

**Das survival of motoneuron (SMN) Protein und axonales Wachstum –  
Bedeutung für die molekulare Pathologie der Spinalen Muskelatrophie**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

**- Dr. rer. nat. -**

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Jeroen van Bergeijk  
geboren am 09.03.1976 in Lindlar

2007

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Herbert Hildebrandt  
Zentrum Biochemie, Institut für Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Claus  
Zentrum Anatomie, Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 21. November 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2005 bis November 2007 unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Claus am Institut für Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule angefertigt.

Hierdurch erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfe herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 01.12.2007

Diese Arbeit ist  
meiner Familie  
gewidmet.

## Zusammenfassung

Die infantile Spinale Muskelatrophie ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die zur spezifischen Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark sowie Hirnstamm führt. Verursacht wird die Krankheit durch den Verlust oder die Mutationen des ubiquitär exprimierten *survival of motoneuron* (SMN)-1-Gens und die Reduktion des SMN-Proteinspiegels. Das SMN-Protein vermittelt die perinukleäre Assemblierung von spleißosomalen RNA-Proteinkomplexen (snRNPs) und ist an unterschiedlichen Prozessen im Zellkern beteiligt. Darüber hinaus mehren sich seit einigen Jahren Hinweise auf eine weitere, neue Funktion des SMN-Proteins in neuronalen Ausläufern.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des SMN-Proteins für das Auswachsen neuronaler Fortsätze in differenzierten PC12-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der SMN-Proteinspiegel einen direkten Einfluss auf das Neuritenwachstum hat. Durch den knock-down des endogenen oder die Überexpression des humanen SMN-Proteins konnte das Wachstum neuronaler Ausläufer entweder stimuliert oder gehemmt, aber nicht vollständig inhibiert werden. In einem *rescue*-Experiment wurde unter SMN knock-down Bedingungen demonstriert, dass der stimulierende Einfluß auf das Neuritenwachstum über den C-Terminus vermittelt wird. Diese Funktion ist damit vermutlich von einer SMN-Oligomerisierung sowie einer Interaktion mit verschiedenen snRNP/SMN-Komplex verbundener Proteine unabhängig, da essentielle Bindungsdomänen fehlen. Eine Co-Regulation der Genexpression von SMN und snRNP/SMN-Komplex-assoziiierter Bindungspartner während des NGF-vermittelten Neuritenwachstums konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der besonderen Bedeutung von Gemin2 für die Stabilisierung und Funktion des snRNP/SMN-Komplexes wurde der Einfluss des Gemin2-Proteinspiegels auf die Bildung von SMN-positiven Kernkörpern und das Wachstum neuronaler Fortsätze untersucht. Der Gemin2 knock-down führte in HEK293T-Zellen zu einer Abnahme an SMN-positiven Kernkörpern und entsprach damit den Beobachtungen an Fibroblasten aus SMA-Patienten. Während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen zeigte der Gemin2-Proteinspiegel jedoch einen zum SMN-Proteinspiegel antagonistischen Effekt auf das Neuritenwachstum. Die Daten machen deutlich, dass der Einfluss des SMN-Proteins auf Wachstum neuronaler Ausläufer von der Assemblierung spleißosomaler snRNPs unabhängig ist.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das SMN-Protein in einem Komplex mit Actin vorliegt und dass ein SMN knock-down zu einer Hyperstabilisierung des filamentösen Actins führt. Die Ergebnisse aus verschiedenen Arbeitsgruppen legen nahe, dass diese Störungen des dynamischen Actin-Ab- und Aufbaus die Ursache für die beobachtete Hemmung des Neuritenwachstums darstellt. Die Reduktion des SMN-Proteinspiegels führte zu Veränderungen im Phosphorylierungsmuster zweier Substrate der RhoA-bindenden Kinase (ROCK): Profilin2 ist ein Interaktionspartner des SMN-Proteins und zeigte eine Hyperphosphorylierung, während die Phosphorylierung der Lim-Kinase und dessen Substrats Cofilin abnahm. Beide Proteine sind komplementär am Ab- und Aufbau von Actin-Filamenten beteiligt. Die ROCK-Inhibition führte unter SMN knock-down Bedingungen in An- und Abwesenheit von NGF zu keiner funktionellen Wiederherstellung des Neuritenwachstums, so dass das SMN-Protein innerhalb der Signalkaskade unterhalb von RhoA-ROCK bzw. der anderen Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 liegen muss. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Beobachtung, dass der Aktivitätsverlust der RhoA-bindenden Kinase (ROCK) zu einer Degeneration von Motoneuronen führt, legen nahe, dass das SMN-Protein eine essentielle Funktion im Actin-Zytoskelett und in neuronalen Ausläufern ausübt.

**Schlagnworte: SMN, Actin, Neuriten**

## **Abstract**

Childhood spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal, recessive disorder leading to a specific degeneration of motoneurons in the spinal cord and brain stem. The disease is caused by loss or mutation of the survival of motoneuron 1 (SMN1) gene and consequential reduction of the SMN protein level. The SMN protein mediates the assembly of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) involved in splicing and participates in different processes within the nucleus. Furthermore, recent findings point to a new and additional function of the SMN protein in neurites.

In the present study the importance of the SMN protein for neurite outgrowth was analysed in differentiated PC12 cells. The SMN protein influenced directly growth of neuronal extensions. While overexpression of human SMN1 caused an increase, knock-down of the endogenous protein level led to a decrease but did not completely block neurite outgrowth. Under SMN knock-down conditions neurite outgrowth was rescued when the C-terminal domain was overexpressed indicating that the neurite growth promoting effect was mediated by the C-terminus of human SMN1. This function is probably independent of SMN oligomerization and binding to snRNP-assembly associated proteins due to the fact that essential binding domains are missing. Additionally, during NGF mediated neuronal differentiation of PC12 cells and neurite outgrowth, co-regulation of SMN and snRNP/SMN-associated proteins was not observed. Gemin2 plays an essential role for the stability of the SMN complex and its activity in snRNP assembly, therefore effects of the protein level of Gemin2 on neurite outgrowth and formation of SMN positive foci within the nucleus were analyzed. Gemin2 knock-down elicited a decline in number of SMN positive nuclear bodies in HEK293T cells similar to observations made in human fibroblasts derived from SMA type I patients. During neuronal differentiation of PC12 cells, alterations of the protein levels of gemin2 and SMN revealed antagonistic effects on neurite outgrowth. These findings indicate that the SMN-protein influences neurite outgrowth independently of its function in snRNP assembly.

In this work the existence of a new Actin/SMN-Komplex has been presented. Knock-down of the endogenous SMN-Protein level caused a hyperstabilization of filamentous Actin. Recently other groups proved that this impairment of Actin dynamics causes reduced neurite outgrowth. SMN knock-down induced a change in the phosphorylation pattern of two substrates of the RhoA binding kinase (ROCK): Profilin2 is able to bind directly to SMN and was hyperphosphorylated, while phosphorylation of Lim kinase and its substrate Cofilin decreased. Both proteins act complementarily on actin polymerization and depolymerization. Independent of nerve growth factor (NGF), inhibition of ROCK was not sufficient to restore neurite outgrowth under SMN knock down conditions indicating that SMN acts downstream of RhoA-ROCK or Rac1 and Cdc42 GTPase signalling. The outcomes of this study and the results of other groups, showing that loss of ROCK activity led to degeneration of spinal cord motoneurons, point to an important function of the SMN protein within the actin cytoskeleton and for neurite outgrowth.

**Key words: SMN, actin, neurites**

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die infantile Spinale Muskelatrophie (SMA)	1
1.2	Lokalisation des SMN-Proteins	4
1.3	Das SMN-Protein als Interaktionsplattform	6
1.4	Nukleozentrische vs. axonale Funktion des SMN Proteins	10
1.5	Das SMN Protein und das Zytoskelett	13
1.6	Regulation des Actin-Zytoskeletts	15
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Zellkultur	19
3.1.1	Kultivierung von PC12-Zellen	19
3.1.2	Differenzierung von PC12-Zellen	19
3.1.3	Kultivierung von HEK293T-Zellen	20
3.1.4	Kultivierung von primären Fibroblasten aus Patienten	21
3.1.5	Kryokonservierung von Vertebraten Zellen	21
3.2	Plasmide und Bakterienkultur	21
3.2.1	Aufbau der Plasmide	21
3.2.2	Darstellung von SMN-3xFlag-Fusionskonstrukten	22
3.2.3	Design der siRNA und shRNA	23
3.2.4	Erzeugung kompetenter <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) Zellen	24
3.2.5	Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen	24
3.2.6	Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	24
3.2.7	Proteinextraktion aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)	25
3.2.8	DNA-Konzentrationsbestimmung	26
3.2.9	DNA-Fällung	26
3.3	Transfektion von Vertebraten-Zellen	26
3.3.1	Transfektion mit Metafectene <sup>®</sup> und Lipofectamine 2000 <sup>®</sup>	26
3.3.2	Transfektion mit Polyethylenimin	27
3.3.3	Elektroporation	27
3.4	Immunzytochemie	27
3.4.1	Fixierung von Zellen	28
3.4.2	Immunzytochemische Markierung	28
3.4.3	Bildverarbeitung	28
3.5	Proteinchemie	29
3.5.1	Proteinextraktion aus Zellkulturen zur Untersuchung der Genexpression	29
3.5.2	Proteinbestimmung	29
3.5.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.5.4	2D-Gelelektrophorese	30
3.5.5	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	31
3.5.6	Westernblot	31
3.5.7	Densitometrie der Signale auf dem Röntgenfilm	32

3.6	Molekularbiologische und funktionelle Assays	32
3.6.1	Co-Immunpräzipitation	32
3.6.2	Pull-down von Actin mit dem Fusionsprotein SMN1-294-GST	33
3.6.3	G- / F-Actin Assay	33
3.6.4	Bestimmung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen unter verschiedenen Stimuli	34
3.6.5	Bestimmung der Anzahl SMN-positiver Kernkörperchen	34
3.7	Statistische Auswertung:	34
3.8	Antikörper	35
3.9	Chemikalien	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1	Veränderung der Genexpression von SMN und assoziierten Proteinen während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen	38
4.2	SMN knock-down führt zu vermindertem Wachstum neuronaler Ausläufer in PC12-Zellen	39
4.3	Lokalisation verschiedener SMN-Deletionsmutanten in PC12-Zellen	42
4.4	Überexpression einer C-terminalen SMN-Deletionsmutante unter SMN knock-down Bedingungen führt zu einer funktionellen Wiederherstellung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen	44
4.5	Die Veränderung des Gemin2-Proteinspiegels zeigen im Vergleich mit SMN antagonistische Effekte auf das Neuritenwachstum in PC12-Zellen	46
4.6	Gemin2 knock-down führt zu einer Abnahme von SMN-positiven Kernkörpern in HEK293T-Zellen	48
4.7	Das SMN-Protein interagiert mit dem Actin-Zytoskelett	50
4.7.1	SMN co-lokalisiert mit G-Actin in Lamellipodien von humanen Fibroblasten und in Wachstumskegeln von PC12-Zellen	50
4.7.2	Die Interaktion von SMN mit Actin erfolgt <i>in vivo</i> nicht über den C-Terminus	52
4.7.3	Das SMN-Protein bindet <i>in vitro</i> direkt an Actin	54
4.7.4	SMN knock-down führt zu einer Veränderung des G- zu F-Actin Verhältnisses in neuronal differenzierten PC12-Zellen	54
4.7.5	In humanen Fibroblasten aus SMA-I Patienten ist das G- zu F-Actin Verhältnis nicht verändert	57
4.7.6	SMN knock-down führt zu Hypophosphorylierung der Lim-Kinase und deren Substrat Cofilin in neuronal differenzierten PC12-Zellen	59
4.7.7	Reduktion des SMN-Proteinspiegels während der neuronalen Differenzierung führt in PC12-Zellen zu einer Hyperphosphorylierung von Profilin2	61
4.7.8	Keine funktionelle Wiederherstellung des Neuritenwachstums durch ROCK Inhibition unter SMN knock-down Bedingungen in PC12-Zellen	63
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1	Das SMN-Protein und Wachstum neuronaler Ausläufer	66
5.2	Das SMN-Protein und Gemin2 zeigen einen gegensätzlichen Einfluss auf das Neuritenwachstum und eine Synergie bei der Assemblierung von Kernkörpern	68
5.3	Das SMN-Protein interagiert mit dem Actin-Zytoskelett	70

