pGEM-T	<i>EcoRI/HindIII</i>
FGF-2 ²³ _{NT} Δ21-27I	pGEM-T-FGF-2 ²³ _{NT} Δ21-27I	pGEM-T	<i>NheI/XbaI</i>
FGF-2 ²³ Δ21-27II	pGEM-T-FGF-2 ²³ _{NT} Δ21-27II	pGEM-T	<i>XbaI/XhoI</i>
FGF-2 ²³ _{NT} R4/6H	pGEM-T-FGF-2 ²³ _{NT} R4/6H	pGEM-T	<i>NheI/XhoI</i>
FGF-2 ²³ 3xFLAG	pGEM-T-AFBV	pGEM-T	<i>EcoRI/HindIII</i>
U2 snRNA	pGEM-T-U2snRNA	pGEM-T	
Gemin2	pGemin2SPORT6	pSPORT6	<i>EcoRI/NotI</i>
Coilin	pCoilin	pEGFP-N1	<i>HindIII/NheI</i>
PRMT1	pCMV2-FLAG PRMT1	p3xFLAG	<i>HindIII/XbaI</i>
PRMT1(G80R)	pCMV2-FLAG PRMT1(G80R)	p3xFLAG	<i>HindIII/XbaI</i>
PRMT5	pCMV2-FLAG PRMT5	p3xFLAG	<i>HindIII/SalI</i>
PRMT5(R368A)	pCMV2-FLAG PRMT5(R368A)	p3xFLAG	<i>HindIII/SalI</i>
FGF-2 ²³	pTrcHis-FGF-2	pTrcHis	<i>EcoRI/HindIII</i>

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide

3. Ergebnisse

3.1 FGF-2²³ bindet direkt an die Aminosäurereste 1-90 des survival of motoneuron (SMN) Proteins

Die bisherigen Daten zu einer Interaktion zwischen dem Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) und dem survival of motoneuron (SMN) Protein beruhten auf einer Co-lokalisations- und Immunpräzipitationsstudie, in der gezeigt wurde, daß die 23 kDa-Isoform von FGF-2 mit dem SMN-Protein in SMN-positiven Kernfoci co-lokalisiert und in einem gemeinsamen Komplex vorliegt (Claus et al., 2003). Das SMN-Protein ist ein Assemblierungsprotein der U snRNPs, die eine wichtige Rolle im pre-mRNA-Spleißen spielen. Um zu überprüfen, ob die beschriebene Interaktion zwischen der 23 kDa-Isoform von FGF-2 und dem survival of motoneuron Protein auf einer direkten Bindung beider Proteine beruht, wurde eine *in vitro* Bindungsstudie mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Diese Methode erlaubte zudem die Domäne des SMN-Proteins zu bestimmen an die FGF-2²³ gebunden hat. Dazu wurden humanes SMN¹⁻²⁹⁴, welches das Wildtyp (wt)-Protein repräsentiert, und verschiedene Mutanten des SMN-Proteins als Fusionsproteine mit GST exprimiert, auf eine Glutathionagarosematrix immobilisiert und mit rekombinanten murinen FGF-2²³ inkubiert. Murines FGF-2²³ unterscheidet sich im Aminoterminus nur geringfügig von humanem FGF-2²³ (Dono et al., 1998). Die eingesetzten Proteinmengen der GST-SMN-Proteine und FGF-2²³ wurden als Auftragskontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen und durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue visualisiert. Als Negativkontrolle wurde FGF-2²³ mit der Glutathionagarose-Matrix allein inkubiert. Eine direkte Interaktion beider Proteine wurde durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot visualisiert. Das Ergebnis der *in vitro* Bindungsstudie ist in Abbildung 3a dargestellt. Die 23 kDa-Isoform von FGF-2 bindet sowohl an das wt-SMN als auch an eine C-terminal trunkierte Form des SMN-Proteins (SMN¹⁻²³⁹) direkt (Abb. 3a, Spuren 1 und 3). Die Bindung von FGF-2²³ an die Deletionsmutanten SMN¹⁻⁹⁰ und SMN¹⁻¹²³ zeigt eine Interaktion mit dem Aminoterminus von SMN (Abb. 3a, Spuren 4 und 5). Daraus läßt sich schließen, daß der aminoterminale Bereich des SMN-Proteins für eine Interaktion mit FGF-2²³ ausreicht. Interessanterweise bindet eine aminoterminale Mutante (SMN²⁸⁻²⁹⁴) FGF-2²³ in geringerem Ausmaß als das Wildtyp-Protein (Abb. 3a, Spur 2). Dies ist

Ergebnisse

ein Hinweis auf einen modulierenden Einfluß der von Exon 1 codierten Aminosäurereste 1-27 des SMN-Proteins auf die Bindung von FGF-2²³. An die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des SMN-Proteins, repräsentiert durch SMN²³⁵⁻²⁹⁴ und auch an die Tudordomäne, repräsentiert durch die Mutante SMN⁷⁹⁻¹²³, erfolgt keine Bindung (Abb. 3a, Spuren 6 und 7). Als Negativkontrolle wurde GST-Protein mit FGF-2²³ inkubiert, dabei konnte keine Bindung beobachtet werden (Abb. 3a, Spur 8). In Abbildung 3a, Spur 9 ist der Input an FGF-2²³-Protein gezeigt.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde der Versuch auch mit Zellextrakt aus FGF-2²³ überexprimierenden Schwann-Zellen durchgeführt. Während das in Schwann-Zellen exprimierte FGF-2²³ korrekt posttranslationale Modifikationen erfährt, ist dies bei rekombinant exprimierten FGF-2²³ nicht möglich. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 3b dargestellt. Auch in diesem Fall erfolgt die Bindung an die ersten 90 Aminosäurereste des SMN-Proteins in Abhängigkeit der Aminosäurereste 1-27 (Abb. 3b, Spuren 1 und 4). Abbildung 3b, Spur 8, zeigt die Negativkontrolle, in Spur 7 ist der Input an FGF-2²³-Protein gezeigt.

In Abbildung 3c ist das Ergebnis dieses Versuchs schematisch dargestellt. Interessanterweise überlappt die Bindungsdomäne von FGF-2²³ sowohl mit einer Domäne, die *in vitro* Nukleinsäuren binden kann (Bertrand *et al.*, 1999; Lorson und Androphy, 1998), als auch mit der Bindedomäne von Gemin2, einem essentiellen Bestandteil des SMN-Komplexes. Ob FGF-2²³ mit diesen beiden Faktoren um die Bindung kompetieren kann, wurde nachfolgend untersucht.

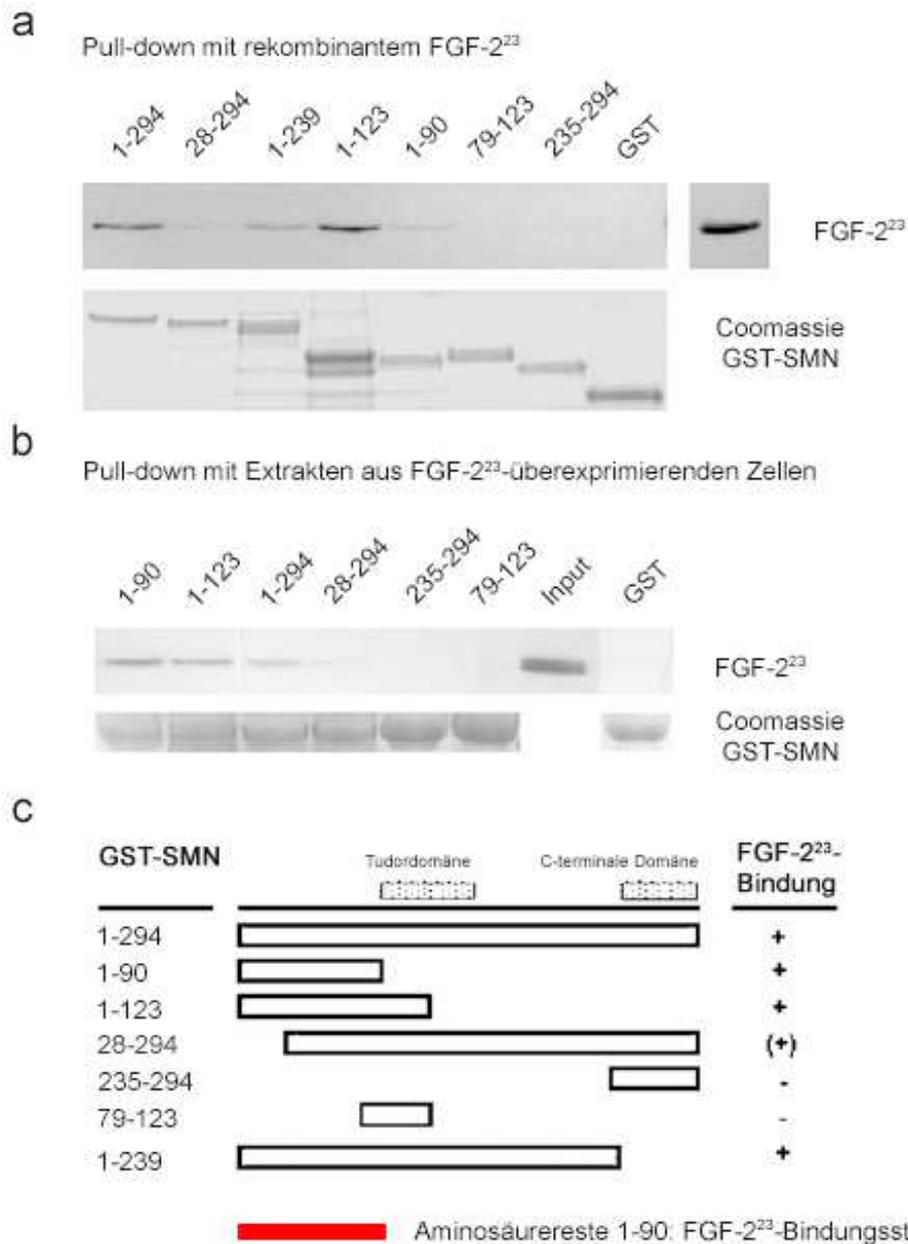


Abbildung 3: FGF-2²³ bindet direkt an die Aminosäurereste 1-90 des survival of motoneuron Proteins. **a)** Deletionsmutanten des SMN-Proteins, die als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden, wurden an eine Glutathionagarosematrix gebunden und mit rekombinarem FGF-2²³ inkubiert. Die Matrix wurde nach der Bindungsreaktion mit IP-Puffer und PBS gewaschen. Durch Western Blot mit einem FGF-2-Antikörper wurde die Bindungsintensität analysiert. Mit einer Coomassie Brilliant Blue-Färbung sollte gezeigt werden, daß gleiche Proteinmengen der SMN-Deletionsmutanten eingesetzt wurden. **b)** Dieser Versuch wurde mit Zellextrakt aus FGF-2²³-DsRed-überexprimierenden Schwann-Zellen wiederholt. Es wurden jeweils gleiche Mengen an GST-SMN eingesetzt, wie die Coomassie Brilliant Blue-Färbung zeigt. **c)** Das Ergebnis der Bindungsstudie ist hier zusammengefaßt. FGF-2²³ bindet direkt an die Aminosäurereste 1-90 des SMN-Proteins. Die Aminosäurereste 1-27 von SMN haben einen modulierenden Einfluß auf die Bindung von FGF-2²³. Die Bindungsintensitäten sind mit +, (+) und – gekennzeichnet.

3.2 Die Bindung von U2 snRNA an SMN wird durch FGF-2²³ nicht beeinflusst

Verschiedene U snRNAs können sequenzspezifisch an den SMN-Komplex binden (Yong et al., 2004a; Yong et al., 2002) und FGF-2²³ liegt in einem gemeinsamen Komplex mit U2 snRNA vor (Claus et al., 2004). Zudem weist die zentrale RG-reiche Sequenz von FGF-2²³ eine große Ähnlichkeit zu dem RNA-bindenden Motiv von hnRNPs auf. Da die Bindedomäne der 23 kDa-Isoform von FGF-2 mit einer Sequenz überlappt, die *in vitro* Nukleinsäuren binden kann (Bertrand et al., 1999; Lorson und Androphy, 1998), stellte sich die Frage, ob FGF-2²³ mit U snRNAs um die Bindung an SMN kompetieren und ob eine direkte Bindung von U snRNAs an FGF-2²³ erfolgen kann. Um dies zu beantworten, wurde eine *in vitro* Bindungsstudie durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4 gezeigt. Für die *in vitro* Bindungsstudie wurde rekombinantes GST-SMN¹⁻²⁹⁴ auf eine Glutathionagarosematrix immobilisiert und mit radioaktiv markierter [α -³³P] U2 snRNA sowie einer ansteigenden Menge an rekombinantem FGF-2²³, das auf eine Nickelmatrix immobilisiert wurde, inkubiert. Um zu überprüfen, ob FGF-2²³ die Kapazität besitzt RNA zu binden, erfolgte eine Inkubation von FGF-2²³ mit [α -³³P] U2 snRNA. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes GST-SMN¹⁻²⁹⁴ mit [α -³³P] U2 snRNA inkubiert. Poly(dG-dC):poly(dG-dC) oder tRNA (nicht gezeigt) dienten in diesem Versuch als unspezifische Kompetitoren. Als Negativkontrolle wurde [α -³³P] U2 snRNA mit der jeweiligen Matrix inkubiert, an der die rekombinanten Proteine gebunden waren. Visualisiert wurde das Ergebnis des Versuches durch einen Dot Blot der Fraktionen. Wie in Abbildung 4 (Spuren 2-4) zu sehen, fand keine Konkurrenz der [α -³³P] U2 snRNA mit FGF-2²³ um die Bindung an SMN statt. Nur bei Einsatz einer großen Menge an FGF-2²³ konnte eine Abnahme der Bindung von [α -³³P] U2 snRNA an SMN festgestellt werden (Spur 5). Obwohl die zentrale RG-reiche Sequenz von FGF-2²³ eine große Ähnlichkeit zu dem RNA-bindenden Motiv der hnRNPs hat, besaß es nicht die Kapazität [α -³³P] U2 snRNA zu binden, wie in Spur 7 zu sehen ist. Spur 1 zeigt wie erwartet eine Bindung von [³³P] U2 snRNA an SMN. Es erfolgte keine unspezifische Bindung der [³³P] U2 snRNA an die Matrix (Spuren 6 und 8). Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß es keine Konkurrenz zwischen der U2 snRNA und FGF-2²³ um die Bindung an SMN gab. Desweiteren zeigt es, daß FGF-2²³ nicht in der Lage war U2 snRNA zu binden.

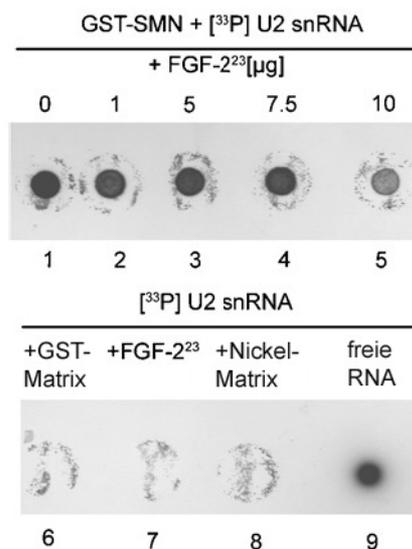


Abbildung 4: Die Bindung von U2 snRNA an SMN wird durch FGF-2²³ nicht beeinflusst. Eine konstante Menge an Glutathionagarosematrix immobilisiertes GST-SMN wurde mit radioaktiv markierter [α -³³P] U2 snRNA und einer steigenden Menge an rekombinantem FGF-2²³ inkubiert (Spur 1-5). Als unspezifische Kompetitoren diente tRNA (nicht gezeigt) oder poly (dG-dC)poly(dG-dC). Nach der Inkubation wurden die Glutathionagarosematrix gewaschen, die RNA mit TRIzol® isoliert und durch Dot Blot analysiert. Nur eine hohe Menge an FGF-2²³ konnte mit U2 snRNA um die Bindung an SMN kompetieren (Spur 5). Die radioaktiv markierte U2 snRNA zeigte keine unspezifische Bindung an die eingesetzten Matrices (Spur 6 und 8). Es konnte keine Bindung der U2 snRNA an FGF-2²³ detektiert werden (Spur 7).

3.3 FGF-2²³ kompetiert mit Gemin2/SIP1 um die Bindung an SMN

Die Domäne der Bindung der 23 kDa-Isoform von FGF-2 überlappt auch mit der von Gemin2, einem essentiellen Protein des SMN-Komplexes. Diese liegt im Bereich der Aminosäurereste 13-44, die von Exon 1 und Exon 2a codiert werden (Wang und Dreyfuss, 2001; Young et al., 2000b). Andere Studien weisen darauf hin, daß die Bindung von Gemin2 bei humanem SMN an die Aminosäurereste 52-91 erfolgt (Young et al., 2000b). Um zu untersuchen, ob FGF-2²³ mit Gemin2 um die Bindung an SMN kompetieren kann, wurde eine *in vitro* Bindungs-/Kompetitionsstudie durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt. Dazu wurde jeweils ein Mikrogramm rekombinantes GST-SMN-Protein auf eine Glutathionagarosematrix mit 2,5 Mikrogramm rekombinantem Gemin2 und einer ansteigenden Menge an rekombinantem FGF-2²³ inkubiert. Als Positivkontrolle diente die jeweilige Inkubation von

Ergebnisse

GST-SMN mit nur einem der beiden rekombinanten Proteine (Abb. 5, Spuren 1 und 2). Als Negativkontrolle wurde die GST-Matrix mit jeweils einem der rekombinanten Proteine inkubiert (Spuren 3 und 4). Wie in den Spuren 5-11 zu sehen, erfolgte eine Reduktion der Gemin2-Bindung bei Einsatz von zehn Mikrogramm FGF-2²³ (Spur 10). Daraus ergibt sich eine Stöchiometrie von 2:1 (FGF-2²³:Gemin2), da aktives FGF-2 zumeist als Dimer vorliegt (Davis et al., 1999). Dieses Ergebnis zeigt, daß FGF-2²³ und Gemin2 *in vitro* um die Bindung an SMN kompetieren können.