5.4	Die RhoA-bindende Kinase-II (ROCK-II) und das SMN-Protein	73
5.5	Das SMN-Protein befindet sich in der Signalkaskade unterhalb von RhoA-ROCK	77
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Schriftenverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
a-SMN	axonale SMN-Isoform
AS-Reste	Aminosäure-Reste
ATP	Adenosintriphosphat
B16F1	Melanomzelllinie (Haut) aus der Maus
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
bp	base pairs, Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
C3	C3 Toxin aus <i>Clostridium botulinum</i>
Cdc42	cell division cycle 42
COS	Primatenzelllinie, <i>Cercopithecus aethiops</i> (grüne Meerkatze)
CP	Capping protein
DAPI	4',6-Diaminphenylindol
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	dorsal root ganglia, Spinalganglienzellen
DsRed2	rot-fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma striata</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM-Gel	extracellular matrix gel, syn. Matrigel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraacetat
EPSC	excitatory postsynaptic current (erregender postsynaptischer Stromfluss)
EVL	Ena/VASP like protein
Ex	Exon
F-Actin	filamentöses Actin
FMRP	fragile X mental retardation protein
G-Actin	globuläres Actin
GAP	GTPase activating protein
GAP43	growth associated protein 43
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GluR	Glutamatrezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

H-1152	ROCK-Inhibitor
HEK293T	Derivat der humanen HEK293-Zelllinie (human embryonic kidney cells)
HeLa	Humane Epithelzelllinie
hnRNP	heterogenous ribonucleoprotein
HSP90	heat shock protein 90
IBB	Importin- $\beta$ binding domain
ICC	Immunzytochemie
IP	Immunpräzipitation
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IQ	Intelligenz-Quotient
$K_i$	Inhibitorische Konstante
LB	Lauria broth
LimK <sup>5</sup>	LimK-Deletionsmutante in <i>Drosophila melanogaster</i>
Lim-Kinase	Lin11-Isl1-Mec3-Kinase
LSm-Protein	like Sm -Protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mDia	mammalian homolog of <i>Drosophila</i> diaphanous
MIM	Mendelian Inheritance in Man, Datenbanksystem
MLC	Myosin light chain
MLP	Myosin light chain phosphatase
mRNA	Boten-RNA, messenger RNA
mRNP	messenger ribonucleoprotein
MTLn3	metastasierende Brustkrebs-Zelllinie aus der Ratte
N1E115	Neuroblastoma-Zelllinie aus der Maus
NES	nukleäres Exportsignal
NF	Neurofilament
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NIH-3T3	Fibroblastenzelllinie aus der Maus
NSC34	Motoneuronenzelllinie aus der Maus
OD	Optische Dichte (bei einer bestimmten Wellenlänge)
p75	Neurotrophin-Rezeptor für NGF
PABP	poly(A) binding protein
PAK	p21 activated kinase
PBS	physiolog. Kochsalzlösung, phosphate buffered saline
PC12	Phaechromocytoma cells, Nebennierenmarktumor-Zelllinie aus der Ratte
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenamin
PFA	Paraformaldehyd
PFN1 / 2	Profilin1 / Profilin2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PKC	Proteinkinase-C
PKN	Proteinkinase-N
PLL	Poly-L-Lysin
PLO	Poly-L-Ornithin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRMT5	Proteinmethyltransferase-5
pSupp.control	pSuppressor-Vektor ohne Insert
pSupp.SMN	pSuppressor-Vektor kodiert eine gegen SMN mRNA gerichtete shRNA
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras-homologous member A
RhoA DN	Dominant-negative RhoA-GTPase
Rho-K DN	Dominant-negative RhoA-bindende Kinase
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	RhoA-bindende Kinase
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcen Zentrum für Genomforschung
S2	Schneider-2-Zelllinie aus Drosophila melanogaster
S3A-Cofilin	dominant-aktives Cofilin
S3E-Cofilin	dominant-negatives Cofilin
scaRNP	spezielle snoRNPs in Cajal-Körpern
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SMA	infantile Spinale Muskelatrophie
SMN	suviual of motoneuron (Protein/Gen)
SMN <sup>C</sup>	centromeres SMN (SMN2)
SMN <sup>T</sup>	telomeres SMN (SMN1)
SMNΔ7	SMN-Deletionsmutante bestehend aus den Aminosäure-Resten 1-278
Sm-Protein	Smith-Antigen Protein
snoRNA	small nucleolar RNA
snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SPN1	Snurportin1
syn.	Synonym
TBST	Tris-gepufferte physiolog. Kochsalzlösung mit Detergenz Triton-X-100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGS1	Trimethylguanosin-Synthase 1
TMG-, m <sub>3</sub> - (CAP)	Trimethylguanosin-Rest am 5' einer RNA
TrkA	Rezeptortyrosinkinase für NGF

UsnRNP	uridine-rich small nucleolar ribonucleoprotein
v/v	volume per volume
V14-RhoA	dominant-aktive RhoA-GTPase
VASP	Vasodilator stimulated phosphoprotein
w/v	weight per volume
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	WASP-family Verprolin-homologous protein
WB	Westernblot
WD-Wiederholungen	Tryptophan-Asparaginsäure-Wiederholungen
wt / mt	Wildtyp- oder mutierte Form eines Proteins, z.B. LimK <sup>wt</sup> oder LimK <sup>mt</sup>
x g	Erdbeschleunigung
Y27632	ROCK-Inhibitor
YG-Box	Tyrosin-Glycin-reiche Sequenz
Δ27SMN	SMN-Deletionsmutante bestehend aus den Aminosäure-Resten 28-294

## 1 Einleitung

Die Spinalen Muskelatrophien stellen eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen dar. Das Absterben von Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks wird begleitet von einer Atrophie der Muskulatur des Rumpfes und der proximalen bzw. distalen Gliedmaßen (Morrison und Harding 1994). Die Krankheiten haben unterschiedliche genetische Ursachen und folgen einem autosomal rezessiven (infantile Spinale Muskelatrophie, (Hoffmann 1893; Lefebvre et al. 1995)), autosomal dominanten (distale Spinale Muskelatrophie, (Meadows und Marsden 1969; van der Vleuten et al. 1998)) oder X-chromosomalen Erbgang (Kennedy's Disease, (La Spada et al. 1991)). Ebenso unterscheiden sich die Spinalen Atrophien im Alter der Patienten mit ersten Manifestationen von Symptomen (Pearn 1980; Morrison und Harding 1994). Der infantilen Spinalen Muskelatrophie kommt die größte Bedeutung zu, da sie bei Zentraleuropäern nach Mukoviszidose die häufigste Todesursache bei autosomal rezessiven Erkrankungen darstellt (Pearn 1973; Wirth 2000).

### 1.1 Die infantile Spinale Muskelatrophie (SMA)

Die infantile Spinale Muskelatrophie (*childhood spinal muscular atrophy*, SMA) wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts durch die Neurologen Guido Werdnig (1844-1919) und Johann Hoffman (1857-1919) beschrieben (Werdnig 1891; Hoffmann 1893, 1897, 1900a, 1900b). Bereits damals wurden aufgrund der Pathogenese und histochemischer Befunde die Degeneration und verminderte Größe von Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks dokumentiert (s. Abb. 1) (Batten und Holmes 1912). Spätere Arbeiten zeigten, dass es auch zur Degeneration von Motoneuronen im unteren Hirnstamm kommt (Crawford und Pardo 1996). Zusätzlich beobachtet man eine Atrophie der Muskulatur und zum Teil Hypertrophie der verbliebenen Muskelfasern (Batten und Holmes 1912; Buchthal und Olsen 1970). Der Verlust von motorischen Einheiten erfolgt symmetrisch und führt zu Hypotonie („*floppy infant*“). Dabei wird eine verstärkte Lähmung der proximalen verglichen mit der distalen Rumpf- und Extremitätenmuskulatur beobachtet (Batten und Holmes 1912; Dubowitz 1999; Hirtz et al. 2005). Bei der schwersten Form der Erkrankung kommt es aufgrund eingeschränkter Atmungsfunktion und Atmungslähmung zum Tod des Patienten (Zerres und Rudnik-Schoneborn 1995). Es ist derzeit noch unklar, wie die Degeneration der Motoneurone sowie Denervation der Muskelfasern und die Atrophie der beteiligten Muskeln zeitlich zusammenhängt (Munsat 1991; Crawford und Pardo 1996). Die Ergebnisse aus verschiedenen Tiermodellen deuten darauf hin, dass es zunächst zu der Degeneration der Axone und Muskelendplatten kommt, auf die ein Absterben der Zellkörper und eine Atrophie der Muskelfasern folgt (Frugier et al. 2000; Cifuentes-Diaz et al. 2001; Cifuentes-Diaz et al. 2002).

Die infantile Spinale Muskelatrophie wird nach Genotypisierung (Lefebvre et al. 1995) in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung, des Alters und dem Todeszeitpunkt in vier Formen unterschieden (Pearn 1980; Munsat 1991; Munsat und Davies 1992; Zerres und Rudnik-Schoneborn 1995). Patienten des SMA-Typ I (syn. Werdnig-Hoffmann Syndrom; *Mendelian Inheritance in Man* (MIM) #253300) zeigen die schwerste Form der neurodegenerativen Erkrankung und Symptome treten innerhalb der ersten sechs Monate auf (s. Abb. 1, A) (Morrison und Harding 1994). Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt 7 Monate (Pearn und Wilson 1973; Pearn 1980). Der Tod

tritt innerhalb von zwei Jahren häufig aufgrund respiratorischer Insuffizienz ein (Morrison und Harding 1994). Charakteristisch für das Werdnig-Hoffmann Syndrom ist die durch Hypotonie bedingte Unfähigkeit der Kinder zu sitzen oder zu stehen (Munsat 1991). Darüber hinaus wird der SMA-Typ 0 diskutiert, der bereits pränatal zu reduzierten fötalen Bewegungen führt (Dubowitz 1999). Hypotonie, sekundäre Atemwegsinfektionen sowie Atemversagen führen innerhalb der ersten drei Monate zum Tod (MacLeod et al. 1999). Im Gegensatz zu Typ I sind Patienten des Typs II (MIM #253550) in der Lage zu sitzen und zu krabbeln, erlangen jedoch nie die Fertigkeit ohne Hilfsmittel zu stehen oder zu gehen (Morrison und Harding 1994). Die Symptome entwickeln sich während der ersten 18 Monate (Munsat 1991). Der Verlauf der Erkrankung und die Lebenserwartung hängen auch hier von der Beteiligung der Atemmuskulatur ab (Morrison und Harding 1994). Die mildeste Form der infantilen Spinalen Muskelatrophie wird als Typ III oder Kugelberg-Welander-Krankheit bezeichnet (MIM #253400) (Kugelberg und Welander 1956). Erste Symptome treten frühestens 18 Monate nach der Geburt bzw. bis zum 18. Geburtstag auf (Pearn et al. 1978; Munsat 1991). Die Patienten sind zunächst in der Lage zu gehen und entwickeln erst mit dem Fortschreiten der Erkrankung eine proximale Muskelschwäche. Die Patienten haben eine normale Lebenserwartung, wobei die Wahrscheinlichkeit für die Notwendigkeit ambulanter Hilfe in einem Alter zwischen 20 und 40 Jahren deutlich zunimmt (Zerres und Rudnik-Schoneborn 1995). Typ IV (MIM #271150) stellt eine wenig charakterisierte Sonderform der Kugelberg-Welander-Krankheit dar, bei der die ersten Symptome zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr eintreten (adulte SMA) (Zerres und Rudnik-Schoneborn 1995). Sie wurde in Einzelfällen durch Genotypisierung der infantilen SMA zugeordnet, kann darüber hinaus jedoch mit weiteren Deletionen auf dem Chromosomenabschnitt 5q assoziiert sein (Zerres et al. 1997).

Epidemiologische Studien zeigen für die infantilen SMA eine Inzidenz von ca. 1 auf ca. 6000 Lebendgeburten (Deutschland: 1/10202 für SMA-Typ I (Thieme et al. 1993) und 1/9240 für Typ II und Typ III (Thieme et al. 1994), Island: 1/7299 Lebendgeburten (Ludvigsson et al. 1999), Frankreich: 1/4624 (Cusin et al. 2003)). Ursache für die monogenetische Erkrankung sind Deletion bzw. Mutation des *survival of motoneuron* (SMN) Gens (Lefebvre et al. 1995). Dieses ist während der Evolution stark konserviert geblieben und konnte unter anderem in der Spalthefe (*Schizosaccharomyces pombe*) (Owen et al. 2000), dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Miguel-Aliaga et al. 1999), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (Miguel-Aliaga et al. 2000), in Zebrafischen (*Danio rerio*) (Huntriss et al. 1994) und der Maus (*Mus musculus*) (DiDonato et al. 1997) nachgewiesen werden. Das humane SMN-Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 5q13 in je einer telomeren und centromeren Kopie vor (SMN1 bzw. SMN<sup>T</sup> und SMN2 bzw. SMN<sup>C</sup>) (Lefebvre et al. 1995). Es besteht aus neun Exons (Ex1, Ex2a, Ex2b, Ex3-Ex8) mit einem Stop-Codon am Ende von Exon 7 (Burglen et al. 1996) und kodiert ein ca. 38 kDa großes Protein bestehend aus 294 Aminosäure-Resten (Lefebvre et al. 1995; Liu und Dreyfuss 1996). Bei 96 % der SMA-Typ I, 94 % der SMA-Typ II und 86 % der Typ III Patienten kann die Deletion des SMN1-Gens (SMN<sup>T</sup>) beobachtet werden (Wirth 2000). Patienten, die das telomere SMN-Gen noch besitzen, zeigen besonders in einem durch Exon 6 und 7 kodierten Bereich Punktmutationen (P245L, Ex6 (Rochette et al. 1997); S261I, Ex6 (Hahnen et al. 1997); T274I, Ex6 (Hahnen et al. 1997); G275S, Ex6 und G279C, Ex7 (Wang et al. 1998)). Der

A<sup>848</sup> → G (Y272C) (Lefebvre et al. 1995) sowie der G<sup>869</sup> → T (G279V) Nukleotidaustausch in Exon 6 bzw. 7 führen in Patienten zum schweren SMA-Typ I (Talbot et al. 1997).