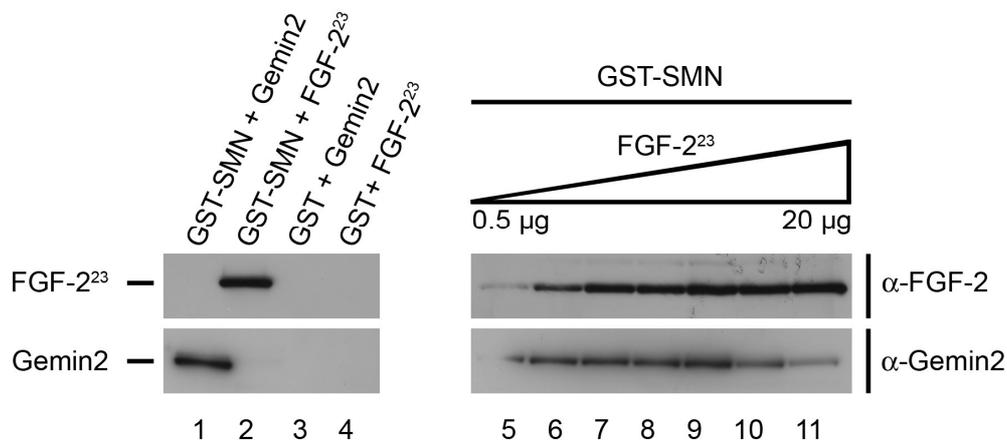


Abbildung 5: FGF-2²³ kompetiert mit Gemin2/SIP1 um die Bindung an SMN. Gemin2 wurde in einem *in vitro* Transkriptions/Translations-System exprimiert und jeweils gleiche Mengen mit rekombinantem GST-SMN, das auf einer Glutathionagarosematrix immobilisiert war, inkubiert. Zudem wurde eine steigende Menge an rekombinantem FGF-2²³ hinzugegeben (Spuren 5-11). Ab einem molaren Verhältnis von 2:1 (FGF-2²³:Gemin2) lag eine Kompetition vor. Die Spuren 3 und 4 zeigen, daß keine unspezifische Bindung an die Glutathionagarosematrix stattfand. Die Spuren 1 und 2 zeigen als Positivkontrollen, daß sowohl Gemin2 als auch FGF-2²³ an GST-SMN binden konnte.

3.4 Die Überexpression von FGF-2²³ in HEK293T-Zellen führt zu einer Reduktion von SMN positiven Kernkörpern

Interessanterweise zeigen immunocytochemische Daten von Fibroblasten aus Patienten mit SMA keine klaren Kernkörper sondern eine diffuse Verteilung sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern (Claus et al, unpubliziert). Dies ist ein Hinweis auf die Unfähigkeit dieser Zellen U snRNPs und SMN im Zellkern zu akkumulieren und spricht für die Bedeutung dieser Kernstrukturen in der Pathologie der SMA. Um auf zellulärer Ebene die Konsequenz der oben beschriebenen *in vitro* Kompetition und

damit den Einfluß von FGF-2²³ auf die Ausbildung der SMN-positiven Kernkörper zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pEGFP-SMN und pDsRed-23 co-transfiziert. Diese Plasmide codierten für ein Vollängen SMN-EGFP-Fusionskonstrukt beziehungsweise für ein FGF-2²³-DsRed-Fusionskonstrukt. Als Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pEGFP-SMN und pDsRed-N1 beziehungsweise pEGFP-SMN und pDsRed-18, welches für ein FGF-2¹⁸-DsRed-Fusionskonstrukt codierte, co-transfiziert. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Fluorophore konnten co-transfizierte Zellen identifiziert werden. Anschließend wurde die Anzahl der SMN-positiven Kernkörper bestimmt. Diese waren durch das EGFP-Signal leicht zu identifizieren. Die erhaltenen Anzahlen wurden gemäß der Häufigkeit der Kernkörper in Klassen eingeteilt und mit dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz hin analysiert. In Abbildung 6a sind Beispielabbildungen von HEK293T-Zellen zu sehen, die mit pEGFP-SMN transfiziert wurden. Dabei entsprach die Anzahl von zwei SMN-positiven Kernkörpern der durchschnittlichen Anzahl untransfizierter HEK293T-Zellen. Abbildung 6b zeigt das Verteilungsmuster der SMN-positiven Kernkörper. In den Kontrollzellen fand man am häufigsten Zellen, die zwei SMN-positive Foci haben. Bezogen auf die Häufigkeit folgten dieser Klasse Zellen mit drei oder vier SMN-positiven Foci. In Abbildung 6b ist deutlich zu sehen, daß sich die Überexpression von FGF-2²³ im Vergleich mit den Kontrollzellen auf die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper auswirkte. Wurde FGF-2²³-DsRed überexprimiert, so waren mehr Zellen zu beobachten, die zwei SMN-positive Kernkörper aufwiesen. Es gab also eine klare statistisch signifikante Linksverschiebung in der Anzahl der SMN-positiven Foci. Die 18 kDa-Isoform von FGF-2 hingegen nahm keinen signifikanten Einfluß auf die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper. Als zusätzliche Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit pEGFP-SMN²⁸⁻²⁹⁴ transfiziert. Bei dem von diesem Plasmid codierten EGFP-Fusionsprotein fehlten die ersten 27 Aminosäurereste des SMN-Proteins. Dadurch war sowohl die Interaktionsdomäne des SMN-Proteins für Gemin2 als auch die Interaktionsdomäne für FGF-2²³ teilweise deletiert. Wie in Abbildung 6b zu sehen, ist die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper in diesen Zellen hochsignifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Zellen, die SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP überexprimierten. Dies ist ein Hinweis auf die Notwendigkeit einer intakten Gemin2-Bindung für die Integrität der SMN-positiven Kernkörper. Vergleicht man die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper von SMN²⁸⁻²⁹⁴-EGFP/ FGF-2²³-DsRed überexprimierenden Zellen und den dazuge-

Ergebnisse

hörigen Kontrollzellen, so ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Das Ergebnis dieses Versuches spricht für einen Einfluß der 23 kDa-Isoform auf die Stabilität der SMN-positiven Kernkörper in diesem Zellkulturmodell.

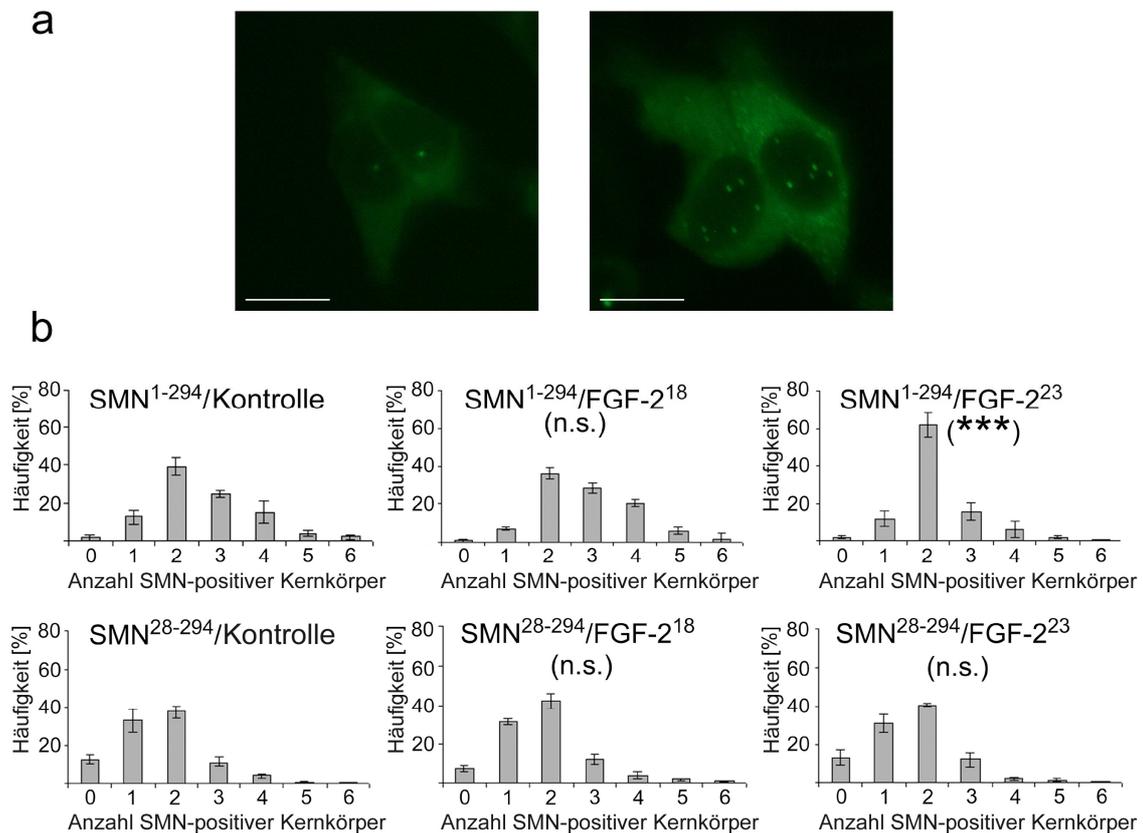


Abbildung 6: Die Überexpression von FGF-2²³ in HEK293T-Zellen führt zu einer Reduktion von SMN positiven Kernkörpern. **a)** Repräsentative Abbildung von HEK293T-Zellen, die ein SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP-Fusionskonstrukt überexprimieren. Meßbalken = 20 µm. **b)** Die Anzahl der SMN-positiven Kernkörper in co-transfizierten HEK-293T-Zellen wurde ausgezählt und die Häufigkeitsverteilung ermittelt. FGF-2²³ interagiert mit SMN¹⁻²⁹⁴ und zeigte einen statistisch signifikanten Einfluß auf die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper. Bei FGF-2¹⁸ war ein solcher Effekt nicht zu erkennen. Als zusätzliche Kontrolle diente ein SMN²⁸⁻²⁹⁴-EGFP-Fusionskonstrukt, bei dem die Bindestelle für Gemin2 teilweise deletiert war. Zwischen den Kontrollzellen und den mit FGF-2-Konstrukten transfizierten Zellen gab es in diesem Fall keinen statistisch signifikanten Unterschied. Es wurden n = 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. ***, p < 0.001 (Chi-Quadrat-Test).

3.5 Transgene FGF-2 Mäuse weisen eine verringerte Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern auf

Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von FGF-2²³ auch *in vivo* eine Verringerung der Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern hervorruft, wurden diese Kernkörper in Motoneuronen des lumbalen Rückenmarks drei Monate alter heterozygot transgener Mäuse ausgezählt. Diese Mäuse weisen eine Überexpression der humanen FGF-2 Isoformen (18 kDa, 21 kDa, 22,5 kDa und 34 kDa) in allen bisher untersuchten Geweben auf (Coffin et al., 1995). Als Kontrollgruppe dienten die entsprechenden Wildtyp-Mäuse derselben Würfe. Nach der Präparation und Fixierung des lumbalen Rückenmarks wurde die SMN-positiven Kernkörper immunhistochemisch mit einem α -SMN Antikörper visualisiert. Die Motoneurone wurden durch die Topologie der Vorderhornzellen des Rückenmarks und morphologisch durch die großen, multipolaren Zellkörper identifiziert. In Abbildung 7a sind Beispielabbildungen der Motoneurone gezeigt. Die Wildtyp-Mäuse (links) wiesen eine typische Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern auf, die bei ein bis zwei SMN-positiven Kernkörpern pro Zelle lag. Die transgenen Mäuse (rechts) hingegen eine deutliche Reduktion der Anzahl der SMN-positiven Kernkörper. Die SMN-positiven Kernkörper wurden bei den Wildtyp-Mäusen (n=7 Tiere und n=229 Motoneurone) und bei den transgenen FGF-2-Mäusen (n=8 Tiere und n=273 Motoneurone) bestimmt. Die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper wurde mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Es zeigte sich eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Gruppen (Abb. 7b). Wie auch im Zellkulturmodell bewirkte eine Überexpression von FGF-2²³ eine Verminderung der SMN-positiven Kernkörper. Mit dem Ergebnis dieses *in vivo* Experiments konnte man sowohl die biochemisch als auch die im Zellkulturmodell gewonnen Daten bestätigen.

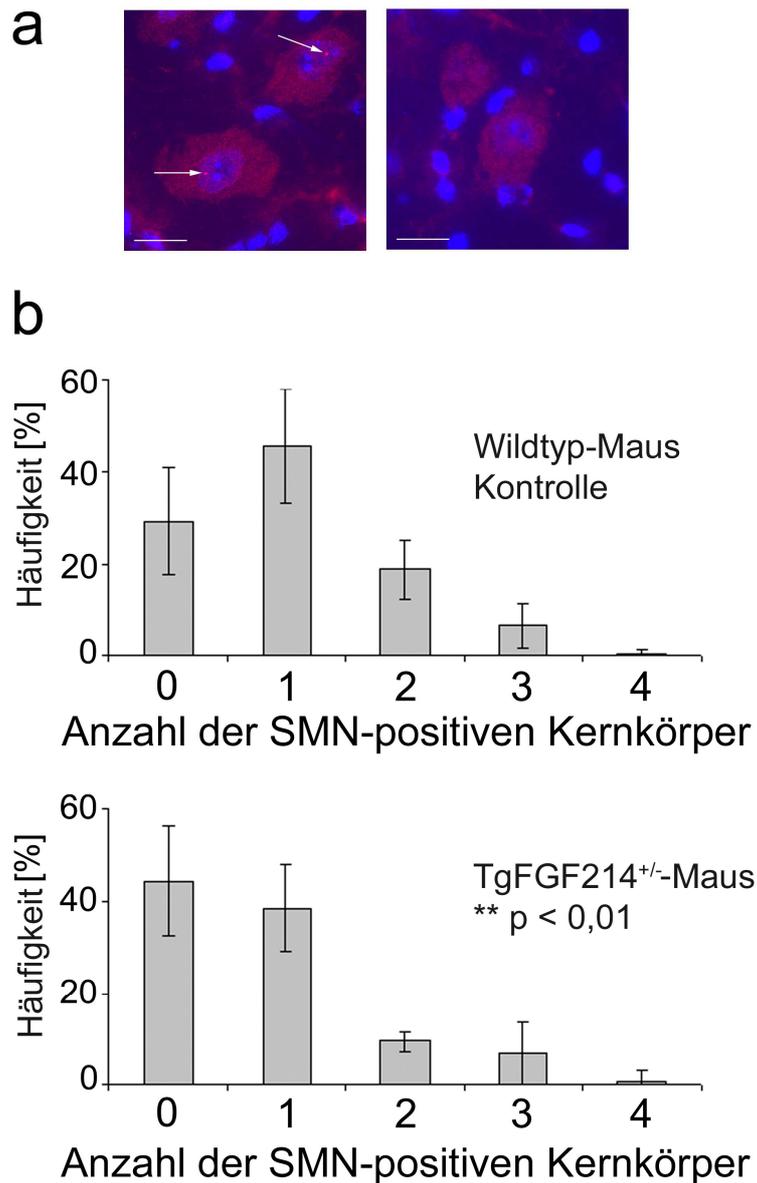


Abbildung 7: Transgene FGF-2 Mäuse weisen eine verringerte Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern auf. Motoneurone des lumbalen Rückenmarks FGF-2-transgener Mäuse (TgFGF-2), die alle Isoformen von FGF-2 überexprimieren und die entsprechenden Wildtypen wurden auf Unterschiede in der Verteilung der SMN-positiven Kernkörper analysiert. **a)** Repräsentative Motoneurone von transgenen (rechts) und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen (links) sind gezeigt. Die SMN-positiven Kernkörper wurden mit einem α -SMN-Antikörper und mit α -Maus IgG Alexa Fluor 555 angefärbt (Pfeile). Hoechst 33258 wurde zur Färbung der Zellkerne benutzt. Gezeigt sind Überlagerungen der entsprechenden Bilder. Meßbalken = 20 μ m. **b)** SMN-positive Kernkörper wurden in Wildtyp-Mäusen (n = 7 Tiere, n = 229 Zellen) und transgenen FGF-2-Mäusen (n = 8 Tiere, n = 273 Zellen) ausgezählt. Die Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Kernkörper ist dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **, p < 0.01 (Chi-Quadrat-Test). Meßbalken = 20 μ m.

3.6 FGF-2²³ bindet bevorzugt im Zellkern an SMN

In welchem Kompartiment der Zelle erfolgt die Bindung der 23 kDa-Isoform von FGF-2 an SMN? Um dies zu beantworten, wurden HEK293T-Zellen transient mit dem Plasmid pFGF-2²³-3xFLAG und dem Plasmid pEGFP-SMN transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen oder Zellen, die mit dem jeweiligen Fusionskonstrukt und dem entsprechen Kontrollplasmid transfiziert wurden. Aus den Zellen wurde jeweils der cytoplasmatische Extrakt und der Kernextrakt gewonnen und Co-Immunpräzipitationen mit einem α -SMN Antikörper durchgeführt, um an SMN gebundenes FGF-2²³ zu präzipitieren. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine sowie die Ladekontrollen mit dem Western Blot-Verfahren analysiert. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 8 gezeigt. An SMN gebundenes FGF-2²³ wurde mit einem α -FLAG M2 Antikörper nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob jeweils die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Blots mit einem α -SMN Antikörper inkubiert. Als weitere Kontrolle wurden sowohl die Blots der cytoplasmatischen Extrakte als auch die der Kernextrakte mit einem α -Histon H3 Antikörper inkubiert. Damit ließ sich die erfolgreiche Isolation von Kernproteinen zu überprüfen. Wie in Abbildung 8 in den Spuren 5 und 8 beziehungsweise 20 und 23 zu sehen, konnte man sowohl im cytoplasmatischen Extrakt als auch im Kernextrakt keine Veränderung des endogenen SMN-Spiegels bei Überexpression von SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP beobachten. Auch eine Überexpression von FGF-2²³-3xFLAG hatte keinen Einfluß auf die Expression des endogenen SMN-Proteins (Spuren 5, 7 und 20, 22). Ebenso verhielt es sich für die gleichzeitige Überexpression der beiden Fusionsproteine FGF-2²³-3xFLAG und SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP (Spuren 6 und 8 beziehungsweise 21 und 23). Dies läßt den Schluß zu, daß die Expression endogenen SMNs durch die Überexpression der Fusionsproteine nicht beeinflusst wurde. Zudem kann man aus diesen Daten folgern, daß eine Überexpression von FGF-2²³ den Transport von SMN in den Kern nicht beeinträchtigte. In welchem Kompartiment der Zelle bindet FGF-2²³ bevorzugt an SMN? Vergleicht man die Intensitäten der Banden in den Spuren 7 und 22, so wird deutlich, daß bei alleiniger Überexpression von FGF-2²³ im cytoplasmatischen Extrakt (Spur 7) kaum FGF-2²³ co-immunpräzipitiert wurde. Im dazugehörigen Kernextrakt (Spur 22) sieht man jedoch eine starke Co-Immunpräzipitation von FGF-2²³. Daraus kann man folgern, daß beide Proteine bevorzugt im Zellkern in einem Komplex vorliegen. Wie in Spur 6 zu sehen, kam es erst bei Überexpression von SMN, hier in Form des Fusionsproteins SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP, im cytoplasmatischen

Ergebnisse

Extrakt zu einer verstärkten Co-Immunpräzipitation der 23 kDa-Isoform von FGF-2 und SMN. Diese war jedoch schwächer als im Kernextrakt derselben Zellen (Spuren 6 und 21). Vergleicht man die Spuren 21 und 22, so unterscheiden sich interessanterweise die Intensitäten der Banden für die 23 kDa-Isoform von FGF-2 im Kernextrakt nicht voneinander. Da bei der Überexpression von SMN mehr SMN-Protein in der Zelle vorhanden war, war zu erwarten gewesen, daß in diesen Zellen mehr FGF-2²³ in einem Komplex mit SMN zu finden war, als in Zellen, die nur endogenes SMN aufwiesen. Wie in den Spuren 21 und 22 zu sehen, war dies ist nicht der Fall. Daraus läßt sich folgern, daß nur eine begrenzte Menge an SMN-Protein, unabhängig vom Expressionsspiegel, in den Zellkern gelangt. FGF-2²³ wurde teilweise proteolytisch zu einem zuvor beschriebenen 16 kDa-Fragment (Malecki et al., 2004) degradiert, das der Kernsequenz aller bekannten FGF-2 Isoformen entspricht (Spuren 2, 3 und 17, 18). Dieses Fragment interagiert nicht mit SMN, wie in den Spuren 6, 7 und 21, 22 zu sehen, da es nicht den für die 23 kDa-Isoform typischen Argininreichen Aminoterminus aufwies.