Das telomere SMN1-Gen ist zu 99 % identisch mit dem centromeren SMN2-Gen und unterscheidet sich im Austausch von fünf Nukleotiden (Monani et al. 1999). Nur der C<sup>840</sup> → T Nukleotidaustausch liegt im kodierenden Bereich und führt bei 90 % der Vorläufer-SMN2-mRNAs zu einem alternativen Spleiß-Ereignis und zum Verlust des Exons 7 im SMN2-Genprodukt (SMN2Δ7: Ex1-Ex6 + Ex8) (Lorson et al. 1999; Lorson und Androphy 2000). Das translatierte SMN2Δ7-Protein zeigt Defekte bei der Dimerisierung und besitzt eine verkürzte Halbwertszeit (Lorson et al. 1998; Lorson und Androphy 2000). Lediglich 10 % der SMN2-prä-mRNA wird zum Wildtyp-SMN-Protein (SMN<sup>wt</sup>-Protein) translatiert (Lorson und Androphy 2000). Der Schweregrad der infantilen Spinalen Muskelatrophie steht in direkter Korrelation zum SMN-Proteinspiegel (Lefebvre et al. 1997). Der vollständige SMN Verlust ist im Maus-Modell embryonal letal (Monani et al. 2000). Die Deletion des SMN1-Gens kann im Menschen jedoch über eine erhöhte Anzahl an SMN2-Genen und den jeweils 10 % verbleibenden, funktionalen SMN2-Genprodukten teilweise kompensiert werden (s. Abb. 1, C) (Campbell et al. 1997; Harada et al. 2002). In den SMA-Formen von Typ II und III beobachtet man neben der Deletion des SMN1-Gens auch eine Konversion von SMN1 zu SMN2, die aufgrund des erhöhten SMN2 Spiegels zu einem milderen Krankheitsverlauf führen (Burghes 1997).

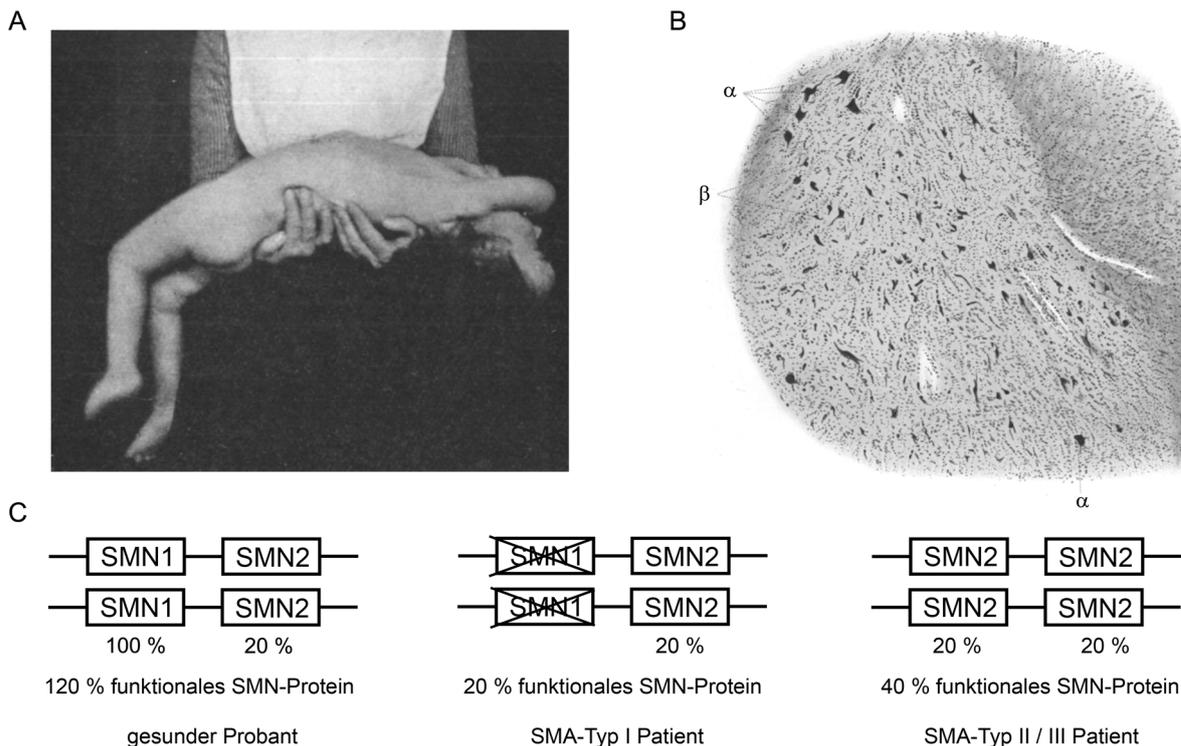


Abb. 1 Pathologie der infantilen Spinalen Muskelatrophie. (A) Photographie eines Kindes mit diagnostizierter infantiler SMA (Batten und Holmes 1912). Die Muskelschwäche in der Nackenmuskulatur und den Extremitäten führt beim Patienten zur Unfähigkeit den Kopf zu heben oder die Füße zu beugen. (B) Darstellung des Vorderhorns eines SMA-Patienten (vermutlich Typ I), übernommen aus den Beschreibung der infantilen SMA durch Hoffmann von 1893. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Degeneration von Motoneuronen im Vorderhorn an einem Querschnitt des Rückenmarks nach Nissl-Färbung beschrieben. Die mit „α“ gekennzeichneten Neurone zeigen einen normalen Phänotyp, während die übrigen, z.T. mit „β“ markierten atrophisch bzw. degeneriert sind (Hoffmann 1893). (C) Der Genotyp lässt direkte Schlüsse auf einen zu erwartenden Phänotyp zu. Im Gesunden liegen beide SMN-Gene vor und ausreichend funktionales SMN-Protein wird über die SMN1-Gene synthetisiert. Bei SMA-Typ I Patienten ist das SMN1-Gen homozygot deletiert und jeweils ca. 10 % der SMN2-Genprodukte münden in funktionalem Protein. Bei der SMA-Typ II oder Typ III liegen mehrere SMN2-Genkopien vor, die z.T. durch Konversion aus SMN1 zu SMN2 entstanden sind. Da jede SMN2-Genkopie zu 10 % funktionalem SMN-Protein führt, wird der durch Verlust der beiden SMN1-Gene induzierte degenerative Effekt teilweise kompensiert.

## 1.2 Lokalisation des SMN-Proteins

Bei der infantilen Spinalen Muskelatrophie kommt es zur spezifischen Degeneration von Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. Verursacht wird die Erkrankung durch einen reduzierten SMN-Proteinspiegel (Lefebvre et al. 1995). Das humane SMN-Protein kann in neuronalem (Gehirn und Rückenmark) und nicht-neuronalem Gewebe wie Skelettmuskulatur, Herzmuskel, Lunge, Milz, Niere und Leber nachgewiesen werden (Coovert et al. 1997; Novelli et al. 1997). *In situ* Hybridisierungen und immunzytochemische Markierungen an zervikalen Rückenmarksquerschnitten zeigen SMN mRNA und Protein im dorsalen und insbesondere im ventralen Horn in Laminae IX Motoneuronen der Ratte (Battaglia et al. 1997). Im Gehirn wurde die Anwesenheit des SMN-Proteins im Hippocampus speziell im Stratum granulosum und in der Cornu ammonis (CA1-CA3) des Gyrus dentatus beschrieben (Battaglia et al. 1997; Bechade et al. 1999). Die Ergebnisse konnten an entsprechendem Gewebe aus Primaten (*Macaca nemestrina*) bestätigt werden (Battaglia et al. 1997). Darüber hinaus kann das SMN-Protein im Hirnstamm u.a. in motorischen und sensorischen Kernen, im cerebralen Cortex und in verschiedenen Bereichen des Cerebellums der Ratte nachgewiesen werden (Bechade et al. 1999). Ergebnisse aus immunhistochemischen Untersuchungen an Rückenmarksquerschnitten menschlicher Föten belegen eine SMN-Genexpression in embryonalen Motoneuronen des Vorderhorns ab der 13. Woche. Darüber hinaus kann die SMN mRNA von der 16. Woche an im Globus pallidus (motorischer Kern) und in unterschiedlichen Thalamus-Kernen sowie ab der 18. Woche im Hippocampus beobachtet werden (Briese et al. 2006). Beim Vergleich von Rückenmarksquerschnitten aus neugeborenen und ausgewachsenen Ratten zeigt sich im Vorderhorn eine deutliche Abnahme der SMN-Immunreaktivität (Battaglia et al. 1997). Immunzytochemische Untersuchungen an Rückenmarksgewebe aus der Ratte und dem Vorderhirn des Huhns bestätigen eine erhöhte SMN-Genexpression während der Embryogenese, die postnatal auf ein basales Niveau absinkt (Zhang et al. 2003). Die Veränderung der Genexpression ist dabei gewebespezifisch und richtet sich nach dem jeweiligen Entwicklungsstand des Organs (Gabanella et al. 2005). Auch in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) ist eine erhöhte SMN-Genexpression während der Embryogenese, die in späteren Entwicklungsstadien zurückgeht, beschrieben worden (Rajendra et al. 2007).

Die genetisch bedingte Reduktion des SMN-Proteinspiegels in SMA-Patienten ist nicht auf das zentrale Nervensystem bzw. Rückenmark beschränkt, sondern kann auch in Zellen aus der Leber beobachtet werden (Lefebvre et al. 1997). Trotz einer ubiquitären SMN-Genexpression in unterschiedlichen Zelltypen im Körper werden Defekte zuerst und primär bei Motoneuronen und an der Muskelendplatte beobachtet, wie an verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden konnte (Hsieh-Li et al. 2000; Monani et al. 2000; Cifuentes-Diaz et al. 2002; McWhorter et al. 2003). Der SMN knock-down führt in der Embryogenese des Zebrafisches zu degenerierten Motoneuronen, die eine verstärkte Verzweigung aufweisen (McWhorter et al. 2003). Die Defekte treten nicht bei sensorischen Neuronen auf und sind Motoneuron-spezifisch. Eine Störung der Muskelentwicklung ist nicht beobachtet worden (McWhorter et al. 2003). Im *Drosophila*-Modell verursacht die Reduktion des SMN-Proteinspiegels eine Sprung- und Flugunfähigkeit. Auslöser hierfür ist die Abnahme der Motoneuronen-Anzahl und eine fehlerhafte Ansteuerung der Muskeln, die von einer Degeneration der indirekten Flugmuskulatur am Thorax begleitet wird (Rajendra et al. 2007). In einem SMA-Typ I

Mausmodell mit einem knock-out des murinen SMN-Gens und der transgenen Expression des humanen SMN2-Gens (SMN<sup>-/-</sup>; SMN2) kommt es drei bis fünf Tage nach der Geburt (P3 – P5) zu einem Rückgang der Anzahl an Motoneuronen im Lumbalmark (L1-L6) um 35 % verglichen mit den Kontrolltieren (Monani et al. 2000). Die Lebenserwartung beträgt durchschnittlich 10 Tage (Hsieh-Li et al. 2000). Die Tiere sind deutlich kleiner und aufgrund von Hypotonie und peripherer Lähmung nicht in der Lage sich aufzurichten (Monani et al. 2000). In der Histologie zeigen sich atrophische und hypertrophierte Muskelfasern ähnlich wie bei SMA-Patienten (Hsieh-Li et al. 2000). Zum Zeitpunkt P5 kann keine Veränderung in der Überlebensrate von sensorischen Neuronen aus den dorsalen Spinalganglien (L5) beobachtet werden (Jablonka et al. 2006). In Kultur genommene Spinalganglienzellen (*dorsal root ganglia*) zeigen aber im Vergleich zu Kontrollzellen eine verkürzte Neuritenlänge und kleinere Wachstumskegel (Jablonka et al. 2006). Dies entspricht den Beobachtungen an kultivierten embryonalen Motoneuronen aus SMN<sup>-/-</sup>;SMN2-Mäusen, die ebenfalls ein reduziertes axonales Wachstum und Wachstumskegel mit verminderter Oberfläche zeigen (Rossoll et al. 2003). In einem Cre-loxP-Mausmodell, bei dem es zur spezifischen Expression von SMNΔ7 im Muskel kommt, kann eine Lähmung und Dystrophie der Muskulatur ohne Beteiligung von Motoneuronen beobachtet werden (Cifuentes-Diaz et al. 2001). In einem ähnlichen Mausmodell, bei dem SMNΔ7-Expression auf die Leber beschränkt ist, werden Defekte in der Organentwicklung und eine deutliche Reduktion der Hepatozytenanzahl beschrieben (Vitte et al. 2004). Das Expressionsprofil von SMN und die verschiedenen Ergebnisse legen nahe, dass die mit der SMA assoziierten Deletionen im SMN-Gen auch in anderen Zelltypen zu Fehlentwicklungen führen, die Konsequenzen für Motoneurone aber besonders dramatisch sind.