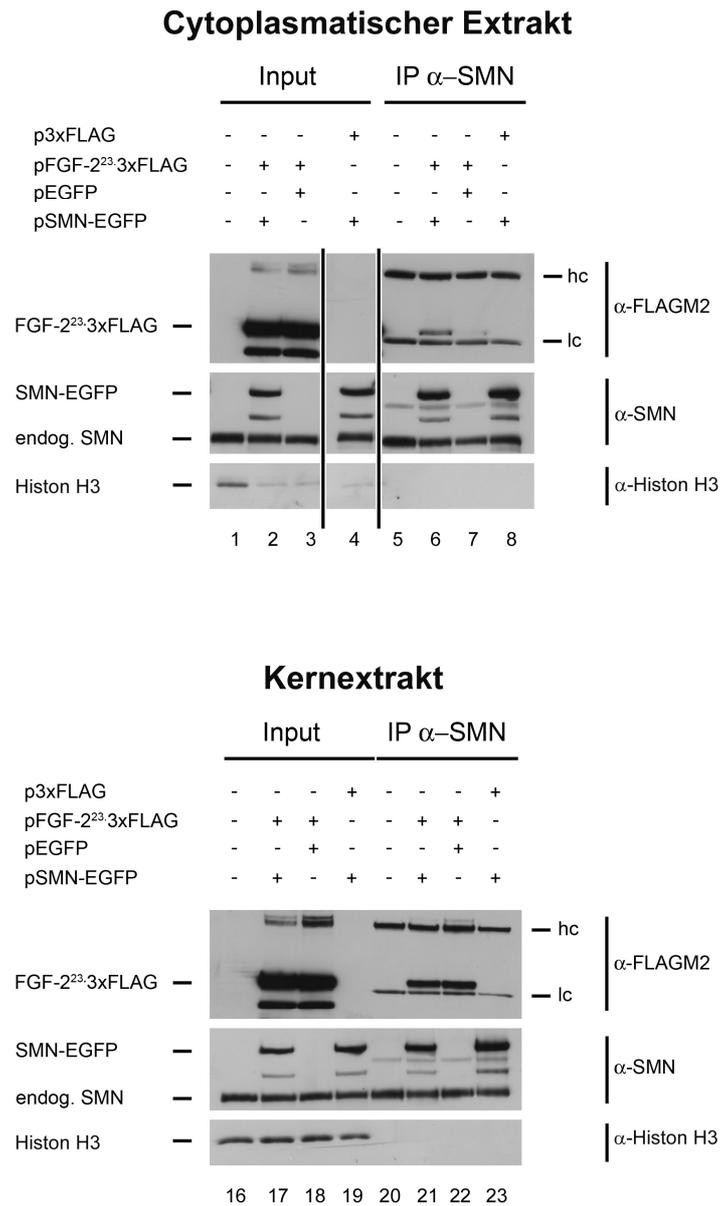


Abbildung 8: FGF-2²³ bindet bevorzugt im Zellkern an SMN. Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Zelle die Bildung des SMN/FGF-2²³-Komplexes stattfindet, wurden HEK293T-Zellen mit pFGF-2²³3XFLAG und pSMN¹⁻²⁹⁴-EGFP co-transfiziert. Der Kern- und cytoplasmatische Extrakt dieser Zellen wurde aufbereitet und eine Co-Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen SMN durchgeführt. Nachfolgend wurden die erhalten Komplexe durch Western Blot analysiert. An das FLAG-Epitop fusioniertes FGF-2²³ wurde mit einem α -FLAG M2-Antikörper, SMN mit einem α -SMN-Antikörper und Histon H3, als Kontrolle für die Reinheit der Extrakte, mit einem α -Histon H3-Antikörper visualisiert. Lag nur endogenes SMN vor, so wurde im Cytoplasma im Vergleich zum Zellkern kaum FGF-2²³ in einem Komplex mit SMN gefunden (Spuren 7 und 22). Dies weist auf eine Bindung zwischen beiden Proteinen hin, die bevorzugt im Zellkern vorkommt. FGF-2²³ wurde teilweise zu einem 16 kDa-Fragment degradiert (Malecki et al., 2004). Dieses interagiert jedoch nicht mit SMN, da diesem Fragment die aminotermine Domäne der 23 kDa-Isoform fehlte (Spuren 2, 3 and 17, 18).

3.7 FGF-2²³ liegt mit PRMT5 in einem gemeinsamen Komplex vor

Ein Charakteristikum der 23 kDa-Isoform von FGF-2 ist das Vorhandensein von RG-Motiven in der aminoterminalen Sequenz. Die Argininreste in diesen RG-Motiven können durch eine Typ I Methyltransferase, der Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1), asymmetrisch methyliert werden (Klein et al., 2000). FGF-2²³ interagiert direkt mit dem survival of motoneuron Protein, das wichtig für die Assemblierung von U snRNPs ist. Ein essentieller Bestandteil dieser U snRNPs sind die Sm-Proteine, die ebenfalls mehrere RG-Motive aufweisen. Ein Teil dieser Proteine wird durch die Typ II Methyltransferase PRMT5, welche hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, symmetrisch dimethyliert. Diese posttranslationale Modifikation erhöht die Spezifität Bindung der Sm-Proteine an SMN (Brahms et al., 2001; Friesen et al., 2001). Da FGF-2²³ zum einen ebenfalls RG-Motive aufweist zum anderen direkt mit SMN interagiert, stellte sich die Frage, ob auch FGF-2²³ ein Substrat von PRMT5 sein könnte. Dazu sollte zunächst festgestellt werden, ob FGF-2²³ und PRMT5 in einem Komplex vorliegen. HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV2-FLAG PRMT5 (Rho et al., 2001), welches für ein PRMT5·3xFLAG-Fusionskonstrukt codierte, und dem Plasmid pDsRed-23 co-transfiziert. Als Kontrollen dienten untransfizierte HEK293T-Zellen sowie Zellen, die mit einem Fusionskonstrukt und dem entsprechenden Kontrollplasmid co-transfiziert wurden. Mit dem Gesamtzelllysaten wurde anschließend Co-Immunpräzipitationen mit einem α -FLAG M2 Antikörper durchgeführt und die präzipitierten Proteine mit dem Western Blot-Verfahren analysiert. Um zu überprüfen, ob jeweils die gleichen Mengen an Protein aufgetragen wurden, wurde der Blot mit einem α -SMN Antikörper inkubiert. Die erfolgreiche Überexpression der Proteine wurde mit der Inkubation des Blots mit den jeweiligen Antikörpern visualisiert. Wie in Abbildung 7 (Spur 8) zu sehen, war der α -FLAG M2 Antikörper in der Lage PRMT5 und FGF-2²³ zu co-präzipitieren. Dies weist darauf hin, daß PRMT5 und FGF-2²³ in einem gemeinsamen Komplex vorliegen, wenn beide Proteine überexprimiert werden. Aufgrund dieser Co-Immunpräzipitationsdaten sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob die RG-Motive von FGF-2²³ durch PRMT5 methyliert werden können.

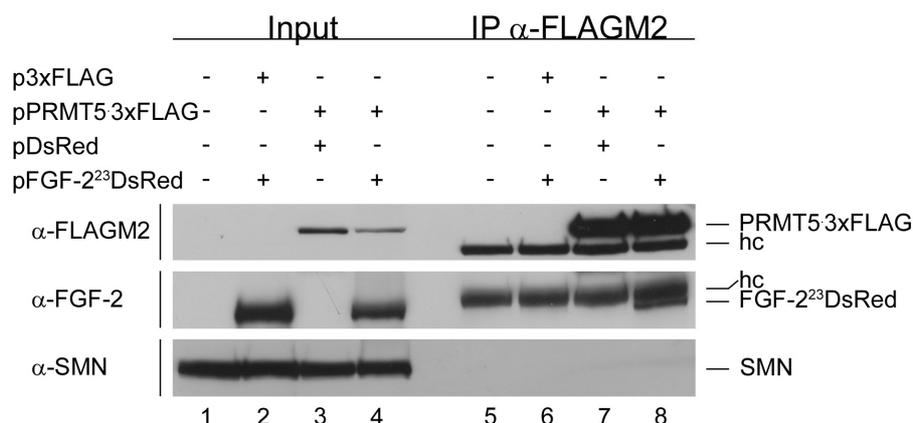


Abbildung 9: FGF-2²³ liegt mit PRMT5 in einem gemeinsamen Komplex vor. HEK293T-Zellen wurden transient mit einem PRMT5-3xFLAG-Fusionskonstrukt und einem FGF-2²³DsRed-Fusionskonstrukt transfiziert. Mit dem Gesamtzellextrakt wurde eine Co-Immünpräzipitation mit einem α -FLAG M2-Antikörper durchgeführt. Durch Western Blot wurden die präzipitierten Proteinkomplexe mit Antikörpern gegen FLAG (α -FLAG M2) FGF-2 (α -FGF-2) und SMN (α -SMN) analysiert. Die Spuren 1-4 zeigen Ladekontrollen. Bei Überexpression von FGF-2²³ und PRMT5 waren beide Proteine in einem gemeinsamen Komplex vorhanden (Spur 8). Die Spuren 5 bis 7 zeigen Negativkontrollen, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Hc, schwere Kette des Antikörpers.

3.8 Die Typ II Proteinmethyltransferase PRMT5 kann FGF-2²³ *in vitro* methylieren

Nachdem gezeigt werden konnte, daß FGF-2²³ mit PRMT5 in einem gemeinsamen Komplex vorlag, stellte sich folgende Frage: Können die RG-Motive der 23 kDa-Isoform durch die Protein-Arginin-Methyltransferase 5 methyliert werden? Dazu wurde ein *in vitro* Methylierungsexperiment durchgeführt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 10 dargestellt. HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV2-FLAG PRMT5 transfiziert, das Protein mit einem α -FLAGM2 Antikörper immunpräzipitiert und auf eine Protein G Sepharosematrix gekoppelt. Die Reinheit des Proteins wurde durch Western Blot und in einem Coomassiegel überprüft (nicht gezeigt). Für eine Negativkontrolle wurden HEK293T-Zellen mit dem Plasmid pCMV2-FLAG PRMT5(R368A) (Rho et al., 2001), welches für eine inaktive Mutante des Proteins codierte, transfiziert und das Protein dem Wildtypprotein entsprechend aufgereinigt. Für eine Positivkontrolle wurden HEK293T-Zellen mit dem Plasmid pCMV2-FLAG PRMT1 (Rho et al., 2001) welches für ein PRMT1-3xFLAG-Fusionsprotein co-

Ergebnisse

dierte, transfiziert und das Protein ebenfalls wie das PRMT5·3xFLAG-Fusionsprotein aufgereinigt. Die so isolierten Proteine wurden mit rekombinantem FGF-2²³ und radioaktiv markiertem [carboxy ¹⁴C] S-Adenosylmethionin in PRMT-Assaypuffer inkubiert. Als Positivkontrolle für die Methylierung durch PRMT5 diente das myelin basic protein (MBP), da es durch PRMT5 methyliert werden kann (Baldwin und Carnegie, 1971a; Baldwin und Carnegie, 1971b; Lim et al., 2005). Der Überstand der Reaktion wurde auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und dieses auf einem Röntgenfilm exponiert. Wie in Abbildung 10, Spur 1, zu sehen, ließ sich im Falle der Inkubation von FGF-2²³ und PRMT5 ein radioaktives Signal auf dem Röntgenfilm detektieren. Ein radioaktives Signal war auch in der Positivkontrolle (Spur 2) zu finden. Dies zeigt eine *in vitro* Methylierung von FGF-2²³ durch PRMT5. Die inaktive Mutante PRMT5(R368A) war weder in der Lage MBP (Spur 4), noch die 23 kDa-Isoform von FGF-2 (Spur 3) zu methylieren, was auf eine spezifische Methylierung durch PRMT5 hinweist. Die Positivkontrolle mit PRMT1 (Spur 5) zeigte wie erwartet eine *in vitro* Methylierung von FGF-2²³. MBP konnte hingegen nicht durch PRMT1 methyliert werden (Spur 6).

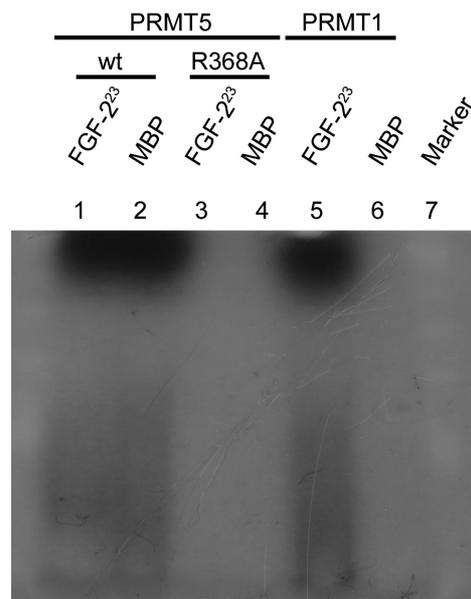


Abbildung 10: Die Typ II Proteinmethyltransferase PRMT5 kann FGF-2²³ *in vitro* methylieren. Rekombinantes FGF-2²³ wurde mit PRMT5 beziehungsweise dessen inaktiver Mutante PRMT5 (R368A) und radioaktiv markiertem [carboxy ¹⁴C] S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor inkubiert (Spuren 1 und 3). Als Positivkontrolle für die Methylierung durch PRMT5 diente MBP (Spuren 2 und 4). Die Inkubation von FGF-2²³ mit PRMT1 diente als Positivkontrolle (Spur 5), im Falle von MBP als Negativkontrolle (Spur 6). Spur 7 zeigt einen Proteinmarker, der für die Kontrolle des Gellaufs verwendet wurde. Die Proteine wurden nachfolgend auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und dieses auf einem Röntgenfilm exponiert. Wie anhand der radioaktiven Signale in den Spuren 5 und 7 zu sehen, konnte FGF-2²³ sowohl von PRMT5 als auch von PRMT1 *in vitro* methyliert werden.

3.9 Inhibition der FGF-2-Methylierung beeinflusst die zelluläre Lokalisation von FGF-2

Wie wirkt sich die Methylierung der RG-Motive auf die Lokalisation von FGF-2 aus? Um diese Frage zu beantworten, wurden HEK293T-Zellen für 24 Stunden mit dem Methylierungshemmer Adenosindialdehyd (AdOx) behandelt, anschließend fixiert und eine Immunocytochemie mit einem α -FGF-2 Antikörper und einem Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper durchgeführt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 11 dargestellt. Adenosindialdehyd inhibiert die S-Adenosyl-L-Homocysteinhydrolase, was in der Akkumulation von S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHyc), einem Produktinhibitor der Methyltransferasen, resultiert. Methyltransferasen benutzen S-Adenosyl-L-Methionin als Methylgruppendonor (Johnson et al., 1993; Pilz et al., 1987). Durch diesen Mechanismus verbleiben die methylgruppen-

Ergebnisse

akzeptierenden Polypeptide in einem hypomethylierten Status. Wie in Abbildung 11 zu sehen, war FGF-2 in den Kontrollzellen gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt. Nach Behandlung der Zellen war ein Großteil von FGF-2 um die Peripherie des Zellkerns lokalisiert. Nur ein geringer Anteil befand sich im Zellkern. Dies entspricht Daten von (Pintucci et al., 1996). Dabei handelte es sich vermutlich entweder um die 18 kDa-Isoform oder um HMW-FGF-2, das vor der AdOX-Zugabe methyliert wurde. Dieses Ergebnis zeigt den Einfluß einer postrationalen Modifikation, in diesem Fall die Methylierung von Arginin-Glycin-reichen Motiven, auf die Lokalisation des Fibroblastenwachstumsfaktors-2.