Das SMN-Protein lokalisiert intrazellulär in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma und Nukleus (Liu und Dreyfuss 1996; Coover et al. 1997). In neuronalen Zellen sind darüber hinaus SMN-positive Strukturen in neuronalen Ausläufern von P19-Teratocarcinoma-Zellen (Fan und Simard 2002) sowie in Axonen und Wachstumskegeln von Vorderhirnneuronen aus dem Huhn (Zhang et al. 2003), Rückenmarksneuronen aus der Ratte (Zhang et al. 2003) und embryonalen Motoneuronen aus der Maus nachgewiesen wurden (Rossoll et al. 2003). Im Kern zeigt SMN eine dynamische Verteilung in zwei unterschiedlichen Kompartimenten die als Cajal-Körper und *Gemini of Cajal bodies* bzw. Gems bezeichnet werden (Liu und Dreyfuss 1996; Dundr et al. 2004). Cajal Körper wurden Anfang des 20. Jahrhunderts durch Ramón y Cajal beschrieben (Ramón y Cajal 1903), zeigen einen Durchmesser von 0,1 – 1 µm und sind u.a. an der Prozessierung von spleißosomalen snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) und snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoproteins*) beteiligt (Dundr und Misteli 2001; Cioce und Lamond 2005). Gems besitzen eine ähnliche Größe wie Cajal-Körper (Liu und Dreyfuss 1996), die genaue Funktion ist aber noch unklar. Die Reduktion des SMN-Proteinspiegels bei Fibroblasten aus SMA-Patienten führt zu einer Abnahme an SMN-positiven Kernkörpern (*nuclear bodies*) (Coover et al. 1997). Dabei konnte eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern und dem Schweregrad der Erkrankung beobachtet werden. Bei einem RNA-Interferenz vermittelten SMN knock-down in einer humanen Epithelzelllinie (HeLa-Zellen) konnte darüber hinaus die gestörte Bildung von Cajal-Körper nachgewiesen werden (Girard et al. 2006).

### 1.3 Das SMN-Protein als Interaktionsplattform

Das SMN-Protein ist in der Lage, über zwei unabhängige Selbstassoziationsdomänen Dimere bzw. Oligomere zu bilden. N-terminal wird die Region durch Exon 2b (Aminosäure-(AS)-Reste 51-90) (Young et al. 2000), C-terminal durch Exon 6 kodiert (AS-Reste 240-277) (Lorson et al. 1998). Innerhalb des durch Exon 2b kodierten Bereichs liegt eine basische Lysin-reiche Region (AS-Reste 71-83). C-terminal findet sich darüber hinaus im Bereich der Aminosäure-Reste 269-281 (Exon 6 und Exon 7) eine Abfolge von Tyrosin-Glycin-Resten, die als YG-Box bezeichnet wird (Talbot et al. 1997). Eine Prolin-reiche Sequenz wird durch die Exone 4 bis 6 kodiert (AS-Reste AS-Reste: 194-248) (Giesemann et al. 1999). Zusätzlich besitzt das SMN-Protein eine evolutionär konservierte Tudor-Domäne im Bereich der Aminosäuren-Reste 91-144, die ursprünglich in *Drosophila* identifiziert wurde (Ponting 1997; Buhler et al. 1999).

Für das *survival of motoneuron* Protein wurden zahlreiche direkte und indirekte Interaktionspartner seit der Identifikation beschrieben (Lefebvre et al. 1995; Wirth et al. 2006). Dabei können die Komponenten der Kernstruktur des zytoplasmatischen SMN-Komplexes von potentiellen Substraten und verschiedenen viralen Proteinen unterschieden werden. Gemin2 bis 8 sowie Unrip stellen integrale Bestandteile des Multimers dar und bilden eine Plattform für die Assemblierung von RNA-Proteinkomplexen und speziell der spleißosomalen snRNPs (Pellizzoni et al. 1998; Otter et al. 2007). Die Gemin2-Bindung wurde im N-Terminus des SMN-Proteins in zwei unterschiedlichen Regionen (AS-Reste 13-44 (Liu et al. 1997) bzw. 52-91 (Young et al. 2000)) kartiert, von der eine mit der durch Exon 2b kodierten SMN-Selbstbindungsdomäne überlappt. Gemin2 (syn. SIP1, *SMN interacting protein 1*) ist für die Assemblierung und Stabilität des snRNP/SMN-Komplexes von großer Bedeutung (Fischer et al. 1997; Ogawa et al. 2007).

Gemin3 (syn. DP103) besitzt eine der DEAD-Box RNA-Helikase ähnliches Motiv aus dem humanen eukaryontischen Initiationsfaktor 4A-II (eIF4A-II) und bindet über den C-Terminus an SMN (Charroux et al. 1999). Darüber hinaus wurde Gemin3 kürzlich in einem Komplex mit FMRP (*fragile X mental retardation protein*) und anderen Proteinen identifiziert, die am Aufbau von RISC (*RNA induced silencing complex*) bei der RNA Interferenz beteiligt sind (Caudy et al. 2002; Murashov et al. 2007). Möglicherweise ist der Komplex an der Regulation axonaler mRNA Translation beteiligt (Willis et al. 2005; Murashov et al. 2007). Die bei SMA-Typ I Patienten beobachtete Punktmutation Y272C bzw. Deletion des Exon 7 kodierten Bereichs (SMN $\Delta$ 7) führt zu einer Abnahme bzw. Inhibition der Gemin3 Bindung (Charroux et al. 1999).

Gemin4 assoziiert über Gemin3 indirekt mit SMN (Charroux et al. 2000). Dabei wird vermutet, dass es sich um einen essentiellen Co-Faktor für die mögliche ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität von Gemin3 handelt (Meister et al. 2000). Eine ATPase-Aktivität konnte lediglich bei der Co-Immunpräzipitation von Gemin4 detektiert werden, während rekombinant in Insektenzellen synthetisiertes Gemin3 enzymatisch inaktiv war (Grundhoff et al. 1999). Zusätzlich assoziiert das SMN-Protein über Gemin4 mit Galectin-1 und Galectin-3 (Park et al. 2001). Beide Proteine sind mit dem Spleißosom assoziiert und an der Prozessierung von prä-mRNA beteiligt (Liu et al. 2002). Die kompetitive Verdrängung von Galectin-1 und Galectin-3 führt zur Arretierung des spleißosomalen Zyklus.

Gemin5 (syn. p175) ist ein weiterer Interaktionspartner des SMN-Proteins (Gubitz et al. 2002). Ursprünglich wurde eine direkte Bindung *in vivo* durch Immunpräzipitation und *in vitro* mit rekombinantem Protein beschrieben (Gubitz et al. 2002), wobei neuere Arbeiten über pull-down und Yeast-Two-Hybrid Suche eine indirekte Assoziation von Gemin5 über Gemin2 postulieren (Otter et al. 2007). Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass Gemin5 die Bindung von spezifischen snRNAs an den SMN-Komplex für die Bildung Uridin-reicher snRNPs (UsnRNPs) vermittelt (Battle et al. 2006; Otter et al. 2007). Darüber hinaus bindet Gemin5 direkt an den eukaryontischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E), der über Assoziation mit der mRNA-CAP-Struktur an der Ausbildung der Translationsinitiationsmaschinerie beteiligt ist (Fierro-Monti et al. 2006).

Gemin6, Gemin7, Gemin8 und Unrip bilden einen eigenen Komplex (Carissimi et al. 2006), dessen Bindung an SMN entweder über Gemin7 (Baccon et al. 2002) oder Gemin8 (Otter et al. 2007) vermittelt wird. Die Interaktion von Gemin7 und SMN erfolgt über den C-Terminus und wird über die YG-Box im Bereich der Aminosäure-Reste 269-281 vermittelt. Gemin6 und Unrip binden direkt an Gemin7 (Baccon et al. 2002; Carissimi et al. 2005). Gemin8 bindet direkt an das Heterodimer Gemin6-Gemin7 (Carissimi et al. 2006) und den C-Terminus von SMN (AS-Reste 242-294) (Otter et al. 2007). Die Funktionen von Gemin6, Gemin7, Gemin8 und Unrip sind wenig charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin5, Gemin8 und Unrip neben SMN essentiell für die *in vitro* Assemblierung von snRNPs am SMN-Komplex notwendig sind (Fischer et al. 1997; Pellizzoni et al. 1998; Carissimi et al. 2005; Shpargel und Matera 2005; Battle et al. 2006; Carissimi et al. 2006). Abgesehen von Unrip (Carissimi et al. 2005) co-lokalisieren alle Gemin (2-8) mit dem SMN-Protein in nukleären Gems bzw. Cajal Körpern (Liu et al. 1997; Charroux et al. 1999; Charroux et al. 2000; Baccon et al. 2002; Gubitz et al. 2002; Pellizzoni et al. 2002a; Carissimi et al. 2006). Darüber hinaus vermitteln Gemin3, Gemin4, Gemin5, Gemin6, Gemin7 und Unrip die indirekte Wechselwirkung von unterschiedlichen Sm-Proteinen mit dem SMN-Komplex (Charroux et al. 1999; Charroux et al. 2000; Baccon et al. 2002; Gubitz et al. 2002; Pellizzoni et al. 2002a; Carissimi et al. 2005). Bei der Assemblierung von UsnRNPs kommt es zur Ausbildung eines heptameren Rings aus unterschiedlichen Sm-Proteinen (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF und SmG), die zum einen direkt über die Tudor-Domäne (Exon 3) (Buhler et al. 1999) bzw. die Aminosäure-Reste 240-267 (Exon 6) (Liu et al. 1997) und zum anderen indirekt (s. oben) an das SMN-Protein binden. Dabei steigt durch symmetrische Methylierung von Arginin-Resten in einem RG-Motiv der Sm-Proteine die Affinität für das SMN-Protein (Friesen und Dreyfuss 2000; Friesen et al. 2001a). Auch die den Sm ähnlichen LSm-Proteine (*like Sm protein*), die bei nukleären U6snRNPs beobachtet werden, besitzen ein RG-Motiv und können z.T. mit dem SMN-Protein in Wechselwirkung treten (Friesen und Dreyfuss 2000).

Als ein RNA-Protein-Assemblierungskomplex verfügt das SMN-Protein zusätzlich über eine unspezifische Nukleinsäure-Bindungsstelle (RNA, dsDNA, ssDNA), die sich über die Aminosäure-Reste 28-209 erstreckt, wobei die durch Exon2 (AS-Reste 28-90), Exon3 (AS-Reste 91-157 mit der Tudor-Domäne) und Exon 4 (AS-Reste 158-209) kodierten Bereiche jeweils einzeln für eine Bindung hinreichend sind (Lorson und Androphy 1998). Darüber hinaus wird die spezifische Bindung von UsnRNAs an den SMN-Komplex über Gemin5 vermittelt (s. oben) (Battle et al. 2006). Die verschiedenen snRNP-abhängigen Komponenten des SMN-Komplexes sind relativ gut bekannt. Der Aufbau alternativer SMN-Komplexe, deren Existenz z.B. über Saccharose-Gradientenzentrifugation

bzw. Co-Lokalisationsstudien in Zellen gezeigt wurde, deutet aber auf eine sehr heterogene Zusammensetzung ohne Beteiligung aller Gemine bzw. Unrip hin (Meister et al. 2000; Carissimi et al. 2005; Carissimi et al. 2006; Zhang et al. 2006a).