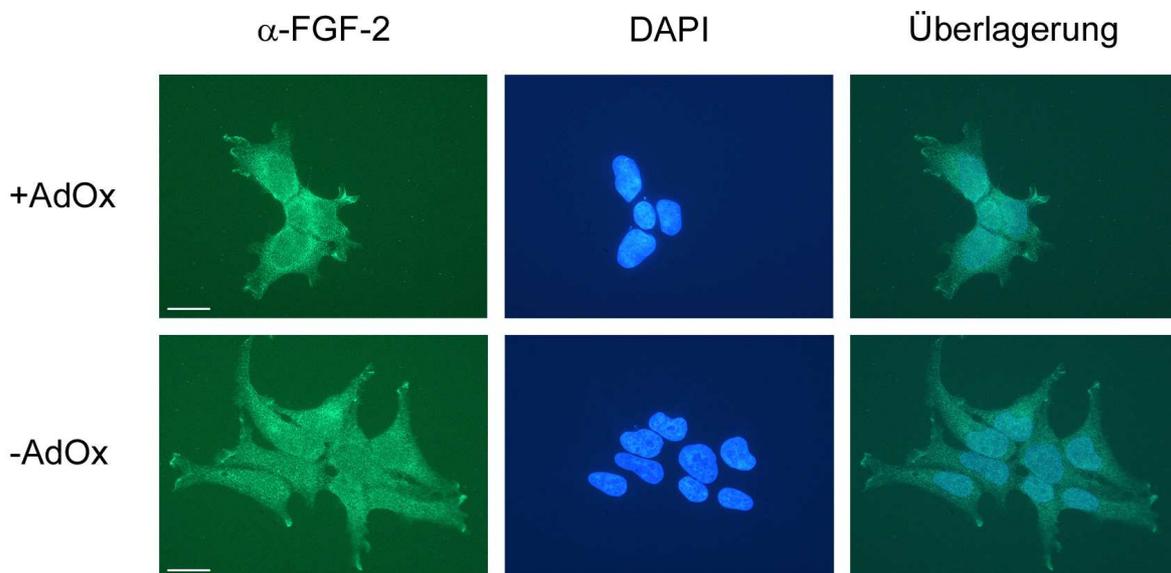


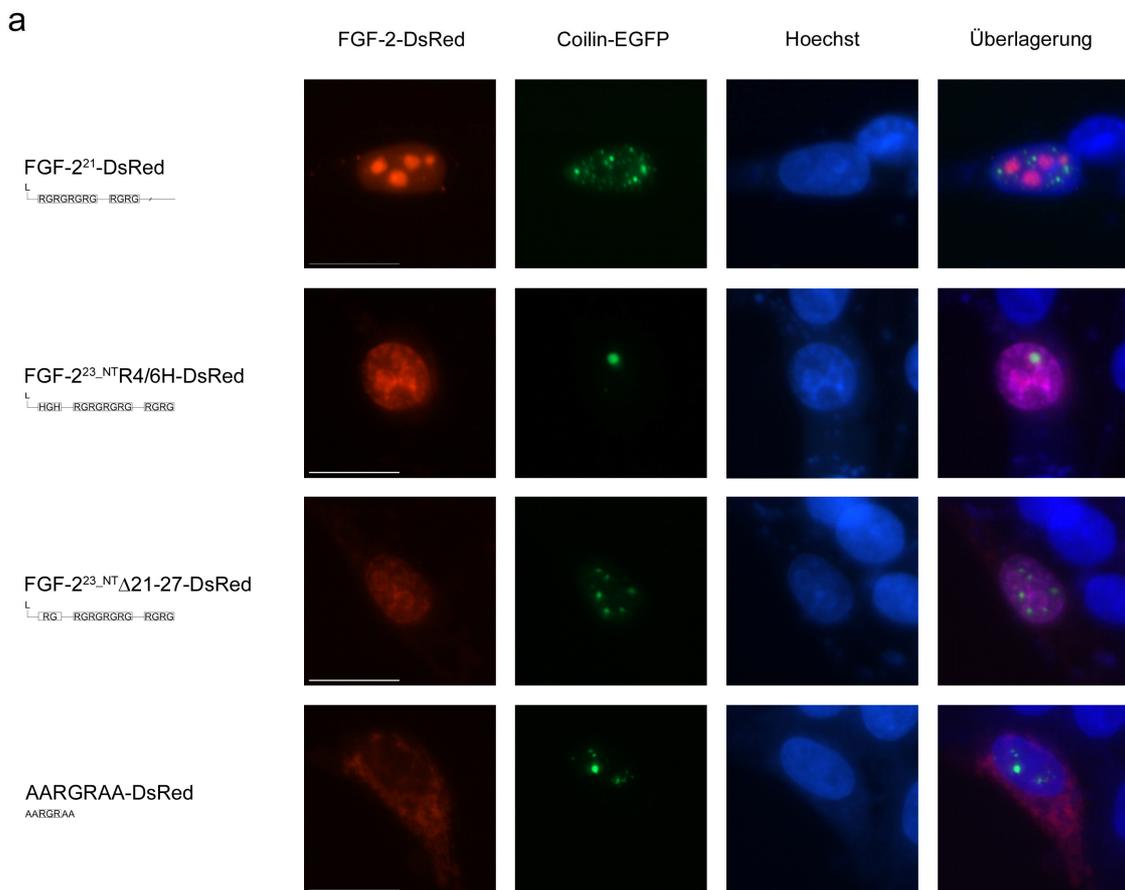
Abbildung 11: Inhibition der FGF-2-Methylierung beeinflusst dessen zelluläre Lokalisation. HEK293T-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen wurden für 24 Stunden mit AdOX (Adenosindialdehyd) behandelt und anschließend mit 4% PFA/PBS fixiert. Die immunocytochemische Analyse mit einem Antikörper gegen FGF-2 zeigte die Verteilung von FGF-2. Als sekundärer Antikörper diente ein α -rabbit IgG-Cy2-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. FGF-2 war in den mit AdOX behandelten Zellen (+AdOx) hauptsächlich cytoplasmatisch und perinukleär verteilt. In den Kontrollzellen (-AdOx) war eine gleichmäßige Verteilung von FGF-2 zu sehen. Meßbalken = 20 μ m.

3.10 Die intranukleäre Lokalisation von FGF-2 ist abhängig von der Anzahl der RG-motive im Aminoterminus der hochmolekularen Isoformen

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 besitzt eine zweigeteilte Kernlokalisationssequenz, die im Carboxyterminus der allen Isoformen gemeinsamen Kernsequenz liegt. Die aminoterminal Extension mit ihren RG-Motiven, die die 21 kDa- und die 23 kDa-Isoformen auszeichnen, wird sowohl als Kernlokalisationssequenz als auch als Kernretentionssequenz beschrieben. Die zweigeteilte Kernlokalisationssequenz ist gut untersucht. Über die Abhängigkeit der Lokalisation der hochmolekularen Isoformen von der aminoterminalen Extension ist wenig bekannt. Wie lokalisieren die einzelnen Isoformen von FGF-2 im Zellkern? FGF-2¹⁸ lokalisiert im Zellkern in den Nukleoli und co-lokalisiert bei Überexpression teilweise mit Cajal-Körpern. FGF-2²³ welches drei in Cluster aufgeteilte RG-Motive besitzt, ist chromatinassoziiert und co-lokalisiert bei Überexpression teilweise mit SMN-positiven Kernkörpern (Claus et al., 2003). Das Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudie ist in Abbildung 12 dargestellt. Über die subzelluläre Lokalisation der 21 kDa-Isoform war bislang nichts bekannt. Wie in Abbildung 12a zu sehen, lokalisiert sie ebenfalls in den Nukleoli, jedoch nicht in Cajal-Körpern. Die 21 kDa-Isoform zeigt erstaunlicherweise eine ähnliche Lokalisation im Zellkern, wie die 18 kDa-Isoform. Ein DsRed-Fusionskonstrukt, das die aminoterminalen Kernlokalisationssequenz von FGF-2²³ repräsentiert, lokalisiert ähnlich wie ein DsRed-Fusionskonstrukt der 23 kDa-Isoform von FGF-2 (Claus et al., 2003). Da die Anwesenheit aller RG-Motive für die Assoziation an Chromatin und das punktierte Muster ausreicht, sollten Mutationen dieser Sequenz die Frage beantworten, welche Bereiche dieser Sequenz wichtig für die intranukleäre Lokalisation der hochmolekularen Isoformen von FGF-2 sind. Deswegen wurden Mutationen der aminoterminalen Kernlokalisationssequenz erstellt, mit DsRed2 fusioniert und die Lokalisation dieser DsRed-Fusionskonstrukte analysiert. Bei der Mutante FGF-2^{23-NT}R4/6H-DsRed wurden die Argininreste des ersten RG-Motivs durch Histidin ersetzt. Histidin ist wie Arginin eine positiv geladene Aminosäure. Histidin kann monomethyliert werden, was zum Beispiel für Histidin in einem HG-Motiv des Aktin zutrifft (Asatoor und Armstrong, 1967). Trotz dieser Veränderung erfolgt weiterhin eine Chromatinassoziation dieses Fusionskonstruktes (Abb. 12a). Bei der Mutante FGF-2^{23-NT}Δ21-27-DsRed wurde der hydrophobe Bereich zwischen dem zentralen

Ergebnisse

und dem davon carboxyterminal liegenden RG-Motiven entfernt. Dieser besteht aus sieben Aminosäureresten, zumeist Alaninresten. Auch diese Mutation war an Chromatin assoziiert. Daraus läßt sich schließen, daß weder das erste RG-Motiv, noch der hydrophobe Bereich zwischen dem Cluster aus RG-Motiven und dem davon carboxyterminal liegenden einen Einfluß auf die Assoziation an Chromatin besitzt. Was geschieht, wenn das zentrale RG-Motiv deletiert wird, die Kernsequenz jedoch erhalten bleibt? Erstaunlicherweise lokalisierte FGF-2²³Δ8-23-EGFP, wie auch FGF-2¹⁸-EGFP, in den Nukleoli (Abb. 12b). Auch die Mutante FGF-2²³Δ17-28-EGFP lokalisiert in den Nukleoli (Abb. 12b). Bei dieser Mutante war das zentrale und das davon carboxyterminal liegende RG-Motiv fusioniert. Dabei wurde der letzte Argininrest des zentralen RG-Motivs deletiert, wodurch das zentrale RG-Motiv unvollständig ist. Aus den Ergebnissen dieser Lokalisationsstudie kann man klar auf einen Einfluß der RG-Motive auf die Lokalisation der hochmolekularen Isoformen schließen.



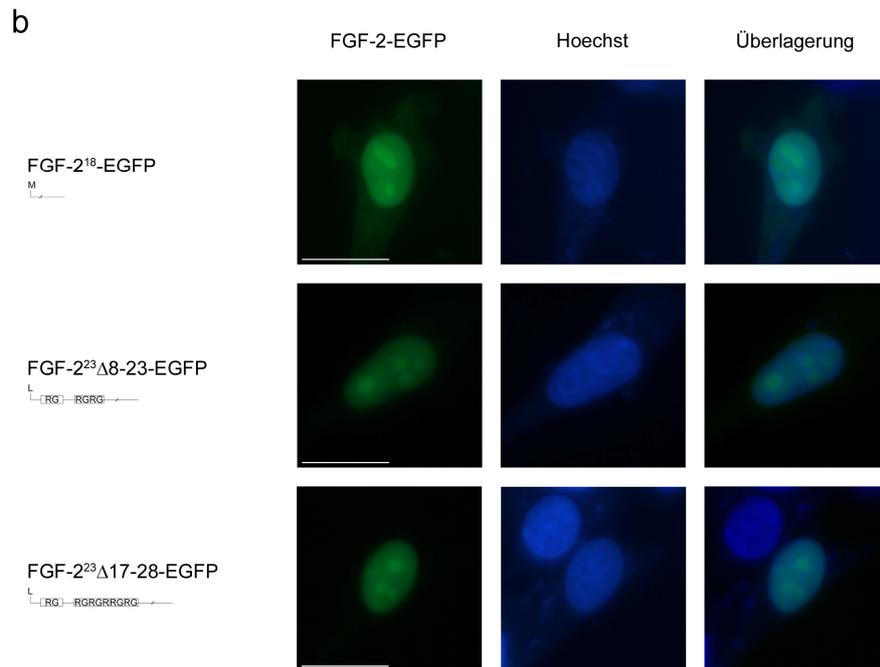


Abbildung 12: Die intranukleäre Lokalisation von FGF-2 ist abhängig von der Anzahl der RG-motive in der aminoterminalen Extension der hochmolekularen Isoformen. a) Immortalisierte Schwann-Zellen der Ratte wurden mit verschiedenen FGF-2-DsRed-Fusionskonstrukten transfiziert, und die Lokalisation der Fusionsproteine wurde analysiert. Die 21 kDa-Isoform von FGF-2 lokalisierte in Nukleoli, aber co-lokalisierte im Gegensatz zu der 18 kDa-Isoform bei Überexpression nicht mit Coilin in Cajal Körpern (Claus et al., 2003). Die Mutanten FGF-2²³_{NT}R4/6H-DsRed und FGF-2²³_{NT}Δ21-27-DsRed waren wie der Aminoterminus der 23 kDa-Isoform (Claus et al., 2003) chromatinassoziiert. Ein einzelnes RG-Motiv reichte nicht aus, um DsRed in den Zellkern zu transportieren, wie bei dem Fusionskonstrukt AARGRAA-DsRed zu sehen war. Die Mutanten FGF-2²³Δ8-23-EGFP und FGF-2²³Δ17-28-EGFP, bei denen der zentrale RG-Cluster verkürzt beziehungsweise deletiert war, lokalisierten wie auch FGF-2¹⁸-EGFP in den Nukleoli. Der Maßbalken repräsentiert 20 µm.

4. Diskussion

Die 23 kDa-Isoform des Fibroblastenwachstumsfaktors-2 co-lokalisiert mit dem survival of motoneuron Protein bei Überexpression beider Proteine in SMN-positiven Kernkörpern und liegt mit dem SMN-Protein nach Co-Immunpräzipitation in einem gemeinsamen Komplex vor (Claus et al., 2003). In dem ersten Teil der Arbeit sollte der FGF-2²³ / SMN-Komplex genauer charakterisiert werden. Auch Auswirkungen der Interaktion beider Proteine auf zellulärer Ebene sollte überprüft werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Lokalisation von FGF-2²³ in Abhängigkeit der RG-Motive untersucht werden, die charakteristisch für die hochmolekularen Isoformen des Fibroblastenwachstumsfaktors-2 sind.

4.1 Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 interagiert direkt mit dem survival of motoneuron Protein

In diesem Teil der Arbeit sollte zunächst die Art der Interaktion zwischen FGF-2²³ und SMN untersucht werden. Es stellte sich zunächst die Frage, ob beide Proteine direkt miteinander interagieren oder ob sie über andere Proteine als Brückenmolekül miteinander verbunden in einem Komplex vorliegen. Eine Interaktion von FGF-2²³ und SMN mit RNA als Brückenmolekül konnte ausgeschlossen werden (Claus et al., 2004). Zudem konnte in einem far-Western Blot-Experiment gezeigt werden, daß rekombinantes humanes SMN nur an die 23 kDa-Isoform von murinem FGF-2 bindet, nicht aber an die 18 kDa- oder 21 kDa-Isoform. Dies zeigt einen Einfluß des Amino-terminus' von FGF-2²³ auf die Bindung von SMN (Claus et al., 2004). Um zu überprüfen, ob eine direkte Interaktion zwischen FGF-2²³ und SMN stattfindet, wurde eine *in vitro* Bindungsstudie mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. In dieser konnte, wie in Abbildung 3 dargestellt, gezeigt werden, daß FGF-2²³ direkt an SMN binden kann. Dieses Ergebnis wurde mit einem Experiment bestätigt, in dem Lysat aus Schwann-Zellen der Ratte, die murines FGF-2²³-DsRed überexprimierten, verwendet wurde. In Säugerzellen exprimierte Proteine werden im Gegensatz zu in Bakterien exprimierten Proteinen korrekt posttranslational modifiziert. Das bedeutet im Falle von FGF-2²³, daß die Methylierung der Argininreste in den RG-Motiven, die sich im Aminoterminus finden lassen, stattfindet (Klein et al., 2000; diese Arbeit). Rekombinantes, in Bakterien exprimiertes FGF-2²³ konnte jedoch wie in Abbildung 3 zu sehen ohne diese typi-

sche posttranslationale Modifikation direkt an SMN binden. Dies zeigt, daß *in vitro* eine Methylierung der RG-Motive von FGF-2²³ keine absolute Voraussetzung für die Interaktion mit SMN ist. Jedoch könnte die Spezifität der Bindung von FGF-2²³ an SMN, wie im Falle der Sm-Proteine (Brahms et al., 2001), erhöht werden.

4.1.1 FGF-2²³ liegt in einem gemeinsamen Komplex mit PRMT5 vor und kann durch diese TypII Methyltransferase *in vitro* methyliert werden

Das survival of motoneuron Protein bindet mit hoher Spezifität an Proteine, die symmetrisch dimethyliert werden. Beispiele dafür sind die Sm-Proteine B/B', D1 und D3 (Brahms et al., 2001; Brahms et al., 2000; Friesen und Dreyfuss, 2000; Salgado-Garrido et al., 1999; Selenko et al., 2001) sowie Coilin (Hebert et al., 2002; Hebert et al., 2001). Auch Fibrillarin, welches wie FGF-2²³ durch PRMT1 asymmetrisch methyliert wird (Lin et al., 2002), wird von SMN gebunden (Jones et al., 2001; Pellizzoni et al., 2001). Sowohl die symmetrische Dimethylierung durch Typ II Methyltransferasen wie PRMT5 als auch die asymmetrische Dimethylierung durch Typ I Methyltransferasen wie PRMT1, erfolgt an Argininreste, die sich in einem RG-Motiv befinden (Baldwin und Carnegie, 1971a; Baldwin und Carnegie, 1971b). FGF-2²³, das direkt mit SMN interagiert, weist solche RG-Motive im Aminoterminus des Proteins auf. Diese sind ein Substrat von PRMT1. Vorläufige Ergebnisse weisen zudem darauf hin, daß die dimethylierten Argininreste zumeist asymmetrisch dimethyliert sind, was zusätzlich für eine Methylierung durch PRMT1 spricht (Klein et al., 2000). Da FGF-2²³ jedoch direkt an das SMN-Protein binden kann, stellte sich die Frage, ob FGF-2²³ - wie die Sm-Proteine auch - von PRMT5 methyliert werden kann. Um diese Frage zu klären, sollte zunächst überprüft werden, ob FGF-2²³ mit PRMT5 in einem gemeinsamen Komplex vorliegt. PRMT5 lokalisiert in einem 20S Komplex mit pICln im Cytoplasma (Meister et al., 2001). Wie in Abbildung 9 (Spur 8) gezeigt, lag FGF-2²³ bei gleichzeitiger Überexpression beider Proteine in einem gemeinsamen Komplex mit PRMT5 vor. Ein *in vitro* Methylierungsversuch sollte Aufschluß darüber geben, ob FGF-2²³ ein Substrat von PRMT5 ist. Wie in Abbildung 10 (Spur 1) zu sehen, ist FGF-2²³ in der Tat *in vitro* ein Substrat dieser Typ II-Methyltransferase. Die in diesem Experiment gefundene Methylierung beruhte auf einer spezifischen Reaktion von PRMT5, da die hier verwendete katalytisch inaktive Mutante PRMT5(R368A)

(Rho et al., 2001) nicht imstande war, die 23 kDa-Isoform von FGF-2 zu methylieren (Abb. 10, Spur 3). Die Positivkontrolle mit PRMT1 zeigt, daß das eingesetzte rekombinante FGF-2-Protein methyliert werden konnte (Abb.10, Spur 5). Aufgrund der Lokalisation von PRMT5 und dem Vorliegen beider Proteine in einem Komplex liegt es nahe, daß FGF-2²³ im Cytoplasma methyliert wird. Eine Bindung an SMN erfolgt vermutlich erst nach oder bei dem Import in den Zellkern. Wie die Daten aus dem *in vitro* Bindungsversuch (Abb. 3) zeigen, ist eine Methylierung der RG-Motive jedoch für die direkte Interaktion beider Proteine *in vitro* nicht nötig. Die Methylierung als posttranslationale Modifikation könnte, wie auch im Fall der Sm-Proteine, eine erhöhte Spezifität der Bindung von FGF-2²³ an SMN bewirken.