Neben den genannten Bindungspartnern interagiert das SMN-Protein direkt oder indirekt mit weiteren Proteinen, die mit dem Aufbau, der Prozessierung oder dem Transport von snRNPs assoziiert sind. In unserer Arbeitsgruppe wurde die direkte Wechselwirkung des SMN-Proteins mit der 23 kDa Isoform des Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2<sup>23</sup>) beschrieben (Claus et al. 2003; Claus et al. 2004). Die Bindung wird über den N-Terminus des SMN-Proteins (AS-Reste 1-90) vermittelt (Claus et al. 2003). FGF-2<sup>23</sup> wird in hypoglossalen Motoneuronen der Ratte exprimiert und nach Läsion hochreguliert (Huber et al. 1997) und konkurriert mit Gemin2 *in vivo* und *in vitro* um die Bindung an SMN (Bruns et al. 2007). Bei exogener Applikation konnten für FGF-2 sowohl *in vivo* wie auch bei *in vitro* kultivierten Neuronen neurotrophische bzw. neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden (Grothe und Unsicker 1992). FGF-2<sup>23</sup> liegt in einem Komplex mit den Uridin-reichen snRNAs U2snRNA und U4snRNA (Claus et al. 2004) vor und bindet den Spleißfaktor SF3a66 (Gringel et al. 2004), der in Form eines Heterotrimers mit SF3a120 und SF3a60 an der Prozessierung von Uridin-reichen U2snRNPs beteiligt ist (Nesic und Kramer 2001).

Ein weiterer mit der Biogenese von U1snRNPs assoziierter Interaktionspartner des SMN-Proteins ist U1A (Liu et al. 1997). Der indirekte SMN-Interaktionspartner ZPR1 (*zinc finger protein 1*) (Gangwani et al. 2001; Gangwani et al. 2005) sowie die direkten Bindungspartner Snurportin 1 und Importin- $\beta$  (Narayanan et al. 2002; Narayanan et al. 2004) vermitteln den Kerntransport des SMN/snRNP-Komplexes. Intranukleär verknüpft Coilin das importierte SMN in Gems mit den Cajal-Körpern: SMN interagiert über die Tudor-Domäne mit Coilin, welches mit den Sm-Proteinen um die Bindung konkurriert (Hebert et al. 2001). Vermutlich führt die Wechselwirkung mit Coilin zur Desintegration des importierten SMN/snRNP-Komplexes, so dass SMN über Gems recyclet und snRNPs in Cajal-Körpern weiter prozessiert werden können (Pellizzoni et al. 1998; Hebert et al. 2001). Neben der Assemblierung von UsnRNPs ist das SMN-Protein über Bindung von Gar1 und Fibrillarin an die Tudor-Domäne auch an der Prozessierung von snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoproteins*) beteiligt (Pellizzoni et al. 2001a). Gar1 interagiert mit Box H/ACA und Fibrillarin mit Box C/D snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) (Jones et al. 2001; Pellizzoni et al. 2001a). Beide Proteine stellen einen Bestandteil von Box H/ACA snoRNPs bzw. Box C/D snoRNPs dar (Venema und Tollervey 1999).

Darüber hinaus interagiert SMN über den durch die Exone 4-7 kodierten Bereich mit der Methyltransferase TGS 1 (Trimethylguanosinsynthase 1) (Mouaikel et al. 2003). Das Enzym prozessiert im Kern und im Zytoplasma einige snoRNAs und snRNAs, in dem es die Methylierung der beiden sich an das 5'-Methylguanosid (m<sup>7</sup>G-CAP) anschließenden Nukleotide zu 7-Methylguanosin-2'-Methylribosid-2'-Methylribosid katalysiert (m<sub>3</sub>G-CAP) (Mouaikel et al. 2002). Die Hypermethylierung der m<sup>7</sup>G-CAP- zur m<sub>3</sub>G-CAP-Struktur stabilisiert die RNA und dient bei einigen zytoplasmatischen snRNAs als ein nukleäres Importsignal (Reddy et al. 1992). SnoRNAs dienen als Leitstruktur für die Pseudo-Uridinierung (Box H/ACA) und 2'-O-Ribose Methylierung (Box C/D) von prä-rRNA (rRNA, ribosomale RNA) und einiger snRNAs (Venema und Tollervey 1999). Darüber hinaus kann SMN RNA-abhängig mit den nukleolaren Proteinen Nucleolin und B23 immunpräzipitiert werden, die u.a. jeweils an der Prozessierung von prä-rRNA und Stabilisierung von mRNA beteiligt sind (Lefebvre et al. 2002).

Unter direkter Bindung von Fibrillarin und Gar1 sowie ISG20, einer 3'-5'Exonuklease, die spezifisch ssRNA abbaut und U3snoRNA bindet (Espert et al. 2006), ist SMN an der Biosynthese ribosomaler RNA beteiligt.

Das SMN-Protein ist über unterschiedliche Partner mit der Transkriptionsmaschinerie verknüpft. Es bindet über den C-Terminus und den durch Exon 7 kodierten Bereich (AS-Reste 279-294) die RNA Helikase A (RHA), die wie Gemin3 zur DEAD-Box Familie zählt (Pellizzoni et al. 2001b), und in einem Komplex mit RNA-Polymerase II, TBP (*TATA-Box binding protein*) sowie dem Transkriptionsfaktor TFII B vorliegt (Pellizzoni et al. 2001a). SMN bindet über die Aminosäure-Reste 241-278 auch einen Transkriptionsrepressor mSin3a (Zou et al. 2004). Darüber ist die Interaktion mit dem FUSE-bindenden Protein (FBP) beschrieben, welches mit der Transkriptionsregulation von c-myc und der Stabilisierung von GAP43 (*growth associated protein 43*) mRNA assoziiert ist (Williams et al. 2000). SMN bindet außerdem den Transkriptionsfaktor EWS (Ewing's Sarcoma Protein) (Young et al. 2003). Zusätzlich sind sämtliche SMN-Interaktionspartner viralen Ursprungs (Papiloma Virus E2 Protein (Strasswimmer et al. 1999), NS1 und NS2 aus Minute Virus (Young et al. 2002c, 2002b) sowie EBNA2 und EBNA6 des Epstein-Barr Viruses (Voss et al. 2001)) regulativ an der Transkription beteiligt. Bei einer mit SMA-Typ I assoziierten Deletion des SMN-Protein (SMN $\Delta$ N27, AS-Reste 1-27) konnte darüber hinaus in einem *in vivo* Assay eine Inhibition der durch RNA-Polymerase I und II vermittelten Transkription beobachtet werden (Pellizzoni et al. 2001a).

SMN bindet außerdem verschiedene Mitglieder der Familie heteronukleärer Ribonukleoproteine (hnRNPs, *heteronuclear ribonucleoproteins*), die die RNA-Bindung und deren Transport vermitteln (Mourelatos et al. 2001; Rossoll et al. 2002; Rossoll et al. 2003). HnRNP-R und hnRNP-Q interagieren über den C-Terminus (AS-Reste 210–294), möglicherweise unter Beteiligung der Tudor-Domäne, mit SMN (Rossoll et al. 2002). HnRNP-Q1 – hnRNP-Q3 stellen alternative Spleißprodukte dar, die überwiegend an der Stabilisierung von RNA und am Aufbau des Spleißosoms beteiligt sind (Mourelatos et al. 2001). HnRNP-Q und hnRNP-R zeigen während der Entwicklung ein unterschiedliches Expressionsprofil, wobei hnRNP-R während der Embryogenese und neonatal im Rückenmark deutlich überwiegt (Rossoll et al. 2002). SMN und hnRNP-R co-lokalisieren in Axonen und Wachstumskegeln von kultivierten embryonalen Motoneuronen aus der Maus (Rossoll et al. 2003). Dabei konnte beobachtet werden, dass SMN über die Assoziation mit hnRNP-R den axonalen Transport von  $\beta$ -Actin-mRNA zu den Wachstumskegeln vermittelt und damit möglicherweise über die lokale Translation neuronales Wachstum fördert (Rossoll et al. 2003). HnRNP-Q1 (*SYNCRIP, Synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein*) bindet verschiedene Isoformen des Membranproteins Synaptotagmin und den poly(A)-Schwanz von RNA (Mizutani et al. 2000). Darüber hinaus ist es am bidirektionalen Transport von RNA-Granula und speziell von Inositol-1,4,5,-triphosphat-Rezeptor (IP3R) Typ I mRNA in hippocampalen Neuronen aus der Ratte beteiligt (Bannai et al. 2004). SMN co-lokalisiert axonal in Rückenmarksneuronen aus der Ratte mit ribosomaler RNA und spielt beim bidirektionalen Transport in Ausläufern aus embryonalen hippocampalen Neuronen aus dem Huhn eine Rolle (Zhang et al. 2003). Darüber hinaus wurde kürzlich in diesen Zellen die Co-Lokalisation von SMN mit poly(A)-RNA und dem poly(A)-bindenden Protein (PABP) beschrieben (Zhang et al. 2007).

Neben dem hnRNP-R vermittelten Transport von  $\beta$ -Actin mRNA ist das SMN-Protein auch in der Lage mit der Polyprolinregion (AS-Reste 194-248) C-terminal (AS-Reste 188-294) mit dem Actin-bindenden Protein Profilin (PFN) zu interagieren (Giesemann et al. 1999). Profilin nimmt *in vitro* und *in vivo* direkten Einfluss auf die Dynamik des Actin-Zytoskeletts und das Wachstum neuronaler Ausläufer (Da Silva et al. 2003; Sharma et al. 2005). Darüber hinaus konnte kürzlich in *Drosophila* ein SMN/ $\alpha$ -Actinin-Komplex co-immunpräzipitiert und eine Co-Lokalisation in der Z-Scheibe von Muskelfibrillen beobachtet werden (Rajendra et al. 2007).

Über die Interaktion mit dem anti- bzw. proapoptotische Faktor Bcl-2 (Iwahashi et al. 1997) und p53 (Young et al. 2002a) ist das SMN-Protein möglicherweise auch an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt (Vyas et al. 2002). Zusätzlich tritt das SMN-Proteins mit dem Stress-Granula assoziierten Protein Rpp20 (Hua und Zhou 2004) und dem Osteoclasten-stimulierende Faktor (OSF) (Kurihara et al. 2001) sowie der konstitutiv exprimierten Serin/Threonin-Proteinphosphatase4 (PP4) (Carnegie et al. 2003) in Wechselwirkung.

#### 1.4 Nukleozentrische vs. axonale Funktion des SMN Proteins

Der SMN-Komplex vermittelt perinukleär die Assemblierung verschiedener Uridin-reicher *small nuclear ribonucleoproteins* (UsnRNPs), die am Aufbau des Spleißosoms und somit an der Prozessierung der prä-mRNA im Kern beteiligt sind (siehe Abb. 2). Während des Spleißprozesses werden die Intron-Sequenzen aus der transkribierten prä-mRNA geschnitten und die verschiedenen Exone ligiert (Kramer 1996). Abhängig von den beteiligten UsnRNPs unterscheidet man ein U2-Typ-Intron-abhängiges Haupt- von einem U12-Typ-Intron-abhängigen Nebenspleißosom (Will und Luhrmann 2005). Letztgenanntes wurde erst Anfang der neunziger Jahre identifiziert und liegt in Menschen und Pflanzen konserviert vor (Lorkovic et al. 2005). Das Hauptspleißosom setzt sich aus den U1, U2, U5 und U4/U6snRNP zusammen, während das Nebenspleißosom aus den U4atac/U6atac, U5, U11 und U12snRNP aufgebaut ist (Will und Luhrmann 2005). Die U1, U2, U4 und U5snRNPs werden im Zytoplasma assembliert, während U6snRNA im Kern verbleibt und hier mit den sieben Sm-ähnlichen Proteinen (LSm2-LSm8 Proteine, *like Sm protein*) in Wechselwirkung tritt (Achsel et al. 1999). Die Assemblierung spleißosomaler RNA-Proteinkomplexe und der nukleäre Transport sind im Detail für U1 und U2snRNP beschrieben worden (Fischer et al. 1997; Kramer et al. 1999; Yong et al. 2002; Kramer et al. 2005), *in vitro* Untersuchungen zur Assemblierung von Sm-Proteinen an snRNAs legen aber den Schluss nahe, dass das SMN-Protein auch die Übertragung von Sm-Heptameren auf U4, U5 und U7 (LSm-Heptamer; (Pillai et al. 2003)) sowie auf U11 und U12snRNA vermittelt (Fischer et al. 1997; Pellizzoni et al. 2002b).

Zunächst treten verschiedene Sm-Proteine mit dem 20 S Methylosom in Wechselwirkung (s.Abb. 2) (Meister et al. 2000; Brahms et al. 2001). Integrale Bestandteile des Makroproteinkomplexes stellen die Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5), das Methylosom-Protein 50 (MEP50) sowie pICln dar (Friesen et al. 2001b). PRMT5 katalysiert die symmetrische Methylierung von Arginin-Resten der Sm B, D1 und D3 Proteine (Friesen et al. 2001b; Meister et al. 2001b). MEP50 enthält wie Gemin5 WD-Wiederholungsdomänen und vermittelt die Bindung von Sm-Proteinen und vermutlich weiterer Komponenten des Methylosoms (Friesen et al. 2002; Gubitza et al. 2002). pICln konkurriert mit dem SMN-Protein um die Bindung von Sm-Proteinen (B, D1, D2, D3 und E) und wurde als Inhibitor der

UsnRNP Assemblierung beschrieben (Pu et al. 1999). Möglicherweise vermittelt pICln auch die Speicherung bzw. Bereitstellung von Sm-Proteinen für eine Prozessierung durch PRMT5 und das SMN-Protein (Friesen et al. 2001b). Durch die Methylierung von Arginin-Glycin-Motiven steigt die Affinität der Sm-Proteine für das SMN-Protein (Brahms et al. 2001; Friesen et al. 2001a). Das SMN-Protein interagiert mit einigen Sm-Proteinen direkt (Buhler et al. 1999; Pellizzoni et al. 1999; Friesen und Dreyfuss 2000) sowie mit anderen indirekt über die verschiedenen Gemine und Unrip (Charroux et al. 1999; Charroux et al. 2000; Baccon et al. 2002; Gubitza et al. 2002; Pellizzoni et al. 2002a; Carissimi et al. 2005). Unter Bildung einer heptameren Ringstruktur und spezifischer Bindung an die Sm-Sequenz werden die Sm-Proteine unter ATP-Verbrauch auf die snRNA übertragen (Raker et al. 1996; Raker et al. 1999; Meister et al. 2001a). Dabei wird die ATP-Hydrolyse möglicherweise über Gemin3 vermittelt (Grundhoff et al. 1999). Die selektive Bindung einzelner snRNAs erfolgt über die spezifische Interaktion bestimmter RNA-Sekundärstrukturen mit dem SMN-Komplex (Yong et al. 2002; Yong et al. 2004; Golembe et al. 2005) und Interaktion mit Gemin5 (U1, U2, U4 und U5 – nicht U6, U7snRNA oder rRNA) (Battle et al. 2006). Durch eine Methyltransferase wird der monomethylierte Guanosin-Rest (m<sup>7</sup>G) der RNA-CAP-Struktur zu 2,2,7-Trimethylguanosin (TMG-CAP, m<sub>3</sub>G-CAP) methyliert (Plessel et al. 1994). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde nukleolar die Trimethylguanosin Synthase 1 (TGS1) identifiziert, die die CAP-Strukturen von snRNA und snoRNA hypermethyliert (Mouaikel et al. 2002). Das homologe Enzym tritt im Menschen direkt mit dem SMN-Protein in Wechselwirkung (siehe 1.3) und co-lokalisiert in HeLa-Zellen zytoplasmatisch sowie intranukleär mit SMN-positiven Strukturen (Mouaikel et al. 2003). Die Bildung der m<sub>3</sub>G-CAP-Struktur führt zur spezifischen Translokation des UsnRNPs in den Kern (Massenet et al. 2002; Strasser et al. 2005). Das TMG-CAP wird zunächst durch Snurportin 1 (SPN1) gebunden, welches *in vivo* und *in vitro* direkt mit dem SMN-Protein in Wechselwirkung treten kann (Narayanan et al. 2002). SPN1 besitzt eine IBB-Domäne, die die Interaktion mit dem unidirektionalen Kerntransporter Importin-β vermittelt (Strasser et al. 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Importin-β auch direkt an das SMN-Protein binden kann (Narayanan et al. 2002). Darüber hinaus co-immunpräzipitiert das SMN-Protein mit dem Zink-Finger Protein ZRP1, welches ebenfalls mit Snurportin 1 in Wechselwirkung treten kann (Gangwani et al. 2001). Unter Assoziation von ZRP1, Importin-α/Importin-β und Snurportin 1 wird ein UsnRNP/SMN-Importkomplex gebildet, der die Translokation in den Zellkern vermittelt (Massenet et al. 2002; Narayanan et al. 2002). SMN, RNA und Importin-β sind im Gegensatz zu ZPR-1 essentiell für den snRNP Import (s. Abb. 2) (Narayanan et al. 2004). Intranukleär akkumulieren die UsnRNPs temporär in den Cajal-Körpern und werden unter Interaktion mit snoRNPs (syn. scaRNPs speziell in Cajal-Körpern) zu spleißosomalen snRNPs weiter prozessiert (Gall 2000; Cioce und Lamond 2005; Stanek und Neugebauer 2006), während das SMN-Protein recyclet wird (Pellizzoni et al. 1998; Hebert et al. 2001).

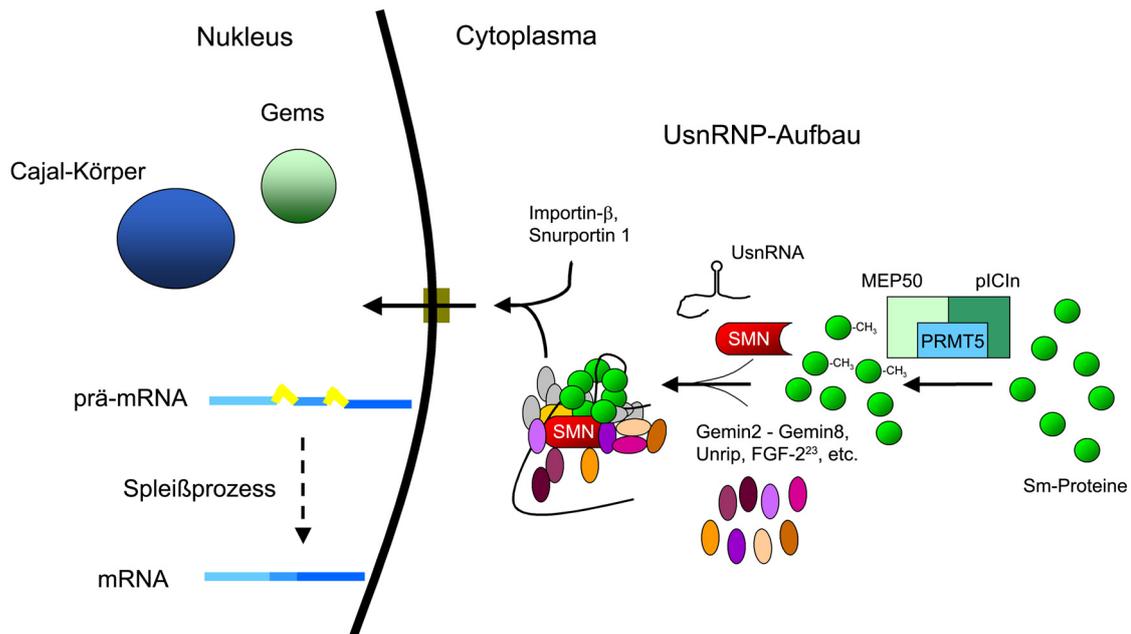


Abb. 2 Assemblierung spleißosomaler UsnRNPs am SMN-Komplex. Das SMN-Protein bildet im Zytoplasma Dimere bzw. Oligomere und dient als Plattform für den Aufbau von RNA-Proteinkomplexen, die am Aufbau des Spleißosoms beteiligt sind. Uridin-reiche kleine nukleäre RNA-Moleküle (*small nuclear RNAs*) werden im Kern transkribiert und anschließend in das Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma methyliert die Proteinmethyltransferase PRMT5 einige Sm-Proteine (SmB, SmD1 und SmD3) und steigert dadurch deren Affinität für das SMN-Protein. Während MEP50 weitere Komponenten des Methylosoms bindet, kann pICln durch Bindung von Sm-Proteinen die Wechselwirkung mit SMN stören. SMN bildet im Zytoplasma einen Multiproteinkomplex aus den Geminen 2-8 sowie weiteren Proteinen und katalysiert unter Assoziation mit den Sm-Proteinen die Übertragung eines heterogenen, ringförmigen Sm-Heptamers auf die UsnRNA. Unter Bindung von Importin-β und Snurportin 1 wird der UsnRNP/SMN-Komplex in den Kern transloziert. Die UsnRNPs werden in Cajal-Körpern weiter prozessiert und gehen in das Spleißosom ein, während SMN und die Gemine in Gems recyclet werden.

Die nukleozentrische Sicht auf das SMN-Protein und dessen Beteiligung am Spleißprozess hat lange Zeit die SMA-Forschung bestimmt. Sie ließ jedoch die Frage offen, aus welchem Grund es zum spezifischen Absterben von Motoneuronen im Rückenmark und im Hirnstamm kommt. Auf welche Art und Weise verursacht ein nahezu ubiquitär exprimiertes Gen die spezifische Degeneration einer Zellpopulation? Das SMN<sup>wt</sup>-Protein fördert im Gegensatz zu den in SMA-Patienten beobachteten mutierten Formen des Proteins *in vitro* die prä-mRNA Prozessierung, so dass als mögliche Ursache für das selektive Absterben Spleißdefekte Motoneuronen-spezifischer prä-mRNA angenommen wurde (Pellizzoni et al. 1998). In einem einfachen Experiment untersuchte die Gruppe um M. Sendtner das Spleißverhalten von Caspase-2 (Ich-1) in einem SMA-Typ I (Hsieh-Li et al. 2000; Monani et al. 2000) und -Typ III Mausmodell (Jablonka et al. 2000b). Das Ich-1-Gen wird während der Embryonalentwicklung von Motoneuronen hochreguliert und zeigt aufgrund alternativen Spleißens eine apoptotische wie auch eine anti-apoptotische Isoform. Beim Vergleich des Quotienten beider Formen konnte jedoch weder beim konstitutiven noch beim alternativen Spleißen der Caspase-2 prä-mRNA ein Unterscheid zwischen Wildtyp- und SMA-Tieren beobachtet werden (Jablonka et al. 2000b; Jablonka et al. 2004).

Arbeiten zu einer möglichen axonalen Funktion wurden lange Zeit in der SMA-Forschung vernachlässigt. Bereits 1999 wurde eine Lokalisation des SMN-Proteins in Ausläufern von zervikalen Rückenmarksneuronen aus der Ratte elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Bechade et al. 1999). Spätere Arbeiten zeigten die Co-Lokalisation des SMN-Proteins mit GAP43 in Wachstumskegel-

ähnlichen Strukturen von differenzierten P19-Teratocarcinoma-Zellen (Fan und Simard 2002). Arbeiten an kultivierten Rückenmarks- und Vorderhirnneuronen aus der Ratte bzw. dem Huhn wiesen auf eine Beteiligung des SMN-Proteins am axonalen Transport hin (Zhang et al. 2003). Mit der Identifikation von hnRNP-R als neuem Interaktionspartner des SMN-Proteins (Rossoll et al. 2002) wurde kurze Zeit später der SMN-vermittelte axonale Transport von  $\beta$ -Actin-mRNA in Axonen und Wachstumskegeln von embryonalen Motoneuronen aus der Maus nachgewiesen (Rossoll et al. 2003). Die in embryonalen Vorderhirnneuronen aus dem Huhn beschriebene Co-Lokalisation des SMN-Proteins mit poly(A)-RNA und PABP in neuronalen Ausläufern lassen vermuten, dass das SMN-Protein den Transport weiterer mRNAs in Axonen vermittelt (Zhang et al. 2007). Eine axonale Translation wurde für zahlreiche Proteine beschrieben (Zheng et al. 2001; Willis et al. 2005; Twiss und van Minnen 2006). Darüber hinaus konnte kürzlich eine neue, axonale Isoform des SMN-Proteins ( $\alpha$ -SMN) identifiziert werden, die nur während der Embryonalentwicklung von Motoneuronen translatiert wird und sich aus den ersten drei Exonen sowie dem sich an Exon 3 anschließenden Intron 3 zusammensetzt (Setola et al. 2007). Das ca. 22 kDa große Protein co-lokalisiert mit Actin-Filamenten in HeLa-Zellen und fördert das Wachstum neuronaler Ausläufer in der Motoneuronen-Zelllinie NSC34, die Bedeutung der Entdeckung für die infantile Spinale Muskelatrophie ist aber noch weitgehend unklar (Cashman et al. 1992; Setola et al. 2007).