4.1.2 FGF-2²³ kompetiert nicht mit U2 snRNA jedoch mit dem Protein Gemin2 um die Bindung an SMN

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Bindungsstudie konnte die Bindungsdomäne des SMN-Proteins für FGF-2²³ bestimmt werden. Diese liegt im aminoterminalen Bereich des SMN-Proteins und wird durch die Aminosäurereste 1-90 bestimmt. Die Aminosäurereste 1-27 haben anscheinend einen modulierenden Einfluß auf die Bindung von FGF-2²³, denn Mutanten des SMN-Proteins, denen diese Aminosäurereste fehlten, banden FGF-2²³ weitaus schwächer. Der Grund liegt vermutlich an der nicht vollständig vorhandenen Bindungsdomäne für FGF-2²³.

Die Region in der FGF-2²³ an SMN bindet, überlappt mit einer Domäne, die *in vitro* Nukleinsäuren binden kann. Diese wird durch die Aminosäurereste 29-51 des SMN-Proteins bestimmt. Dieses konservierte Element bindet homopolymere poly(G) RNA-Sequenzen. Die Aktivität der Nukleinsäurebindung kann durch die von Exon 3 und Exon 4 codierten Sequenzen moduliert werden (Bertrand et al., 1999; Lorson und Androphy, 1998). Der SMN-Komplex ist an der Assemblierung von U snRNPs, die aus Sm-Proteinen und U snRNAs bestehen, beteiligt (Yong et al., 2004b). Die RG-Motive der 23 kDa Isoform ähneln dem RGG-Motiv des hnRNPA1-Proteins, das RNA-Bindekapazität hat (Siomi und Dreyfuss, 1995) und dem des Kernproteins Nukleolin (Schmidt-Zachmann und Nigg, 1993). Deswegen war es für die weitere Charakterisierung des FGF-2²³ / SMN-Komplexes wichtig, die Frage zu beantworten, ob FGF-2²³ direkt an U snRNAs binden kann und ob eine mögliche Konkurrenz zwischen der Bindung dieses RNA-Typs und FGF-2²³ um die Bindung an SMN stattfindet. FGF-2²³ ist mit U2 snRNA und U4 snRNA in einem gemeinsamen Komplex zu

finden (Claus et al., 2004). Aus diesem Grund wurde U2 snRNA benutzt, um die Bindekapazitäten der beiden Proteine zu untersuchen. FGF-2²³ ist trotz der RG-Motive, die eine RNA-Bindekapazität vermuten ließen, nicht in der Lage direkt U2 snRNA zu binden (Abb. 4, Spur 7). Dies entspricht unpublizierten Daten von Dono und Zeller (Dono et al., 1998). Wie in Abbildung 4 (Spuren 2 bis 5) zu sehen, konnte keine Konkurrenz mit U2 snRNA um die Bindung an SMN beobachtet werden, obwohl beide Bindungsdomänen überlappen. Der Grund dafür könnte die oligomere Konformation des SMN-Proteins sein. Die erste Oligomerisierungsdomäne befindet sich im Bereich der Aminosäurereste 52-91 (Young et al., 2000), die zweite wird durch eine YG-Box bestimmt, die durch das Exon 6 codiert wird (Lorson et al., 1998). Diese Oligomerkonformation läßt sich vermutlich auch in SMN finden, das *in vitro* exprimiert wurde. Liegt SMN in dieser Konformation vor, so wäre eine Bindung von U2 snRNA und FGF-2²³ an verschiedene Positionen dieses Oligomers möglich, so daß keine Konkurrenzsituation trotz der gleichen Bindedomäne entsteht. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer erhöhten Stabilität der Interaktion von SMN und U2 snRNA im Vergleich zu der Bindung von SMN und FGF-2²³. Wie in Abbildung 4 (Spur 1) zu sehen, ist das SMN-Protein selbst in der Lage direkt an U2 snRNA zu binden. Bisher beschrieben wurde nur eine Bindung des SMN-Komplexes an U snRNA, wobei das Protein Gemin5 innerhalb des SMN-Komplexes die spezifische Interaktion mit den U snRNAs vermittelt (Battle et al., 2006). Die U1 snRNA bindet an den SMN-Komplex durch eine sogenannte U1 SL1-Sequenz (Yong et al., 2002). Die U2, U4 und U5 snRNA binden durch SL-Sequenzen an ihrem jeweiligen 3`-Ende an den SMN-Komplex, die zudem die Bindestelle für Sm-Proteine enthalten (Yong et al., 2004a). Eine direkte Interaktion der U2 snRNA mit dem SMN-Protein wurde zum ersten Mal in dieser Arbeit nachgewiesen.

Die Interaktionssequenz von FGF-2²³ überlappt auch mit der von Gemin2, einer Kernkomponente des SMN-Komplexes (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997; Paushkin et al., 2002). Gemin2 wird durch die Bindung an SMN vermutlich stabilisiert (Wang und Dreyfuss, 2001). Die Interaktionssequenz wird durch die Aminosäurereste 13-44 oder 52-91 (Wang und Dreyfuss, 2001; Young et al., 2000b) bestimmt. In dem in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experiment ließ sich eine Konkurrenz zwischen den Proteinen Gemin2 und FGF-2²³ feststellen (Abb. 5, Spuren 10 und 11). Das molare Verhältnis von FGF-2²³ zu Gemin2 betrug bei Eintreten der Konkurrenz 2 zu 1. FGF-2 liegt in seiner aktiven Form als Dimer vor (Davis et al., 1999). Aus die-

sen Daten läßt sich schließen, daß Gemin2 von FGF-2²³ aus dem SMN-Komplex verdrängt wird. Das trotz der möglichen Oligomerkonformation des SMN-Proteins *in vitro* eine Kompetition der Proteine Gemin2 und FGF-2²³ zu erkennen ist, läßt darauf schließen, daß die Bindung von FGF-2²³ an SMN stabiler ist, als die Bindung von Gemin2 an SMN.

4.1.3 FGF-2²³ bindet bevorzugt im Zellkern an SMN

Um weitere Konsequenzen der FGF-2²³ / Gemin2 Kompetition beurteilen zu können, sollte zunächst untersucht werden, in welchem Kompartiment der Zelle FGF-2²³ an SMN bindet. In *in vitro* Versuchen mit SMN-Deletionsmutanten zeigte sich, daß eine Deletion der Gemin2-Bindedomäne die Assoziation der Sm-Proteine mit SMN beeinträchtigt (Wang und Dreyfuss, 2001). *In vivo* führt ein reduzierter Gemin2-Spiegel zur Beeinträchtigung der U snRNP-Assemblierung und zur Degeneration von Motoneuronen (Jablonka et al., 2002). Der SMN-Komplex ist während der gesamten Biogenese der U snRNPs mit diesen verbunden und trennt sich erst beim oder kurz nach dem Import in den Zellkern von diesen ab (Massenet et al., 2002). Die Verdrängung von Gemin2 durch FGF-2²³ aus dem SMN-Komplex könnte also die Biogenese der U snRNPs beeinträchtigen. Weiterhin könnte Gemin2 nach der Verdrängung aufgrund der fehlenden Stabilisierung durch SMN degradiert werden. FGF-2²³ und SMN lagen bei endogenem SMN-Spiegel vornehmlich im Zellkern in einem Komplex vor, wobei nur ein gewisser Anteil des SMN-Proteins mit FGF-2²³ interagiert (Abbildung 8, Spur 22). Dies bestätigt die vorhandenen Co-Lokalisationsdaten (Claus et al., 2003). Erst bei Überexpression von SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP und FGF-2²³-3xFLAG ließen sich im cytoplasmatischen Extrakt beide Proteine in einem gemeinsamen Komplex finden (Abb. 8, Spur 6). Diese Daten lassen darauf schließen, daß es erst im Zellkern zu einer Bindung zwischen beiden Proteine kommt. Die U snRNP-Biogenese, die im Cytoplasma stattfindet, sollte nicht gestört sein, da FGF-2²³ erst an SMN bindet, nachdem die Assemblierung der U snRNPs erfolgt ist.

4.1.4 FGF-2²³ übt einen Einfluß auf die Stabilität SMN-positiver Kernkörper aus

Wie wirkt sich die beschriebene Konkurrenz von Gemin2 und FGF-2²³ auf die vom SMN-Komplex gebildeten subnukleären Strukturen aus? Von vielen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel FGF-1 (Zhan et al., 1992), FGF-3 (Kiefer et al., 1994) und EGF (Moroianu und Riordan, 1994; Raper et al., 1987), ist bekannt, daß sie in den Zellkern translozieren. Die Funktion dieser Wachstumsfaktoren im Zellkern oder die Auswirkung auf nukleäre Strukturen ist jedoch kaum untersucht. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluß eines Wachstumsfaktors auf die Stabilität von Kernkörpern gezeigt. Um den Einfluß der FGF-2²³ / Gemin2 Konkurrenz besser beurteilen zu können, wurden in dieser Studie HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pDsRed-23 und pEGFP-SMN co-transfiziert und die Anzahl der SMN positiven Kernkörper ausgezählt. Das Plasmid pDsRed-23 codierte für ein FGF-2²³-DsRed-Fusionsprotein, das Plasmid pEGFP-SMN für ein SMN-EGFP-Fusionsprotein. In HEK293T-Zellen kommt es wie auch in COS-7-Zellen bei Überexpression von SMN zu einem Anstieg in der Anzahl der SMN-positiven Kernkörper (Young et al., 2000a). Ein hoher Anteil an SMN im Cytoplasma reicht für die Bildung von Gems jedoch nicht aus (Young et al., 2000a). Bei gleichzeitiger Überexpression von FGF-2²³-DsRed und SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP nahm die durchschnittliche Anzahl der SMN-positiven Kernkörper ab (Abb. 6b). Bei einer Überexpression von SMN¹⁻²⁹⁴-EGFP und FGF-2¹⁸-DsRed kam es zu keiner Abnahme der durchschnittlichen Anzahl der SMN-positiven Kernkörper (Abb. 6b). Bestätigt wurde der Einfluß von Gemin2 auf die Integrität der SMN-positiven Kernkörper durch das Verwenden einer SMN-Mutante, der die Aminosäurereste 1-27 fehlen. Bei dieser Mutante ist die Bindedomäne von Gemin2 teilweise deletiert, so daß eine Bindung von Gemin2 nicht oder nur instabil erfolgen sollte. Bei Überexpression dieser Mutante in HeLa PV-Zellen kann man bezüglich der Anzahl an Gems keinen Unterschied zu der Anzahl der Gems in Kontrollzellen finden (Pellizzoni et al., 1998). In dieser Arbeit wurde bei Überexpression der Mutante SMN²⁷⁻²⁹⁴-EGFP in HEK293T-Zellen ein ähnlicher Wert für die durchschnittliche Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern gefunden, wie bei Überexpression von FGF-2²³-DsRed (Abb. 6b). In HeLa PV-Zellen führt eine Depletion von SMN durch siRNA zu einer gleichzeitigen Depletion von Gemin2 und einer kompletten Destabilisierung der Gems (Feng et al., 2005). Eine Depletion von Gemin2 mit siRNA führt bezüglich der

Gems nicht zu diesen drastischen Effekt (Feng et al., 2005). Der Effekt, den FGF-2²³ auf die SMN-positiven Kernkörper ausübt, ist demnach subtil aber klar erkennbar. Die signifikante Reduktion der durchschnittlichen Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern ließ sich auch in Motoneuronen transgener FGF-2 Mäuse feststellen (Abb. 7b). Diese Mäuse überexprimieren alle Isoformen des humanen FGF-2 (34 kDa, 22,5 kDa, 21 kDa und 18 kDa) in allen untersuchten Geweben (Coffin et al., 1995). Dieses *in vivo* Ergebnis bestätigt die im Zellkulturversuch gewonnenen Daten. Eine Degeneration von Motoneuronen konnte in dieser Studie bei den untersuchten drei Monate alten Tieren nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß die Anzahl und / oder Integrität der SMN-positiven Kernkörper zumindest keinen direkten Einfluß auf die Entwicklung eines SMA-Phänotyps hat. Dies widerspricht auf den ersten Blick den Daten, die aus Patientenzellen gewonnen wurden. In Patientenfibroblasten sind keine SMN-positiven Foci zu sehen, sondern eine diffuse Verteilung des SMN-Proteins im Zellkern. Diese Tatsache spricht für einen Einfluß der SMN-positiven Kernkörper auf die Spinale Muskelatrophie. Jedoch ist zu bedenken, daß bei der SMA eine der Hauptfunktionen des SMN-Proteins, nämlich die Assemblierung der U snRNPs gestört ist. Ob eine Verteilung im Zellkern wichtig für die Ausbildung eines SMA-Phänotyps wichtig ist, ist ebenso unklar, wie die Rolle des SMN-Komplexes im Zellkern.

4.2 Weitere Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von FGF-2

In dem zweiten Teil der Arbeit sollte die intranukleäre Lokalisation von FGF-2 in Abhängigkeit der RG-Motive untersucht werden, die charakteristisch für den Aminoterminus der 21 kDa- und 23 kDa-Isoform sind. Über die intranukleäre Lokalisation von FGF-2 in Abhängigkeit dieser RG-Motive ist nur wenig bekannt. Die aminoterminaler Verlängerung der hochmolekularen Isoformen von FGF-2 ist als Kernlokalisationssequenz beschrieben (Arese et al., 1999; Bugler et al., 1991; Claus et al., 2003; Dono et al., 1998). Andere Gruppen charakterisieren sie hingegen als Kernretentionssignal (Schmidt-Zachmann et al., 1993). Die Lokalisation der einzelnen Isoformen wird kontrovers diskutiert (Bugler et al., 1991; Claus et al., 2003; Dono et al., 1998; Foletti et al., 2003; Quarto et al., 1991; Renko et al., 1990; Sheng et al., 2004). Der Grund für die Diskrepanzen in der Lokalisation der einzelnen Isoformen ist nicht klar. In dieser Studie wurde die Lokalisation von FGF-2²¹ zum ersten Mal beschrieben. In immorta-

lisierten Schwann-Zellen der Ratte ist eine Lokalisation in den Nukleoli zu sehen, jedoch erfolgt keine Co-lokalisierung mit Coilin in Cajal-Körpern (Abb. 12a). Dies weist im Zusammenhang mit den bisherigen Daten (Claus et al., 2003) auf eine Abhängigkeit der intranukleären Lokalisation von RG-Motiven hin. Die aminoterminalen Extension der 23 kDa-Isoform allein reicht aus, um DsRed in den Zellkern zu lokalisieren (Claus et al., 2003). Dieses Fusionskonstrukt ist im Zellkern ebenso wie FGF-2²³ chromatinassoziiert und punktuell verteilt. In dieser Arbeit wurden nun Mutationen der aminoterminalen Kernlokalisationssequenz der 23 kDa-Isoformen von FGF-2 hergestellt, um den Einfluß der RG-Motive auf die nukleäre Lokalisation von FGF-2 genauer zu untersuchen. Die hydrophoben Aminosäurereste zwischen dem zentralen RG-Motiv und dem davon carboxyterminal liegenden scheinen keinen Einfluß auf die Lokalisation im Zellkern zu haben, da diese Mutante ebenso wie ein DsRed-Fusionskonstrukt lokalisiert, das die aminoterminalen Kernlokalisationssequenz enthält. Tauscht man den Argininrest im aminoterminalen RG-Motiv gegen Histidin aus, so bleibt es bei einer Chromatinassoziation und punktueller Verteilung (Abb. 12a). Histidin ist wie Arginin eine basische Aminosäure und kann wie Arginin in einem HG-Motiv methyliert werden. Dies ist bei dem Protein Aktin der Fall (Asatoor und Armstrong, 1967). Histidin liegt in diesem Fall monomethyliert vor, Arginine werden im Regelfall dimethyliert. Die Methylierung von Argininen in RG-Motiven steigert nur unwesentlich deren positive Ladung, jedoch erhöht die Addition von Methylgruppen die sterische Hinderung und entfernt Wasserstoffgruppen der Aminogruppe, die in Wasserstoffbrückenbindungen involviert sein können (McBride und Silver, 2001). Das Beispiel des Proteins Sam68 zeigt einen Einfluß der Methylierung von Argininen auf Protein-Protein-Interaktion. Das RNA-bindende Protein Sam68 dient auch als Adapterprotein in Signaltransduktionskaskaden. Es kann sowohl an Proteine mit einer WW-Domäne als auch an Proteine, die eine SH3 (Src Homologie 3)-Domäne aufweisen, binden. Proteine mit einer WW-Domäne sind durch zwei hochkonservierte Tryptophanreste definiert. Diese binden wie auch SH3-Domänen-Proteine, bevorzugt an Proteine mit prolinreichen Sequenzen. Im methylierten Status bindet es schwächer an Proteine mit einer SH3-Domäne, die Bindung an Proteine mit einer WW-Domäne bleibt unverändert (Bedford et al., 2000). Für verschiedene Proteine wie zum Beispiel Sam68 und hnRNP-A1 ist zudem auch eine Abhängigkeit der Lokalisation vom Status der Methylierung bekannt (Nichols et al., 2000; Smith et al., 2004). Was geschieht, wenn das zentrale RG-Motiv aus der aminoterminalen Kernlokalisations-