Unabhängig davon wird eine axonale Funktion des SMN-Proteins auch durch die bei der SMA beobachtete Denervation der Muskeln und der Degeneration der Muskelendplatte gestützt (Crawford und Pardo 1996; Cifuentes-Diaz et al. 2002; Chan et al. 2003). Im SMA-Typ I Mausmodell (SMN<sup>-/-</sup>;hSMN2) wird bei zunehmender Lähmung der proximalen Muskulatur und dem Tod durch respiratorisches Versagen eine Reduktion in der Anzahl an Motoneuronen-Zellkörpern um 35 % beschrieben (Monani et al. 2000). Die infantile Spinale Muskelatrophie wird daher vermutlich nicht alleine durch eine Abnahme der Anzahl an Motoneuronen, sondern möglicherweise auch durch SMN-vermittelte, axonale Defekte und die dadurch induzierte Denervation der Muskeln verursacht. Im Zebrafisch-Modellsystem konnte gezeigt werden, dass der SMN knock-down zur Degeneration und verstärkten Verzweigung von ventral und dorsal projizierenden Motoneuronen während der Embryonalentwicklung führt (McWhorter et al. 2003). Der reduziert SMN-Proteinspiegel führte darüber hinaus zu einer gestörten Innervierung der Zielorgane. Ein vermehrtes Zellsterben konnte jedoch nicht beobachtet werden (McWhorter et al. 2003). Die verschiedenen Ergebnisse legen nahe, dass das SMN-Protein nicht alleine zytoplasmatische bzw. nukleäre, sondern auch axonale Funktionen aufweist.

## 1.5 Das SMN-Protein und das Zytoskelett

Das SMN-Protein scheint auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Zytoskelett der Zelle in Verbindung zu stehen. Untersuchungen an einem Cre-loxP-Mausmodell mit SMN $\Delta$ 7-Expression in neuronalem Gewebe zeigten, dass das mutierte SMN-Protein zu einer starken Aggregation von Neurofilamenten inklusive phosphorylierter Isoformen führt (Cifuentes-Diaz et al. 2002). In Neuronen werden neben den drei Neurofilament-Isoformen NF-L, NF-M und NF-H die zwei weiteren wichtigen Intermediärfilamente  $\alpha$ -Internexin und Peripherin beobachtet (Lariviere und Julien 2004). Die Akkumulation von NF-M und phosphoryliertem NF-H Neurofilamenten in den proximalen und

terminalen Axonsegmenten bei unveränderter Genexpression könnten dabei mit einer Ursache für die beobachtete Denervation der Muskelendplatte darstellen (Cifuentes-Diaz et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass das SMN-Protein in der neuromuskulären Endplatte von neonatalen Mäusen angereichert ist und in Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen von differenzierten P19-Teratocarcinoma-Zellen mit NF-L co-lokalisiert (Fan und Simard 2002). Auch in SMA-Patienten wurde die Denervation der Muskelfasern (Crawford und Pardo 1996) beobachtet und die Akkumulation von phosphorylierten Neurofilamenten im Periplasma von Neuronen mehrfach beschrieben (Lippa und Smith 1988; Kato und Hirano 1990; Murayama et al. 1991). Sowohl NF-M oder NF-H knock-out als auch transgene Tiere zeigten jedoch bezüglich der Motoneurone nur einen milden Effekt und kaum motorische Störungen (Lariviere und Julien 2004; Liu et al. 2004). Eine moderate Überexpression von NF-L bewirkt dagegen im Mausmodell die Akkumulation von Neurofilamenten in Axonen und Perikaryen sowie die Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und erzeugt einen der Amyotrophen Lateralsklerose ähnlichen Phänotyp (Xu et al. 1993; Lee und Cleveland 1994). Das SMN-Protein ist über hnRNP-R und die Assoziation mit PABP aktiv am axonalen Transport von mRNA-Molekülen beteiligt (Rossoll et al. 2003; Zhang et al. 2007). Die mRNA-Moleküle der drei Neurofilament-Isoformen wurden in Axonen aus dem *Nervus ischiadicus* der Ratte nachgewiesen (Sotelo-Silveira et al. 2000) und der axonale Transport und die Translation von Peripherin mRNA in Spinalganglienneuronen (DRG) der Ratte beschrieben (Willis et al. 2005). Somit könnte ein gestörter mRNA-Transport eine mögliche Ursache für die Akkumulation von Neurofilamenten darstellen. Es ist dabei aber unklar, wie die unterschiedlichen Beobachtungen zeitlich und räumlich zu ordnen und wie Ursache und Wirkung bei der infantilen spinalen Muskelatrophie zu bewerten sind.

Mikrofilamente stellen neben den Intermediärfilamenten und Mikrotubuli einen integralen Bestandteil des Zytoskeletts der Zelle dar. In einem Antikörper-Array wurde in humanen SMA-Typ-II-Muskelzellen beim Vergleich mit Kontrollzellen eine Reduktion des VASP-Proteinspiegels (VASP: *vasodilator stimulated phosphoprotein*) um ca. 50 % beobachtet (Anderson et al. 2003). VASP gehört mit Mena und EVL (*Ena/VASP like protein*) zu den Ena-verwandten Genen aus *Drosophila* und ist an der Stabilisierung von Actin-Filamenten beteiligt (Cramer 2002; Krause et al. 2002). Darüber hinaus wurde die Co-Lokalisation des SMN-Proteins mit F-Actin in Wachstumskegeln von P19-Teratocarcinoma-Zellen beschrieben (Fan und Simard 2002). Die zusätzlich in *Drosophila melanogaster* beobachtete Co-Lokalisation und Co-Immunpräzipitation des SMN-Proteins mit  $\alpha$ -Actinin, welches Actin-Filamente in der Z-Scheibe von Muskelfasern quervernetzt, lassen eine verstärkte Assoziation des SMN-Proteins mit Mikrofilamenten vermuten (Rajendra et al. 2007). Unterstützt wird die Hypothese durch die Beobachtung, dass SMN-positive Granula mit einer Geschwindigkeit von 1  $\mu\text{m/s}$  am schnellen axonalen Transport (Hirokawa 1998) in embryonalen Vorderhirnneuronen aus dem Huhn beteiligt waren und dieser bei der Depolymerisation von Actin-Filamenten um ca. 39 % zurück ging (Zhang et al. 2003). Über die Interaktion mit Profilin kann das SMN-Protein indirekt mit dem Actin-Zytoskelett in Wechselwirkung treten (Giesemann et al. 1999). Profilin ist ein regulatorisches Protein des Actin-Zytoskeletts und kann sowohl einen inhibitorischen als auch einen stimulierenden Effekt auf die Bildung von filamentösem Actin zeigen (Yarmola und Bubb 2006). In Wirbeltieren liegt Profilin in zwei Isoformen (Profilin1 und Profilin2) mit unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften vor

(Gieselmann et al. 1995; Lambrechts et al. 1997), die jedoch beide das SMN-Protein binden können (Gieselmann et al. 1999). Neben dem SMN-Protein bindet auch VASP *in vitro* über eine Prolin-reiche Sequenz spezifisch Profilin2. (Kang et al. 1997; Lambrechts et al. 1997). Darüber hinaus konkurrieren Actin und Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) um die Bindung an Profilin (Lassing und Lindberg 1985; Lambrechts et al. 1995), wobei Profilin2 für PIP<sub>2</sub> eine niedrigere Affinität als Profilin1 zeigt (Lambrechts et al. 1997). Bei beiden Isoformen inhibiert die Bindung an PIP<sub>2</sub> die Wechselwirkung mit Polyprolin-Motiven, wie sie bei dem SMN-Protein und VASP beobachtet werden (Lambrechts et al. 1997). Über die Interaktion mit Profilin (Gieselmann et al. 1999) ist das SMN-Protein möglicherweise am Aufbau und über Assoziation mit α-Actinin (Rajendra et al. 2007) an der Vernetzung von filamentösen Actin beteiligt.

## 1.6 Regulation des Actin-Zytoskeletts

Das Actin-Zytoskelett ist eine höchst dynamische Struktur und vermittelt die Mobilität, Zellteilung, Migration, Invasion und das neuronale Wachstum der Zelle (Huber et al. 2003; Wang et al. 2006). Filamentöses Actin (F-Actin) ist helikal aus globulären Actin-Monomeren (G-Actin) aufgebaut, dessen Enden mit (+) (*barbed end*) und (-) (*pointed end*) gekennzeichnet werden (Steinmetz et al. 1997). Unter Gleichgewichtsbedingungen überwiegt am (+)-Ende die Addition von ATP-gebundenem G-Actin und am (-)-Ende die Dissoziation von ADP-G-Actin (Carlier 1991; Pollard und Borisy 2003). Innerhalb des Filaments findet eine Hydrolyse von ATP-Actin über ADP-(P<sub>i</sub>)-Actin zu ADP-Actin statt (Carlier 1992). Der simultane Auf- und Abbau bei insgesamt relativ konstanter Länge der Filamente wird als *treadmilling* bezeichnet (Steinmetz et al. 1997). *In vivo* wird die Elongation von Filamenten und die Dissoziation von Monomeren über zahlreiche Proteine moduliert (s. Abb. 3) (Krause et al. 2002; Paavilainen et al. 2004; Siripala und Welch 2007). Regulatorische Proteine wie ADF/Cofilin und Gelsolin binden an F-Actin und induzieren eine Konformationsänderung, die zum Bruch der Filamente führen kann (McGough et al. 1997; McGough et al. 1998). Gelsolin bindet daraufhin das freie (+)-Ende und verhindert damit eine weitere Elongation der Filamente, während die Depolymerisation am neuen, ungeschützten (-)-Ende ermöglicht wird (Sun et al. 1999). Die ADF/Cofilin-Familie (im folgenden Text als Cofilin bezeichnet) besteht aus drei Proteinen mit redundanten Funktionen (ADF, *actin depolymerizing factor*; Cofilin1 und Cofilin2), von denen Cofilin1 in Säugetieren die dominante Isoform darstellt (Hotulainen et al. 2005). Cofilin schafft zunächst freie (+)-Enden, an denen eine weitere Polymerisation stattfinden kann (Chan et al. 2000; Zebda et al. 2000; Ghosh et al. 2004; Andrianantoandro und Pollard 2006). Über Assoziation mit Arp2/3 fördert Cofilin die Verzweigung von linearen Actin-Filamenten (Ichetovkin et al. 2002). Zusätzlich kann es abhängig von der lokalen Konzentration die Dissoziation von Actin-Filamenten induzieren und mit ADP-Actin-Monomeren dimerisieren (Nishida et al. 1984; Andrianantoandro und Pollard 2006). Die Phosphorylierung von Cofilin führt zur Inaktivierung und erfolgt durch eine der beiden Lim-Kinase Isoformen (LimK1, LimK2) oder die testikuläre Kinase (TesK), die jedoch lediglich für die Spermatogenese von Bedeutung ist (Toshima et al. 1995; Yang et al. 1998; Sumi et al. 2001; Toshima et al. 2001). Die Aktivität der überwiegend redundant exprimierten Lim-Kinasen (Mori et al. 1997) wird durch Isoformen der p21-aktivierten Kinase (PAK) und der RhoA-bindenden Kinase (ROCK) reguliert (Edwards et al. 1999; Maekawa et al. 1999; Dan et al. 2001). Phosphorylierung der Lim-Kinasen (LimK1: Thr508, LimK2:

Thr505) führt zur Aktivierung der Enzyme (Ohashi et al. 2000; Sumi et al. 2001). Die verschiedenen Isoformen der Slingshot-Phosphatasen dephosphorylieren und deaktivieren Lim-Kinasen und dephosphorylieren und aktivieren Cofilin (Soosairajah et al. 2005). Darüber hinaus dephosphoryliert Chronophin spezifisch Cofilin (Gohla et al. 2005).