Diskussion

tionssequenz entfernt wird, die Kernsequenz von FGF-2 jedoch erhalten bleibt? Wie in Abbildung 12b gezeigt, lokalisiert die Mutante FGF-2²³Δ8-23-EGFP wie ein FGF-2¹⁸-EGFP-Fusionskonstrukt in den Nukleoli. Eine Co-lokalisierung mit Cajal-Körpern konnte nicht festgestellt werden, da zum einen ein Coilin-DsRed-Fusionskonstrukt nicht exprimiert wurde, zum anderen kein geeigneter Coilin-Antikörper vorhanden war. In diesem Fusionskonstrukt ist nur ein dimethyliertes RG-Motiv vorhanden. Bei der Mutante FGF-2²³Δ17-28 wurde das zentrale RG-Motiv mit dem davon carboxyterminal liegenden fusioniert. Auch dieses Fusionskonstrukt beinhaltet die carboxyterminale Kernlokalisationssequenz von FGF-2. Dabei wurde die zentrale RG-reiche Domäne um zwei RG-Motive verkürzt. Auch in diesem Fall lokalisiert das Fusionsprotein wie das als Kontrolle verwendete FGF-2¹⁸-EGFP-Fusionsprotein. In diesem Fall wies das verwendete Fusionsprotein nur drei RG-Motive auf von denen bekannt ist, daß sie dimethyliert werden. Diese Daten weisen klar auf einen Einfluß der RG-Motive beziehungsweise deren posttranslationale Modifikation auf die intranukleäre Lokalisation der hochmolekularen Isoformen des Wachstumsfaktors FGF-2 hin. Vergleicht man die Lokalisation der einzelnen Isoformen von FGF-2 und der Mutanten FGF-2²³Δ8-23-EGFP sowie FGF-2²³Δ17-28-EGFP miteinander, so wird deutlich, daß der Transport in den Zellkern selbst nicht von der Anzahl der RG-Motive abhängt. Dieser wird wahrscheinlich durch die im Carboxyterminus der 18 kDa-Isoform vorliegende Kernlokalisationssequenz vermittelt. Diese nichtkonventionelle zweigeteilte Kernlokalisationssequenz ist durch die Aminosäurereste ¹¹⁶RSRKYTSWYVALKR¹²⁹ charakterisiert (Claus et al., 2003; Sheng et al., 2004). Der erste Teil der Kernlokalisationssequenz ¹¹⁶RSRK¹¹⁹ und der zweite Teil ¹²⁸KR¹²⁹, die durch basische Aminosäurereste charakterisiert sind, werden durch einen Abschnitt getrennt, der mehrheitlich aus hydrophoben Aminosäureresten besteht. In einer konventionellen zweigeteilten Kernlokalisationssequenz (KRX₁₀₋₁₂KRRK) binden die vorliegenden basischen Aminosäurereste an Importin-alpha (Fontes et al., 2003). Das Importin-alpha/beta Heterodimer ermöglicht den Import von Proteinen über Kernporen-Komplexe in den Zellkern (Otis et al., 2006). Dieses ist auch für die 18 kDa-Isoform denkbar, da in einem dreidimensionalen Modell von FGF-2¹⁸ die basischen Cluster der Kernlokalisationssequenz an der Proteinoberfläche zu finden sind. Der Aminoterminus der hochmolekularen Isoformen scheint die Tertiärstruktur der Kernsequenz von FGF-2 nicht zu beeinflussen. Zudem ist die Tertiärstruktur des Aminoterminus nicht bekannt (Moy et al., 1995). Während (Sheng et

al., 2004) die Kernlokalisationssequenz der 18 kDa-Isoform allein als ausreichend für die Lokalisation in den Zellkern beschreiben, postulieren (Foletti et al., 2003), daß dafür ein Zusammenspiel der amino- und carboxyterminalen Bereiche der 18 kDa-Isoform notwendig ist. Die Lokalisation innerhalb des Zellkerns scheint jedoch abhängig von der Anzahl der RG-Motive zu sein. Interessanterweise wird die Kernlokalisierung in einer Mutante der 23 kDa-Isoform, in der die Argininreste des ersten Abschnitts der carboxyterminalen Kernlokalisationssequenz durch Glycinreste ersetzt worden sind (R149G/R151G), in immortalisierten Schwann-Zellen der Ratte komplett verhindert. In HeLa- und COS-7-Zellen hingegen bewirkt diese Mutation nur eine moderate Inhibition der Kernlokalisierung (Sheng et al., 2004). Die Anzahl der dimethylierten Argininreste in den RG-Motiven vermittelt zudem Interaktionen mit jeweils unterschiedlichen Proteinen. Diese spezifischen Interaktionen hätten im Falle der Interaktion von SMN und FGF-2²³ eine spezifische Lokalisation von FGF-2²³ in SMN-positiven Kernkörpern zur Folge (Claus et al., 2003). Ein anderes Beispiel stellt die Assoziation von FGF-2²³ und Chromatin dar (Sun et al., 2001). Die durch die RG-Motive vermittelten Proteininteraktionen ermöglichen vermutlich auch die Retention der Mutante FGF-2^{23-NT}-DsRed im Zellkern. Das sonst gleichmäßig in der Zelle verteilte DsRed-Protein könnte durch den RG-reichen Aminoterminus im Zellkern „gehalten“ werden, indem es über die RG-Motive vermittelte Protein-Protein-Interaktionen eingeht. Dabei spielt vor allem die zentrale RG-reiche Domäne eine Rolle. Aus diesen Daten läßt sich also folgendes Modell für die intranukleäre Lokalisation Isoformen der Fibroblastenwachstumsfaktors-2 postulieren: Der Transport von FGF-2 in den Zellkern ist vornehmlich von der Kernlokalisationssequenz abhängig, die sich im Carboxyterminus des Proteins befindet und durch die Aminosäurereste ¹¹⁶RSRK¹¹⁹ und ¹²⁸KR¹²⁹ definiert wird. Die Kernlokalisationssequenz, die durch den Aminoterminus der hochmolekularen Isoformen definiert wird, ist für die Lokalisation von chimären Proteinen in den Zellkern ausreichend. Wird die carboxyterminale Kernlokalisationssequenz in der 23 kDa-Isoform von FGF-2 mutiert, reicht die Kernlokalisationssequenz im Aminoterminus des Proteins jedoch nicht aus, um FGF-2²³ in den Zellkern zu lokalisieren (Claus et al., 2003). Die Lokalisation innerhalb des Zellkerns wird von mehreren Sequenzen beeinflusst. Lokalisationsstudien mit Mutanten des FGF-2-Proteins haben ergeben, daß für die Lokalisation von FGF-2¹⁸ in die Nukleoli ein Zusammenspiel einer der beiden Kernlokalisationssequenzen mit den ersten 17 Aminosäurereste der 18 kDa-Isoform von Bedeutung ist (Foletti et al., 2003).

Zudem können die Aminosäurereste Lys¹¹⁹, Arg¹²⁹ und Lys¹²⁸, die alle in der Kernlokalisationssequenz der 18 kDa-Isoform zu finden sind, die Lokalisation in die Nukleoli modulieren. Die Abhängigkeit der differentiellen intranukleären Lokalisation von zwei unterschiedlichen Motiven ist für FGF-3 gezeigt (Antoine et al., 1997). Die Sequenz, die für die Lokalisation von FGF-2 in die Cajal-Körper verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Jedoch verhindert die Anwesenheit der zentralen RG-reichen Domäne die Colokalisation von FGF-2 und Coilin, wie es bei FGF-2²¹ zu sehen ist. Für die intranukleäre Lokalisation der 23 kDa-Isoform, die sich komplett von der der anderen Isoformen unterscheidet, scheint nur das zusätzliche aminotermale RG-Motiv verantwortlich zu sein. Dieses scheint die spezifischen Interaktionen der 23 kDa-Isoform zum Beispiel mit SMN erst zu ermöglichen und somit die typische Lokalisation zu bewirken.

4.2.1 Die Inhibition der Methylierung der RG-Motive bewirkt eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von FGF-2

Wie wirkt sich die Inhibition der Arginimethylierung auf die subzelluläre Lokalisation von FGF-2 aus? Wie in dieser Arbeit durch immunocytochemische Versuche gezeigt, akkumuliert ein Großteil von FGF-2 nach Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor AdOx im Cytoplasma und an der Peripherie des Zellkerns (Abb. 11). In unbehandelten Zellen hingegen war FGF-2 gleichförmig in der Zelle verteilt. In dieser Studie war zwar noch ein Signal für FGF-2 im Zellkern zu sehen, vermutlich war dies auf die Anwesenheit der 18 kDa-Isoform von FGF-2 zurückzuführen, die nicht methyliert werden kann. Es ist ebenfalls möglich, daß das detektierte Signal von bereits methyliertem FGF-2²³ stammte, welches vor Zugabe des Methylierungsinhibitors dieser posttranslationalen Modifikation unterworfen wurde. Die hier erhaltenen Daten stehen im Widerspruch zu bisherigen Daten (Pintucci et al., 1996). Dort veränderte sich zwar ebenfalls nach Behandlung von NIH3T3-Zellen mit dem Methylierungsinhibitor 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) die subzelluläre Lokalisation der hochmolekularen Isoformen von FGF-2. Jedoch waren die hochmolekularen Isoformen von FGF-2 in dieser Studie nach Behandlung mit MTA gleichmäßig im Cytoplasma und Zellkern verteilt (Pintucci et al., 1996). Der Grund für diesen Unterschied könnte in der unterschiedlichen Effizienz der Methylierungsinhibition der verwendeten Substrate MTA und AdOx liegen. Durch einen unterschiedlichen Grad an Inhibition der Methylierung könnte das unterschiedliche Verteilungsmuster zustande kommen. Die

Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation von FGF-2²³ durch PRMT1 und PRMT5, sowie die Möglichkeit die subzelluläre Lokalisation von FGF-2²³ durch den Einsatz eines Methylierungsinhibitors zu modulieren, sprechen für einen Zusammenhang zwischen der Argininmethylierung und Lokalisation der 23 kDa-Isoform im Zellkern. Aus den Ergebnissen dieser Versuche kann man also schließen, daß die subzelluläre Lokalisation der hochmolekularen Isoformen sowohl von der Anzahl der RG-Motive als auch vom Status der Methylierung dieser Motive abhängig ist.

4.3 Modell für FGF-2²³-Funktion

Als endogenes Protein wird FGF-2²³ fast ausschließlich im Cytosol und im Zellkern gefunden (Arnaud et al., 1999; Bugler et al., 1991; Renko et al., 1990; Sorensen et al., 2006). Nach der Translation wird FGF-2²³ wahrscheinlich direkt in den Zellkern transportiert. Im Zellkern ist FGF-2²³ zum Teil chromatinassoziiert, in einem punktuellen Muster verteilt und co-lokalisiert bei Überexpression mit SMN in Gerns beziehungsweise SMN-positiven Kernkörpern (Claus et al., 2003; Sun et al., 2001). Weiterhin kommt es im Zellkern zu einer direkten Interaktion mit zwei Proteinen, die im Spleißprozeß von pre-mRNA involviert sind, SMN und SF3a66. Zudem ist FGF-2²³ mit U2 snRNA assoziiert (Claus et al., 2004; Gringel et al., 2004). Die Interaktion mit SMN findet unter Konkurrenz mit Gemin2 statt, was eine Destabilisierung der SMN-positiven Kernkörper zur Folge hat. Bei dieser Bindung könnte es zu einer Übertragung der snRNPs auf einen Komplex kommen, der FGF-2²³ enthält. Desweiteren interagiert FGF-2 direkt mit einer Untereinheit von SF3a (SF3a66). SF3a spielt neben SF3b eine Schlüsselrolle in der Reifung des 12 S U2 snRNP zum funktionellen 17 S U2 snRNP (Brosi et al., 1993a; Brosi et al., 1993b; Kramer et al., 1999). Durch die Bindung an SMN und SF3a66 im Zellkern könnte letztlich eine Subklasse an U snRNPs gebildet werden, die in Abhängigkeit des Wachstumsfaktors die Spleißeffizienz und / oder das alternative Spleißen beeinflussen könnte. Welche Bedeutung hat die Konkurrenz der Bindung von FGF-2²³ und Gemin2 an SMN im Zellkern und der daraus folgenden verminderten Anzahl an SMN-positiven Kernkörper in der Zelle in der Pathologie der SMA? In SMA-Patienten ist die Biogenese der U snRNPs gestört (Briese et al., 2005; Monani, 2005). Eine Überexpression von FGF-2²³ sollte diese jedoch nicht beeinflussen, da FGF-2²³ erst im Zellkern an SMN bindet. Wie erwähnt kommt es in Fibroblasten von SMA-Patienten zu keiner Ausbildung von SMN-positiven Kernkörpern. Das vom *SMN2*-Gen codierte Protein weist eine ver-

Diskussion

minderte Oligomerisierungskapazität auf und wird schnell degradiert (Lorson et al., 1998). Demnach scheint die Fähigkeit von SMN zur Oligomerisierung einen Einfluß auf die Ausbildung der SMN-positiven Kernkörper zu haben. Gemin2 ist wie SMN eine Kernkomponente der SMN-positiven Foci (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997). Eine Depletion von Gemin2 durch RNAi führt zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Häufigkeitsverteilung der SMN-positiven Foci, wie eine Überexpression von FGF-2²³ (nicht gezeigt). Eine Überexpression von FGF-2²³ führt zu verlängerten Neuriten in PC 12-Zellen (Muller-Ostermeyer et al., 2001), zudem ist FGF-2²³ in axonalen Regenerationsprozessen beteiligt (Haastert et al., 2006). Daher ist es denkbar, daß eine potentielle U snRNP-Subklasse, die unter Einfluß von FGF-2²³ gebildet würde, wichtig für das Wachstum von Motoneuronen wäre. Eine „Übertragung“ der U snRNPs an FGF-2²³ fände in SMN-positiven Foci statt. Da es bei der SMA nicht zu einer Bildung solcher Foci kommt, käme es auch nicht zur Bildung einer U snRNP-Subklasse, was den für SMA typischen Phänotyp hervorriefe. Eine Destabilisierung der SMN-positiven Kernkörper durch eine Überexpression von FGF-2²³ hätte demnach keinerlei negative Auswirkungen auf das Auswachsen von Motoneuronen und rief keinen SMA-Phänotyp hervor, sondern entspräche einem beim Auswachsen von Motoneuronen regulierten Vorgang. Dies wäre der Grund, weshalb bei den hier untersuchten FGF-2-überexprimierenden Mäusen kein SMA-Phänotyp auftrat. Die Rolle der U snRNPs in der Pathologie der Spinalen Muskelatrophie ist jedoch kontrovers. Im Zebrafischmodell wirkt sich nicht nur die Herunterregulation von Smn durch anti-sense Morpholinos in einem Defekt der Motoneurone aus. Auch die Herunterregulation von pICln und Gemin2, beides Proteine, die an der Biogenese der U snRNPs beteiligt sind, zeigen im Zebrafischmodell einen solchen Effekt. Wurden in Embryonen, in die anti-sense Morpholinos gegen Smn und Gemin2 injiziert wurden, gleichzeitig aufgereinigte U snRNPs injiziert, so wurde die Ausbildung der axonalen Defekte verhindert (Winkler et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen, daß das korrekte Auswachsen der Axone im Zebrafisch-Modell unabhängig von der Biogenese der U snRNPs ist (Carrel et al., 2006). Mit Hilfe dieser Arbeit konnte ein weiterer Einblick in die Biologie der Interaktion zwischen dem SMN-Protein und dem Fibroblastenwachstumsfaktor-2 gewonnen werden. In Bezug auf die Pathogenese der SMA wäre es von Interesse zu überprüfen, ob durch FGF-2²³ die Bildung einer U snRNP-Subklasse vermittelt wird. Zudem wäre von Interesse, ob in Abhängigkeit von FGF-2²³ tatsächlich ein differentielles Spleißen von RNAs stattfindet, die wichtig

für das Auswachsen von Motoneuronen sind und ob dieses Spleißmuster bei der SMA verändert ist.

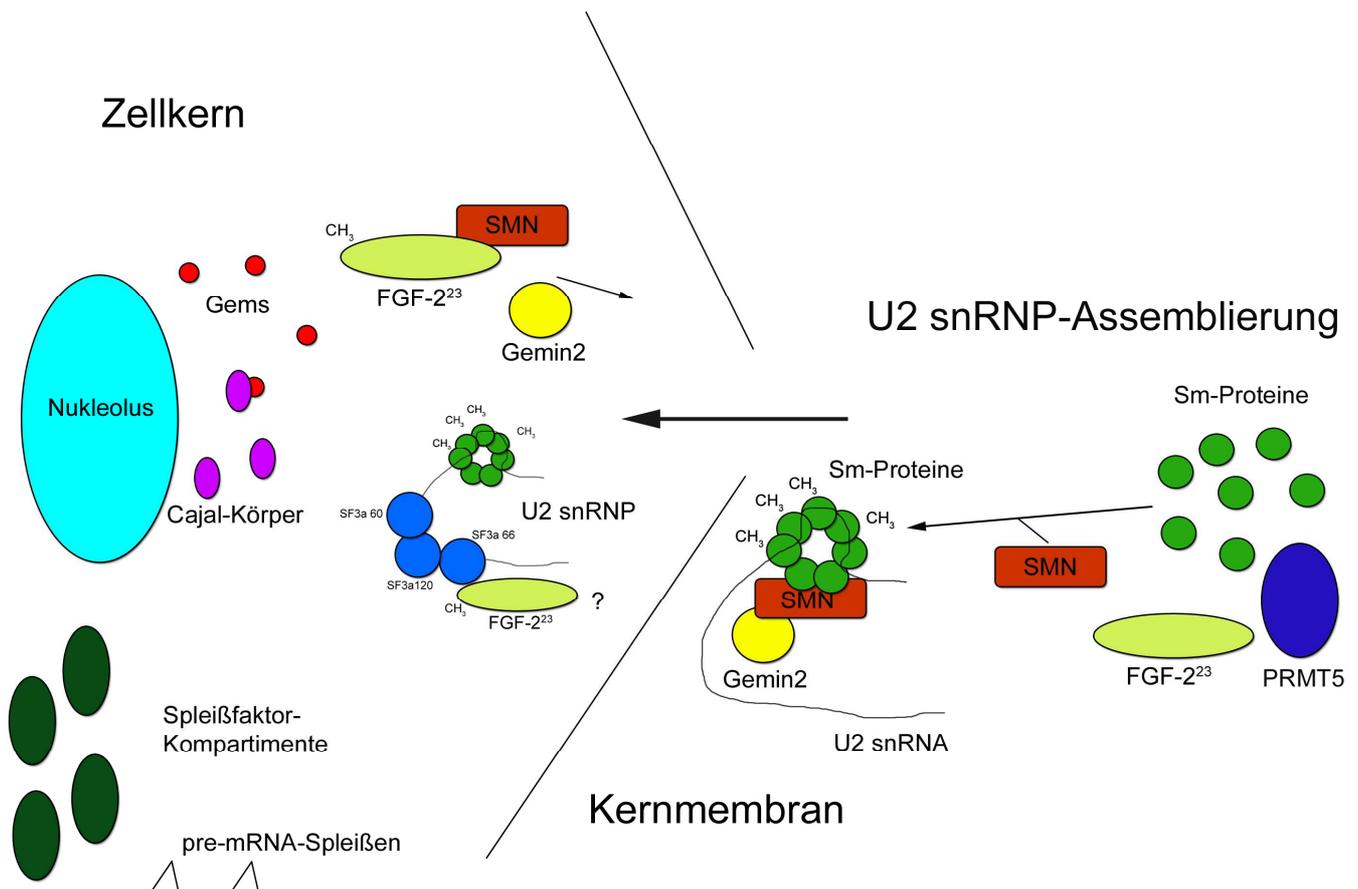


Abbildung 13: Zusammenfassendes Schema der Interaktion von FGF-2²³ und SMN sowie derer funktioneller Konsequenz. FGF-2²³ liegt mit PRMT5 in einem gemeinsamen Komplex vor und wird von dieser Typ II Methyltransferase *in vitro* methyliert. Im Zellkern erfolgt die Bindung an das SMN-Protein, welches im Cytoplasma eine wichtige Rolle in der Assemblierung der U snRNPs spielt. Die Bindung an SMN erfolgt unter Konkurrenz mit Gemin2, was sich in einer Destabilisierung der SMN-positiven Kernkörper auswirkt. FGF-2²³ interagiert mit SF3a66 (Gringel et al., 2004), einer Untereinheit des SF3a-Komplexes und liegt in einem Komplex mit U2 und U4 snRNA vor (Claus et al., 2004). Aufgrund dessen ist es möglich, daß eine Subklasse von U snRNPs gebildet wird, die in Abhängigkeit dieses Wachstumsfaktors ein differentielles Spleißen motoneuronspezifischer pre-mRNAs bewirkt. Die Destabilisierung der SMN-positiven Kernkörper unter Verdrängung von Gemin2 könnte eine Bedingung für die Bildung dieser U snRNP-Subklasse sein.

5. Literaturverzeichnis

- Antoine, M., K. Reimers, C. Dickson, und P. Kiefer. 1997. Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J Biol Chem.* 272:29475-81.
- Arese, M., Y. Chen, R.Z. Florkiewicz, A. Gualandris, B. Shen, und D.B. Rifkin. 1999. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell.* 10:1429-44.
- Arnaud, E., C. Touriol, C. Boutonnet, M.C. Gensac, S. Vagner, H. Prats, und A.C. Prats. 1999. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol.* 19:505-14.
- Asatoor, A.M., und M.D. Armstrong. 1967. 3-methylhistidine, a component of actin. *Biochem Biophys Res Commun.* 26:168-74.
- Avivi, A., A. Yaron, und D. Givol. 1993. A novel form of FGF receptor-3 using an alternative exon in the immunoglobulin domain III. *FEBS Lett.* 330:249-52.
- Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann, und G. Dreyfuss. 2002. Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem.* 277:31957-62.
- Baird, A., D. Schubert, N. Ling, und R. Guillemin. 1988. Receptor- and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:2324-8.
- Baldwin, G.S., und P.R. Carnegie. 1971a. Isolation and partial characterization of methylated arginines from the encephalitogenic basic protein of myelin. *Biochem J.* 123:69-74.
- Baldwin, G.S., und P.R. Carnegie. 1971b. Specific enzymic methylation of an arginine in the experimental allergic encephalomyelitis protein from human myelin. *Science.* 171:579-81.
- Battle, D.J., C.K. Lau, L. Wan, H. Deng, F. Lotti, und G. Dreyfuss. 2006. The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol Cell.* 23:273-9.
- Bechade, C., P. Rostaing, C. Cisterni, R. Kalisch, V. La Bella, B. Pettmann, und A. Triller. 1999. Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein:

- possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci.* 11:293-304.
- Bedford, M.T., A. Frankel, M.B. Yaffe, S. Clarke, P. Leder, und S. Richard. 2000. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J Biol Chem.* 275:16030-6.
- Bertrand, S., P. Bulet, O. Clermont, C. Huber, C. Fondrat, D. Thierry-Mieg, A. Munnich, und S. Lefebvre. 1999. The RNA-binding properties of SMN: deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum Mol Genet.* 8:775-82.
- Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci, N. Quarto, P. Mignatti, und D.B. Rifkin. 1995. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J Cell Biol.* 129:233-43.
- Bonnal, S., F. Pileur, C. Orsini, F. Parker, F. Pujol, A.C. Prats, und S. Vagner. 2005. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem.* 280:4144-53.
- Bonnet, H., O. Filhol, I. Truchet, P. Brethenou, C. Cochet, F. Amalric, und G. Bouche. 1996. Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem.* 271:24781-7.
- Bossard, C., H. Laurell, L. Van den Berghe, S. Meunier, C. Zanibellato, und H. Prats. 2003. Translokin is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol.* 5:433-9.
- Bottcher, R.T., und C. Niehrs. 2005. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* 26:63-77.
- Bouche, G., V. Baldin, P. Belenguer, H. Prats, und F. Amalric. 1994. Activation of rDNA transcription by FGF-2: key role of protein kinase CKII. *Cell Mol Biol Res.* 40:547-54.
- Bouche, G., N. Gas, H. Prats, V. Baldin, J.P. Tauber, J. Teissie, und F. Amalric. 1987. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0----G1 transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:6770-4.

Literaturverzeichnis

- Brahms, H., L. Meheus, V. de Brabandere, U. Fischer, und R. Luhrmann. 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*. 7:1531-42.
- Brahms, H., J. Raymackers, A. Union, F. de Keyser, L. Meheus, und R. Luhrmann. 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*. 275:17122-9.
- Briese, M., B. Esmaeili, und D.B. Sattelle. 2005. Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *Bioessays*. 27:946-57.
- Brosi, R., K. Groning, S.E. Behrens, R. Luhrmann, und A. Kramer. 1993a. Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9. *Science*. 262:102-5.
- Brosi, R., H.P. Hauri, und A. Kramer. 1993b. Separation of splicing factor SF3 into two components and purification of SF3a activity. *J Biol Chem*. 268:17640-6.
- Brzustowicz, L.M., P.W. Kleyn, F.M. Boyce, L.L. Lien, A.P. Monaco, G.K. Penchaszadeh, K. Das, C.H. Wang, T.L. Munsat, J. Ott, und et al. 1992. Fine-mapping of the spinal muscular atrophy locus to a region flanked by MAP1B and D5S6. *Genomics*. 13:991-8.
- Brzustowicz, L.M., T. Lehner, L.H. Castilla, G.K. Penchaszadeh, K.C. Wilhelmsen, R. Daniels, K.E. Davies, M. Leppert, F. Ziter, D. Wood, und et al. 1990. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*. 344:540-1.
- Bugler, B., F. Amalric, und H. Prats. 1991. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol*. 11:573-7.
- Buhler, D., V. Raker, R. Luhrmann, und U. Fischer. 1999. Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 8:2351-7.
- Campbell, D.S., und C.E. Holt. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. 32:1013-26.

- Carissimi, C., J. Baccon, M. Straccia, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappsilber, und L. Pellizzoni. 2005. Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.* 579:2348-54.
- Carissimi, C., L. Saieva, J. Baccon, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappsilber, und L. Pellizzoni. 2006. Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J Biol Chem.* 281:8126-34.
- Carrel, T.L., M.L. McWhorter, E. Workman, H. Zhang, E.C. Wolstencroft, C. Lorson, G.J. Bassell, A.H. Burghes, und C.E. Beattie. 2006. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci.* 26:11014-22.
- Carvalho, T., F. Almeida, A. Calapez, M. Lafarga, M.T. Berciano, und M. Carmo-Fonseca. 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol.* 147:715-28.
- Chan, Y.B., I. Miguel-Aliaga, C. Franks, N. Thomas, B. Trulzsch, D.B. Sattelle, K.E. Davies, und M. van den Heuvel. 2003. Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet.* 12:1367-76.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R.A. Perkinson, A. Shevchenko, M. Mann, und G. Dreyfuss. 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.* 147:1181-94.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R.A. Perkinson, J. Yong, A. Shevchenko, M. Mann, und G. Dreyfuss. 2000. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol.* 148:1177-86.
- Chellaiah, A.T., D.G. McEwen, S. Werner, J. Xu, und D.M. Ornitz. 1994. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem.* 269:11620-7.
- Cifuentes-Diaz, C., S. Nicole, M.E. Velasco, C. Borra-Cebrian, C. Panozzo, T. Frugier, G. Millet, N. Roblot, V. Joshi, und J. Melki. 2002. Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet.* 11:1439-47.

Literaturverzeichnis

- Claus, P., A.F. Bruns, und C. Grothe. 2004. Fibroblast growth factor-2(23) binds directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem J.* 384:559-65.
- Claus, P., F. Doring, S. Gringel, F. Muller-Ostermeyer, J. Fuhlrott, T. Kraft, und C. Grothe. 2003. Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem.* 278:479-85.
- Coffin, J.D., R.Z. Florkiewicz, J. Neumann, T. Mort-Hopkins, G.W. Dorn, 2nd, P. Lightfoot, R. German, P.N. Howles, A. Kier, B.A. O'Toole, und et al. 1995. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell.* 6:1861-73.
- Cohen-Jonathan, E., C. Toulas, S. Monteil, B. Couderc, A. Maret, J.J. Bard, H. Prats, N. Daly-Schveitzer, und G. Favre. 1997. Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res.* 57:1364-70.
- Coover, D.D., T.T. Le, P.E. McAndrew, J. Strasswimmer, T.O. Crawford, J.R. Mendell, S.E. Coulson, E.J. Androphy, T.W. Prior, und A.H. Burghes. 1997. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 6:1205-14.
- Creancier, L., D. Morello, P. Mercier, und A.C. Prats. 2000. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol.* 150:275-81.
- Davis, J.C., G. Venkataraman, Z. Shriver, P.A. Raj, und R. Sasisekharan. 1999. Oligomeric self-association of basic fibroblast growth factor in the absence of heparin-like glycosaminoglycans. *Biochem J.* 341 (Pt 3):613-20.
- Dono, R., D. James, und R. Zeller. 1998. A GR-motif functions in nuclear accumulation of the large FGF-2 isoforms and interferes with mitogenic signalling. *Oncogene.* 16:2151-8.
- Dubowitz, V. 1999. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatr Neurol.* 3:49-51.
- Eriksson, A.E., L.S. Cousens, L.H. Weaver, und B.W. Matthews. 1991. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3441-5.

- Eswarakumar, V.P., I. Lax, und J. Schlessinger. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:139-49.
- Faham, S., R.J. Linhardt, und D.C. Rees. 1998. Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 8:578-86.
- Fan, L., und L.R. Simard. 2002. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet.* 11:1605-14.
- Feldkotter, M., V. Schwarzer, R. Wirth, T.F. Wienker, und B. Wirth. 2002. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 70:358-68.
- Feng, W., A.K. Gubitza, L. Wan, D.J. Battle, J. Dostie, T.J. Golembe, und G. Dreyfuss. 2005. Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex. *Hum Mol Genet.* 14:1605-11.
- Fischer, U., Q. Liu, und G. Dreyfuss. 1997. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell.* 90:1023-9.
- Florkiewicz, R.Z., A. Baird, und A.M. Gonzalez. 1991. Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization. *Growth Factors.* 4:265-75.
- Foletti, A., F. Vuadens, und F. Beermann. 2003. Nuclear localization of mouse fibroblast growth factor 2 requires N-terminal and C-terminal sequences. *Cell Mol Life Sci.* 60:2254-65.
- Fontes, M.R., T. Teh, D. Jans, R.I. Brinkworth, und B. Kobe. 2003. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem.* 278:27981-7.
- Friesen, W.J., und G. Dreyfuss. 2000. Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem.* 275:26370-5.
- Friesen, W.J., S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G.S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann, und G. Dreyfuss. 2001. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol.* 21:8289-300.
- Friesen, W.J., A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, und G. Dreyfuss. 2002. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 277:8243-7.

Literaturverzeichnis

- Frugier, T., F.D. Tiziano, C. Cifuentes-Diaz, P. Miniou, N. Roblot, A. Dierich, M. Le Meur, und J. Melki. 2000. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 9:849-58.
- Gabanella, F., C. Carissimi, A. Usiello, und L. Pellizzoni. 2005. The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Hum Mol Genet.* 14:3629-42.
- Giesemann, T., S. Rathke-Hartlieb, M. Rothkegel, J.W. Bartsch, S. Buchmeier, B.M. Jockusch, und H. Jockusch. 1999. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem.* 274:37908-14.
- Gilbert, E., F. Del Gatto, P. Champion-Arnaud, M.C. Gesnel, und R. Breathnach. 1993. Control of BEK and K-SAM splice sites in alternative splicing of the fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA. *Mol Cell Biol.* 13:5461-8.
- Goldfarb, M. 2005. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:215-20.
- Golembe, T.J., J. Yong, und G. Dreyfuss. 2005. Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs. *Mol Cell Biol.* 25:10989-1004.
- Grimmler, M., L. Bauer, M. Nousiainen, R. Korner, G. Meister, und U. Fischer. 2005. Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep.* 6:70-6.
- Gringel, S., J. van Bergeijk, K. Haastert, C. Grothe, und P. Claus. 2004. Nuclear fibroblast growth factor-2 interacts specifically with splicing factor SF3a66. *Biol Chem.* 385:1203-8.
- Grose, R., und C. Dickson. 2005. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:179-86.
- Grothe, C., C. Meisinger, J. Holzschuh, K. Wewetzer, und P. Cattini. 1998. Overexpression of the 18 kD and 21/23 kD fibroblast growth factor-2 isoforms in PC12 cells and Schwann cells results in altered cell morphology and growth. *Brain Res Mol Brain Res.* 57:97-105.
- Grothe, C., und K. Unsicker. 1990. Immunocytochemical mapping of basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat adrenal gland. *Histochemistry.* 94:141-7.

- Grothe, C., K. Zachmann, K. Unsicker, und R. Westermann. 1990. High molecular weight forms of basic fibroblast growth factor recognized by a new anti-bFGF antibody. *FEBS Lett.* 260:35-8.
- Gualandris, A., M. Arese, B. Shen, und D.B. Rifkin. 1999. Modulation of cell growth and transformation by doxycycline-regulated FGF-2 expression in NIH-3T3 cells. *J Cell Physiol.* 181:273-84.
- Gubitz, A.K., Z. Mourelatos, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, und G. Dreyfuss. 2002. Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 277:5631-6.
- Gutsche-Perelroizen, I., J. Lepault, A. Ott, und M.F. Carlier. 1999. Filament assembly from profilin-actin. *J Biol Chem.* 274:6234-43.
- Haastert, K., E. Lipokatic, M. Fischer, M. Timmer, und C. Grothe. 2006. Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms. *Neurobiol Dis.* 21:138-53.
- Hadari, Y.R., N. Gotoh, H. Kouhara, I. Lax, und J. Schlessinger. 2001. Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8578-83.
- Hadari, Y.R., H. Kouhara, I. Lax, und J. Schlessinger. 1998. Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 18:3966-73.
- Hama, J., H. Xu, M. Goldfarb, und D.C. Weinstein. 2001. SNT-1/FRS2alpha physically interacts with Laloo and mediates mesoderm induction by fibroblast growth factor. *Mech Dev.* 109:195-204.
- Hebert, M.D., K.B. Shpargel, J.K. Ospina, K.E. Tucker, und A.G. Matera. 2002. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev Cell.* 3:329-37.
- Hebert, M.D., P.W. Szymczyk, K.B. Shpargel, und A.G. Matera. 2001. Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.* 15:2720-9.
- Herrmann, F., J. Lee, M.T. Bedford, und F.O. Fackelmayer. 2005. Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo. *J Biol Chem.* 280:38005-10.
- Hsieh-Li, H.M., J.G. Chang, Y.J. Jong, M.H. Wu, N.M. Wang, C.H. Tsai, und H. Li. 2000. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 24:66-70.

Literaturverzeichnis

- Hsu, Y.R., R. Nybo, J.K. Sullivan, V. Costigan, C.S. Spahr, C. Wong, M. Jones, A.G. Pentzer, J.A. Crouse, R.E. Pacifici, H.S. Lu, C.F. Morris, und J.S. Philo. 1999. Heparin is essential for a single keratinocyte growth factor molecule to bind and form a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor. *Biochemistry*. 38:2523-34.
- Itoh, N., und D.M. Ornitz. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*. 20:563-9.
- Jablonka, S., M. Bandilla, S. Wiese, D. Buhler, B. Wirth, M. Sendtner, und U. Fischer. 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., B. Holtmann, G. Meister, M. Bandilla, W. Rossoll, U. Fischer, und M. Sendtner. 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*. 99:10126-31.
- Jady, B.E., X. Darzacq, K.E. Tucker, A.G. Matera, E. Bertrand, und T. Kiss. 2003. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *Embo J*. 22:1878-88.
- Johnson, B.A., J. Najbauer, und D.W. Aswad. 1993. Accumulation of substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in adenosine dialdehyde-treated PC12 cells. *J Biol Chem*. 268:6174-81.
- Johnson, D.E., P.L. Lee, J. Lu, und L.T. Williams. 1990. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol*. 10:4728-36.
- Jones, K.W., K. Gorzynski, C.M. Hales, U. Fischer, F. Badbanchi, R.M. Terns, und M.P. Terns. 2001. Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem*. 276:38645-51.
- Jordan, G. 1987. At the heart of the nucleolus. *Nature*. 329:489-90.
- Kashima, T., und J.L. Manley. 2003. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. 34:460-3.
- Kiefer, P., P. Acland, D. Pappin, G. Peters, und C. Dickson. 1994. Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *Embo J*. 13:4126-36.

- Kim, Y.S., S. Furman, H. Sink, und M.F. VanBerkum. 2001. Calmodulin and profilin coregulate axon outgrowth in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 47:26-38.
- Kiss, T. 2004. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci.* 117:5949-51.
- Klein, S., J.A. Carroll, Y. Chen, M.F. Henry, P.A. Henry, I.E. Ortonowski, G. Pintucci, R.C. Beavis, W.H. Burgess, und D.B. Rifkin. 2000. Biochemical analysis of the arginine methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem.* 275:3150-7.
- Komar, A.A., und M. Hatzoglou. 2005. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem.* 280:23425-8.
- Kramer, A., P. Gruter, K. Groning, und B. Kastner. 1999. Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP. *J Cell Biol.* 145:1355-68.
- Lee, P.L., D.E. Johnson, L.S. Cousens, V.A. Fried, und L.T. Williams. 1989. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science.* 245:57-60.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, und et al. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 80:155-65.
- Lefebvre, S., P. Burlet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, A. Munnich, G. Dreyfuss, und J. Melki. 1997. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 16:265-9.
- Lennon, G., C. Auffray, M. Polymeropoulos, und M.B. Soares. 1996. The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics.* 33:151-2.
- Lim, Y., Y.H. Kwon, N.H. Won, B.H. Min, I.S. Park, W.K. Paik, und S. Kim. 2005. Multimerization of expressed protein-arginine methyltransferases during the growth and differentiation of rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1723:240-7.
- Lin, C.H., H.M. Huang, M. Hsieh, K.M. Pollard, und C. Li. 2002. Arginine methylation of recombinant murine fibrillarin by protein arginine methyltransferase. *J Protein Chem.* 21:447-53.
- Liu, Q., und G. Dreyfuss. 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J.* 15:3555-65.

Literaturverzeichnis

- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang, und G. Dreyfuss. 1997. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*. 90:1013-21.
- Lobb, R.R. 1988. Clinical applications of heparin-binding growth factors. *Eur J Clin Invest*. 18:321-36.
- Lorson, C.L., und E.J. Androphy. 1998. The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum Mol Genet*. 7:1269-75.
- Lorson, C.L., E. Hahnen, E.J. Androphy, und B. Wirth. 1999. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:6307-11.
- Lorson, C.L., J. Strasswimmer, J.M. Yao, J.D. Baleja, E. Hahnen, B. Wirth, T. Le, A.H. Burghes, und E.J. Androphy. 1998. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*. 19:63-6.
- MacLeod, M.J., J.E. Taylor, P.W. Lunt, C.G. Mathew, und S.A. Robb. 1999. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 3:65-72.
- Malatesta, M., C. Scassellati, G. Meister, O. Plottner, D. Buhler, G. Sowa, T.E. Martin, E. Keidel, U. Fischer, und S. Fakan. 2004. Ultrastructural characterisation of a nuclear domain highly enriched in survival of motor neuron (SMN) protein. *Exp Cell Res*. 292:312-21.
- Malecki, J., J. Wesche, C.S. Skjerpen, A. Wiedlocha, und S. Olsnes. 2004. Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Mol Biol Cell*. 15:801-14.
- Massenet, S., L. Pellizzoni, S. Paushkin, I.W. Mattaj, und G. Dreyfuss. 2002. The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol Cell Biol*. 22:6533-41.
- Matera, A.G. 2003. Cajal bodies. *Curr Biol*. 13:R503.
- McAndrew, P.E., D.W. Parsons, L.R. Simard, C. Rochette, P.N. Ray, J.R. Mendell, T.W. Prior, und A.H. Burghes. 1997. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet*. 60:1411-22.
- McBride, A.E., und P.A. Silver. 2001. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*. 106:5-8.

- McKeehan, W.L., F. Wang, und M. Kan. 1998. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 59:135-76.
- McWhorter, M.L., U.R. Monani, A.H. Burghes, und C.E. Beattie. 2003. Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol.* 162:919-31.
- Meister, G., C. Eggert, D. Buhler, H. Brahm, C. Kambach, und U. Fischer. 2001. Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol.* 11:1990-4.
- Meister, G., C. Eggert, und U. Fischer. 2002. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* 12:472-8.
- Meister, G., und U. Fischer. 2002. Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *Embo J.* 21:5853-63.
- Miguel-Aliaga, I., E. Culetto, D.S. Walker, H.A. Baylis, D.B. Sattelle, und K.E. Davies. 1999. The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum Mol Genet.* 8:2133-43.
- Miki, T., D.P. Bottaro, T.P. Fleming, C.L. Smith, W.H. Burgess, A.M. Chan, und S.A. Aaronson. 1992. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:246-50.
- Monani, U.R. 2005. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron.* 48:885-96.
- Monani, U.R., C.L. Lorson, D.W. Parsons, T.W. Prior, E.J. Androphy, A.H. Burghes, und J.D. McPherson. 1999. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 8:1177-83.
- Monani, U.R., M. Sendtner, D.D. Covert, D.W. Parsons, C. Andreassi, T.T. Le, S. Jablonka, B. Schrank, W. Rossol, T.W. Prior, G.E. Morris, und A.H. Burghes. 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.* 9:333-9.

Literaturverzeichnis

- Moroianu, J., und J.F. Riordan. 1994. Nuclear translocation of angiogenic proteins in endothelial cells: an essential step in angiogenesis. *Biochemistry*. 33:12535-9.
- Moy, F.J., A.P. Seddon, E.B. Campbell, P. Bohlen, und R. Powers. 1995. ¹H, ¹⁵N, ¹³C and ¹³CO assignments and secondary structure determination of basic fibroblast growth factor using 3D heteronuclear NMR spectroscopy. *J Biomol NMR*. 6:245-54.
- Muller-Ostermeyer, F., P. Claus, und C. Grothe. 2001. Distinctive effects of rat fibroblast growth factor-2 isoforms on PC12 and Schwann cells. *Growth Factors*. 19:175-91.
- Narayanan, U., T. Achsel, R. Luhrmann, und A.G. Matera. 2004. Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol Cell*. 16:223-34.
- Narayanan, U., J.K. Ospina, M.R. Frey, M.D. Hebert, und A.G. Matera. 2002. SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet*. 11:1785-95.
- Naski, M.C., und D.M. Ornitz. 1998. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci*. 3:d781-94.
- Nichols, R.C., X.W. Wang, J. Tang, B.J. Hamilton, F.A. High, H.R. Herschman, und W.F. Rigby. 2000. The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp Cell Res*. 256:522-32.
- Ohno, M., A. Segref, A. Bachi, M. Wilm, und I.W. Mattaj. 2000. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell*. 101:187-98.
- Ornitz, D.M., und N. Itoh. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2:REVIEWS3005.
- Ornitz, D.M., J. Xu, J.S. Colvin, D.G. McEwen, C.A. MacArthur, F. Coulier, G. Gao, und M. Goldfarb. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 271:15292-7.
- Orr-Urtreger, A., M.T. Bedford, T. Burakova, E. Arman, Y. Zimmer, A. Yayon, D. Givol, und P. Lonai. 1993. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol*. 158:475-86.
- Otis, K.O., K.R. Thompson, und K.C. Martin. 2006. Importin-mediated nuclear transport in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 16:329-35.

- Owen, N., C.L. Doe, J. Mellor, und K.E. Davies. 2000. Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum Mol Genet.* 9:675-84.
- Pagliardini, S., A. Giavazzi, V. Setola, C. Lizier, M. Di Luca, S. DeBiasi, und G. Battaglia. 2000. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet.* 9:47-56.
- Pasumarthi, K.B., E. Kardami, und P.A. Cattini. 1996. High and low molecular weight fibroblast growth factor-2 increase proliferation of neonatal rat cardiac myocytes but have differential effects on binucleation and nuclear morphology. Evidence for both paracrine and intracrine actions of fibroblast growth factor-2. *Circ Res.* 78:126-36.
- Paushkin, S., A.K. Gubitz, S. Massenet, und G. Dreyfuss. 2002. The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* 14:305-12.
- Pearn, J. 1978. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet.* 15:409-13.
- Pearn, J.H., P. Hudgson, und J.N. Walton. 1978. A clinical and genetic study of spinal muscular atrophy of adult onset: the autosomal recessive form as a discrete disease entity. *Brain.* 101:591-606.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, B. Charroux, und G. Dreyfuss. 2001. The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol.* 11:1079-88.
- Pellizzoni, L., B. Charroux, und G. Dreyfuss. 1999. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11167-72.
- Pellizzoni, L., N. Kataoka, B. Charroux, und G. Dreyfuss. 1998. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell.* 95:615-24.
- Pellizzoni, L., J. Yong, und G. Dreyfuss. 2002. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science.* 298:1775-9.
- Pillai, R.S., M. Grimmler, G. Meister, C.L. Will, R. Luhrmann, U. Fischer, und D. Schumperli. 2003. Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev.* 17:2321-33.

Literaturverzeichnis

- Pilz, R.B., G. Van den Berghe, und G.R. Boss. 1987. Induction of HL-60 differentiation by starvation for a single essential amino acid but not by protein synthesis inhibitors. *J Clin Invest.* 79:1006-9.
- Pintucci, G., N. Quarto, und D.B. Rifkin. 1996. Methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2 determines post-translational increases in molecular weight and affects its intracellular distribution. *Mol Biol Cell.* 7:1249-58.
- Plotnikov, A.N., J. Schlessinger, S.R. Hubbard, und M. Mohammadi. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell.* 98:641-50.
- Ponting, C.P. 1997. Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci.* 22:51-2.
- Powell, P.P., und M. Klagsbrun. 1991. Three forms of rat basic fibroblast growth factor are made from a single mRNA and localize to the nucleus. *J Cell Physiol.* 148:202-10.
- Powers, C.J., S.W. McLeskey, und A. Wellstein. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 7:165-97.
- Prats, A.C., S. Vagner, H. Prats, und F. Amalric. 1992. cis-acting elements involved in the alternative translation initiation process of human basic fibroblast growth factor mRNA. *Mol Cell Biol.* 12:4796-805.
- Prats, H., M. Kaghad, A.C. Prats, M. Klagsbrun, J.M. Lelias, P. Liauzun, P. Chalon, J.P. Tauber, F. Amalric, J.A. Smith, und et al. 1989. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:1836-40.
- Pye, D.A., und J.T. Gallagher. 1999. Monomer complexes of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate oligosaccharides are the minimal functional unit for cell activation. *J Biol Chem.* 274:13456-61.
- Quarto, N., F.P. Finger, und D.B. Rifkin. 1991. The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J Cell Physiol.* 147:311-8.
- Raker, V.A., G. Plessel, und R. Luhrmann. 1996. The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *Embo J.* 15:2256-69.
- Raper, S.E., S.J. Burwen, M.E. Barker, und A.L. Jones. 1987. Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology.* 92:1243-50.

- Renko, M., N. Quarto, T. Morimoto, und D.B. Rifkin. 1990. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J Cell Physiol.* 144:108-14.
- Rho, J., S. Choi, Y.R. Seong, W.K. Cho, S.H. Kim, und D.S. Im. 2001. Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J Biol Chem.* 276:11393-401.
- Roberts, D.F., J. Chavez, und S.D. Court. 1970. The genetic component in child mortality. *Arch Dis Child.* 45:33-8.
- Rossoll, W., S. Jablonka, C. Andreassi, A.K. Kroning, K. Karle, U.R. Monani, und M. Sendtner. 2003. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol.* 163:801-12.
- Rossoll, W., A.K. Kroning, U.M. Ohndorf, C. Steegborn, S. Jablonka, und M. Sendtner. 2002. Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet.* 11:93-105.
- Salgado-Garrido, J., E. Bragado-Nilsson, S. Kandels-Lewis, und B. Seraphin. 1999. Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *Embo J.* 18:3451-62.
- Schlessinger, J., I. Lax, und M. Lemmon. 1995. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell.* 83:357-60.
- Schmalbruch, H., und G. Haase. 2001. Spinal muscular atrophy: present state. *Brain Pathol.* 11:231-47.
- Schmidt-Zachmann, M.S., C. Dargemont, L.C. Kuhn, und E.A. Nigg. 1993. Nuclear export of proteins: the role of nuclear retention. *Cell.* 74:493-504.
- Schmidt-Zachmann, M.S., und E.A. Nigg. 1993. Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J Cell Sci.* 105 (Pt 3):799-806.
- Schrank, B., R. Gotz, J.M. Gunnensen, J.M. Ure, K.V. Toyka, A.G. Smith, und M. Sendtner. 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.* 94:9920-5.

Literaturverzeichnis

- Scotet, E., und E. Houssaint. 1995. The choice between alternative IIIb and IIIc exons of the FGFR-3 gene is not strictly tissue-specific. *Biochim Biophys Acta*. 1264:238-42.
- Segref, A., I.W. Mattaj, und M. Ohno. 2001. The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export. *Rna*. 7:351-60.
- Selenko, P., R. Sprangers, G. Stier, D. Buhler, U. Fischer, und M. Sattler. 2001. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol*. 8:27-31.
- Sheng, Z., J.A. Lewis, und W.J. Chirico. 2004. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J Biol Chem*. 279:40153-60.
- Sheng, Z., Y. Liang, C.Y. Lin, L. Comai, und W.J. Chirico. 2005. Direct regulation of rRNA transcription by fibroblast growth factor 2. *Mol Cell Biol*. 25:9419-26.
- Siomi, H., und G. Dreyfuss. 1995. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol*. 129:551-60.
- Smith, W.A., B.T. Schurter, F. Wong-Staal, und M. David. 2004. Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J Biol Chem*. 279:22795-8.
- Sorensen, V., T. Nilsen, und A. Wiedlocha. 2006. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays*. 28:504-14.
- Sun, G., B.W. Doble, J.M. Sun, R.R. Fandrich, R. Florkiewicz, L. Kirshenbaum, J.R. Davie, P.A. Cattini, und E. Kardami. 2001. CUG-initiated FGF-2 induces chromatin compaction in cultured cardiac myocytes and in vitro. *J Cell Physiol*. 186:457-67.
- Szebenyi, G., und J.F. Fallon. 1999. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol*. 185:45-106.
- Talbot, K. 1999. Spinal muscular atrophy. *J Inherit Metab Dis*. 22:545-54.
- Tan, E.M. 1989. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*. 44:93-151.
- Touriol, C., S. Bornes, S. Bonnal, S. Audigier, H. Prats, A.C. Prats, und S. Vagner. 2003. Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell*. 95:169-78.

- Vagner, S., M.C. Gensac, A. Maret, F. Bayard, F. Amalric, H. Prats, und A.C. Prats. 1995. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol.* 15:35-44.
- van Bergeijk, J., K. Rydel, C. Grothe, und P. Claus. 2006. The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C-terminus. *FASEB Journal.* in press.
- Wang, J., und G. Dreyfuss. 2001. Characterization of functional domains of the SMN protein in vivo. *J Biol Chem.* 276:45387-93.
- Wiedlocha, A., und V. Sorensen. 2004. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 286:45-79.
- Wills, Z., L. Marr, K. Zinn, C.S. Goodman, und D. Van Vactor. 1999. Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron.* 22:291-9.
- Winkler, C., C. Eggert, D. Gradl, G. Meister, M. Giegerich, D. Wedlich, B. Lagerbauer, und U. Fischer. 2005. Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* 19:2320-30.
- Yan, G., Y. Fukabori, G. McBride, S. Nikolaropolous, und W.L. McKeehan. 1993. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol.* 13:4513-22.
- Yayon, A., M. Klagsbrun, J.D. Esko, P. Leder, und D.M. Ornitz. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 64:841-8.
- Yong, J., T.J. Golembe, D.J. Battle, L. Pellizzoni, und G. Dreyfuss. 2004a. snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly. *Mol Cell Biol.* 24:2747-56.
- Yong, J., L. Pellizzoni, und G. Dreyfuss. 2002. Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex. *Embo J.* 21:1188-96.
- Yong, J., L. Wan, und G. Dreyfuss. 2004b. Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol.* 14:226-32.
- Young, P.J., T.T. Le, M. Dunckley, T.M. Nguyen, A.H. Burghes, und G.E. Morris. 2001. Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp Cell Res.* 265:252-61.

Literaturverzeichnis

- Young, P.J., T.T. Le, N. thi Man, A.H. Burghes, und G.E. Morris. 2000a. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res.* 256:365-74.
- Young, P.J., N.T. Man, C.L. Lorson, T.T. Le, E.J. Androphy, A.H. Burghes, und G.E. Morris. 2000b. The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet.* 9:2869-77.
- Zhan, X., X. Hu, S. Friedman, und T. Maciag. 1992. Analysis of endogenous and exogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 188:982-91.
- Zhang, H., L. Xing, W. Rossoll, H. Wichterle, R.H. Singer, und G.J. Bassell. 2006. Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci.* 26:8622-32.
- Zhang, H.L., T. Eom, Y. Oleynikov, S.M. Shenoy, D.A. Liebelt, J.B. Dichtenberg, R.H. Singer, und G.J. Bassell. 2001. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron.* 31:261-75.
- Zhang, H.L., F. Pan, D. Hong, S.M. Shenoy, R.H. Singer, und G.J. Bassell. 2003. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci.* 23:6627-37.
- Zhu, X., H. Komiya, A. Chirino, S. Faham, G.M. Fox, T. Arakawa, B.T. Hsu, und D.C. Rees. 1991. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science.* 251:90-3.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Peter Claus für die Bereitstellung des Themas, der guten Betreuung dieser Dissertation und der Geduld meine Fragen zu beantworten und Ideen zu diskutieren.

Prof. Claudia Grothe möchte ich für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen während dieser Arbeit danken.

Bei Hella Brinkmann und Kerstin Kuhleemann möchte ich mich für die exzellente technische Unterstützung und der „Aufbauarbeit“ bei mißlungenen Experimenten bedanken.

Meinem Mit-Doktoranden Jeroen van Bergeijk möchte ich für die lustigen Stunden auch außerhalb des Labors, den anregenden Diskussionen und der Motivation, die ab und zu nötig war, danken.

Den übrigen Mitarbeitern der Abteilung Neuroanatomie möchte ich für das Schaffen einer freundlichen und kollegialen Arbeitsatmosphäre danken.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Mutter, ohne die diese Ausbildung nicht möglich gewesen wäre und die stets für mich da war.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bruns
Vorname: Alexander-Francisco
Geburtsdatum: 04.I.1977
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung und Wehrdienst:

07/ 1996 Allgemeine Hochschulreife
07/1996 – 05/1997 Wehrdienst

Hochschulstudium:

10/ 1997 – 07/ 2003 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität
Göttingen; Diplom 06/ 2003

Dissertation:

07/ 2003 Beginn der Dissertation in der Abteilung für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)

Liste der wissenschaftlichen Publikationen

Poster

Bruns AF., Haastert K., Grothe C., Claus P. (2005): Nuclear dynamics of the survival of motoneuron (SMN) protein in living cells. 100th Annual Meeting of the Anatomy Society, Leipzig, Germany. Verh. Der Anat. Ges., Ann. Anat. Suppl. 187: 91.

Claus P., **Bruns AF.**, van Bergeijk J., Haastert K., Grothe C. (2005): Functional domain mapping of the survival of motoneuron (SMN) protein: effects on axonal growth. Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society/30th Göttingen Neurobiology Conference 2005, eds: H. Zimmermann and K. Krieglstein. Neuroforum 2005, 1 Suppl.: 398B.

Bruns AF., Grothe C., Claus P. (2005): Fibroblast growth factor-2 is a substrate of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), a component of the methylosome. 22. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg

Vorträge

Bruns AF., Döring F., Grothe C., Claus P. (2004): Arginines show the way: molecular dissection of nuclear localisation sequences of fibroblast growth factor -2 (FGF-2). 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. Verh. der Anat. Ges. Suppl, Ann. Anat. Suppl. 187: 204.

Claus P., **Bruns AF.**, van Begeijk J., Grothe C. (2005): The number of nuclear bodies is regulated by competition between binding partners of the protein involved in spinal muscular atrophy. 22. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg.

Publikationen

Claus P., **Bruns AF.**, Grothe C. (2004): Fibroblast growth factor-223 is binding directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. Biochem J. 384: 559-565.