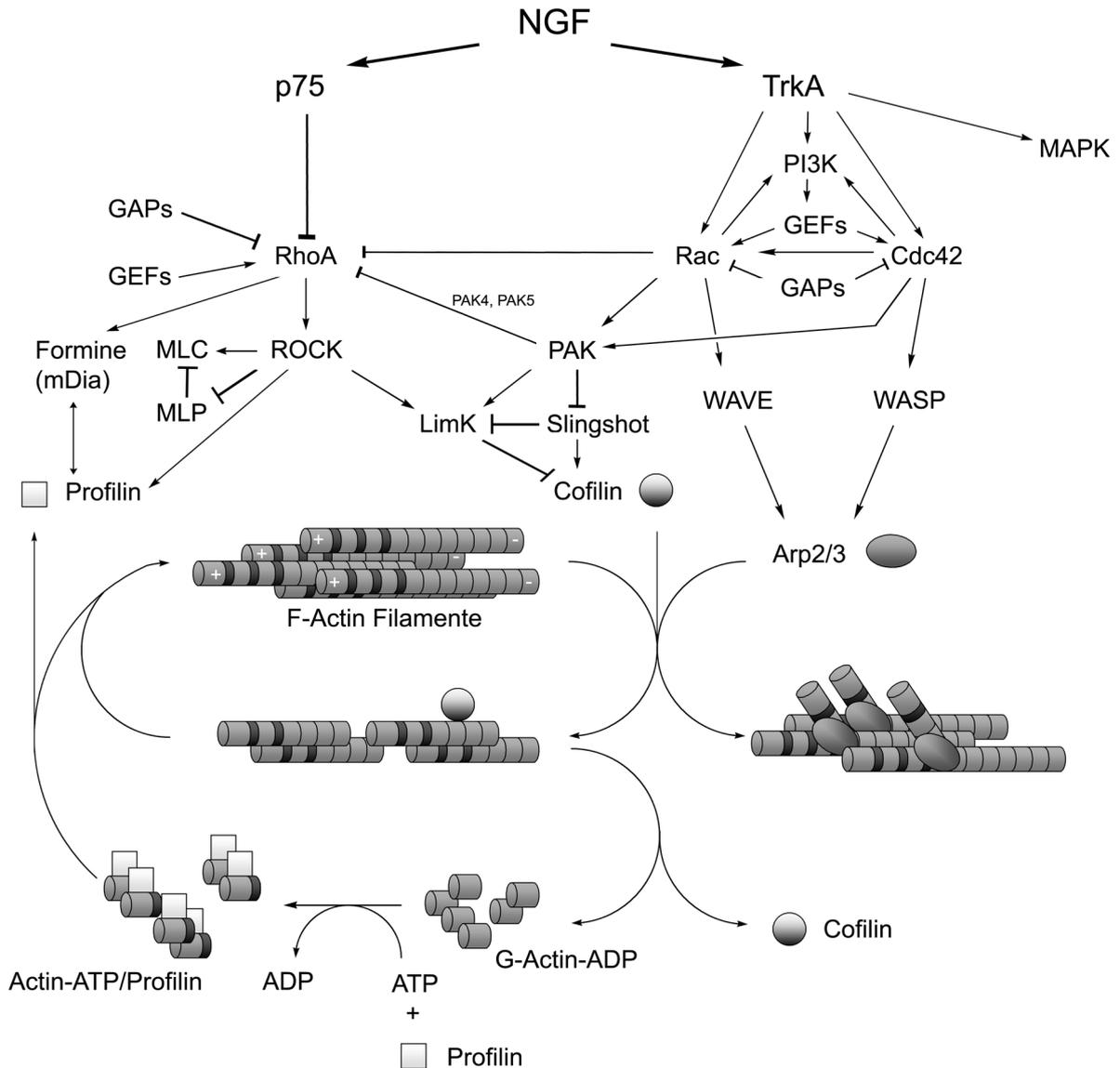


Abb. 3 Vereinfachte Darstellung zentraler Regulatoren des Actin-Zytoskeletts. Die Bindung des Nervenwachstumsfaktors NGF an den p75-Neurotrophinrezeptor führt zur Inhibition der RhoA- und gleichzeitig über Dimerisierung von TrkA-Rezeptortyrosinkinasen zur Aktivierung der Rac1- und Cdc42-Rho-GTPasen. Darüber hinaus wird über den MAP-Kinase-Weg die Genexpression während der neuronalen Differenzierung stimuliert. Durch das Wechselspiel der GTPasen wird eine kontrollierte Polymerisation von G-Actin-Monomeren zu filamentösen F-Actin sowie dessen Depolymerisation oder Verzweigung reguliert (weitere Informationen im Text).

Abkürzungen: ROCK: RhoA-bindende Kinase, PAK: p21-aktivierte Kinase, LimK: Lim-Kinase; MAPK: MAP-Kinase, PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase, MLC: *myosin light chain*; MLP *myosin light chain phosphatase*; WASP: Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein, WAVE: *WASP-family verprolin-homologous protein*.

Die Lim-Kinasen bilden eine Schnittstelle bei der Signaltransduktion durch die kleinen GTPasen RhoA (*Ras-homologous member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*cell division cycle 42*) (Sumi et al. 1999). Während PAKs durch Rac1 und Cdc42 aktiviert werden (Abo et al. 1998; Daniels et al. 1998), ist die Aktivität von ROCK RhoA-abhängig (Ishizaki et al. 1996; Matsui

et al. 1996). Die RhoA-GTP vermittelte Aktivierung von ROCK und Forminen (mDia) sowie die induzierte Phosphorylierung von Profilin2 und Cofilin, führen zur Bildung von Actin-Filamenten (Watanabe et al. 1997; Maekawa et al. 1999; Watanabe et al. 1999; Krebs et al. 2001; Da Silva et al. 2003).

Profilin fördert den Nukleotidaustausch an ADP-Actin (Gieselmann et al. 1995) und beschleunigt unter Interaktion mit Forminen die Addition von ATP-Actin an das (+)-Ende von F-Actin (Kovar et al. 2006). Die Gesamtmenge an freiem Actin wird in der Zelle durch Dimerisierung (ADP-Actin/Cofilin, ATP-Actin/ $\beta$ 4-Thymosin, ATP-Actin/Profilin) reduziert, um eine spontane Assemblierung von Actin-Filamenten zu vermeiden (Blanchoin und Pollard 1998; Didry et al. 1998; Kang et al. 1999). Darüber hinaus schirmen Proteine wie das Heterodimer CP (*capping protein*) am (+)-Ende und Tropomodulin am (-)-Ende die terminalen Actin-Proteine von bestehenden Filamenten ab und verhindern so eine unkontrollierte Addition von ATP-G-Actin oder Dissoziation von ADP-G-Actin (Wear et al. 2003; Zigmond 2004). Die *de novo* Synthese von Actin-Filamenten wird über Formine und Arp2/3-Komplexe vermittelt (Hotulainen und Lappalainen 2006), die die Bildung von ATP-Actin-Kondensationskeimen katalysieren. Darüber hinaus ermöglicht Arp2/3 die Verzweigung am (+)-Ende von bereits bestehenden Filamenten (Mullins und Pollard 1999; Pollard und Beltzner 2002). Die Aktivität von Arp2/3 wird über WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) und WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*) reguliert, die ihrerseits über die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 aktiviert werden (Miki et al. 1998; Takenawa und Miki 2001).

Der Auf- und Abbau von Actin-Filamenten wird durch ein Wechselspiel der verschiedenen Rho-GTPasen, die durch GTP-Bindung aktiviert und GTP-Hydrolyse deaktiviert werden, vermittelt (Hall 1998; Schwartz 2004). Katalysiert wird die Reaktion durch eine intrinsische GTPase-Aktivität sowie verschiedene GAPs (*GTPase activating protein*) und GEFs (*Guanine nucleotide exchange factor*), die durch exogene Faktoren stimuliert werden können (Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die infantile Spinale Muskelatrophie ist durch die spezifische Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark sowie Hirnstamm charakterisiert und führt aufgrund der Denervation von Muskeln zu einer fortschreitenden peripheren Lähmung. Verursacht wird die Erkrankung durch den Verlust oder die Mutation des *survival of motoneuron 1* (SMN1)-Gens und die dadurch bedingte Reduktion des SMN-Proteinspiegels. Der molekulare Mechanismus, der zu der axonalen Degeneration und zum Absterben von Motoneuronen führt, ist noch unklar. In der Vergangenheit wurde der Auslöser in einer gestörten Biosynthese von spleißosomalen snRNPs am SMN-Komplex gesucht. Darüber hinaus gibt es inzwischen Daten, die auf eine zusätzliche axonale Funktion des SMN-Proteins hinweisen. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von primären Motoneuronen aus der Maus oder Ratte und dem hohen Bedarf an Zellen für biochemische Untersuchungen, soll in dieser Arbeit ein PC12-Zellkulturmodell für die Spinale Muskelatrophie entwickelt werden. In diesem soll dann der Einfluss des SMN-Proteinspiegels auf das Wachstum neuronaler Ausläufer näher charakterisiert werden. Dabei muss ermittelt werden, welche Relevanz der perinukleäre snRNP/SMN-Komplex für das Neuritenwachstum hat. Hierzu wird der Einfluss der Bindung einzelner Interaktionspartner, die für die Assemblierung des snRNP/SMN-Komplexes notwendig sind, auf die Funktion des SMN-Proteins während des Wachstums neuronaler Ausläufer zu bestimmen sein. Da Gemin2 von essentieller Bedeutung für die Aktivität des snRNP/SMN-Komplexes ist und nukleär mit dem SMN-Protein in sogenannten *gemini of Cajal bodies* co-lokalisiert, soll mit Hilfe eines knock-downs und der Überexpression der Einfluss von Gemin2 auf die Bildung von Kernkörpern und auf das Neuritenwachstum untersucht werden.

Darüber hinaus soll eine potenzielle Assoziation des SMN-Proteins mit Bestandteilen des Zytoskeletts untersucht werden. Da das SMN-Protein über Profilin und  $\alpha$ -Actinin indirekt mit Actin interagieren kann und somit möglicherweise den Aufbau von Mikrofilamenten beeinflusst, soll die Wechselwirkung mit Actin näher betrachtet werden. Dabei wird zu prüfen sein, ob das SMN-Protein eventuell einen Einfluss auf die Bildung von Mikrofilamenten ausübt. Aufgrund der bekannten Interaktion mit Profilin sollen auch potenzielle Veränderungen bei regulatorischen Proteinen des Zytoskeletts überprüft werden. Von besonderem Interesse ist dabei die NGF-vermittelte Signaltransduktion über die RhoA-GTPase und deren Substrat ROCK, da in Zelllysaten aus Mausgehirnen gezeigt werden konnte, dass Profilin2 und ROCK-II in einem gemeinsamen Komplex vorliegen. Unter Einsatz von primären Fibroblasten aus SMA-Typ-I-Patienten können die Ergebnisse möglicherweise anschließend leichter auf die Situation im Menschen übertragen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Kultivierung von PC12-Zellen

PC12-Zellen entstammen einem Tumor des Nebennierenmarks (Phäochromozytom) der Ratte und zeigen unter Stimulation mit dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) einen neuronalen Phänotyp (Greene und Tischler 1976). Differenziert besitzen die Zellen Eigenschaften von adrenergen, sympathischen Neuronen und bilden Ausläufer, die Charakteristika sowohl von Axonen als auch Dendriten zeigen und in Anlehnung an die englischsprachige Literatur als Neuriten bezeichnet werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Poly-L-Lysin beschichteten Kulturflaschen in PC12-Proliferationsmedium bei einer Temperatur von 37 °C unter 8,5 % Kohlendioxid-Atmosphäre in einem befeuchteten Brutschrank. Für die Beschichtung wird die Oberfläche mit einer 0,5 mg/ml PLL-Lösung ( $33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zwei Mal mit zweifach destilliertem Wasser (bidest. H<sub>2</sub>O) gewaschen. Zur Ernte werden die Zellen mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und mit einer 0,05 % (w/v) Trypsin / 0,83 mM Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung abgelöst. Nach Abstoppen der Proteolyse durch Zugabe einer äquivalenten Menge an Medium werden die Zellen für 5 min. bei 235 x g zentrifugiert. Zur mechanischen Desintegration von Zellverbänden wird das Pellet mit wenig Medium versetzt und mit einer über dem Bunsenbrenner enggeschmolzenen Glas-Pasteurpipette trituriert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt über die Trypanblau-Ausschlussfärbung mit einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wird eine Probe der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4 % (w/v) Trypanblau-Lösung versetzt und das Verhältnis von toten (blau) zu lebenden (farblosen) Zellen bestimmt. Die PC12-Zellen werden einmal pro Woche umgesetzt.

PC12-Proliferationsmedium (van Bergeijk et al. 2006):

*Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) *high glucose*

10 % (v/v)	Pferde-Serum
5 % (v/v)	Fetales Kälberserum
6 mM	L-Glutamin
1 mM	Natriumpyruvat
100 IU/ml / 0,1mg/ml	Penicillin/Streptomycin

Dulbecco's PBS: 136,9 mM NaCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### 3.1.2 Differenzierung von PC12-Zellen

Die neuronale Differenzierung der PC12-Zellen erfolgt unter Serumreduktion und Zugabe von NGF auf unterschiedlich beschichteten Oberflächen. Für die Beschichtung mit Laminin und Poly-L-Ornithin (PLO) wird die Oberfläche mit einer Lösung aus 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Laminin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Poly-L-Ornithin-Lösung über Nacht bei (Raumtemperatur) RT inkubiert und anschließend zwei Mal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Laminin und 16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  PLO). Für die Inkubation mit Collagen wird auf Polyethylen bzw. Polypropylen 1,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , auf Deckgläsern 4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Collagen I aus der Ratte

aufgetragen. Hierzu wird die Stammlösung (4 mg/ml in 0,1 M Essigsäure) in 30 % (v/v) Ethanol entsprechend verdünnt und auf die Oberfläche gegeben. Nach Inkubation über Nacht und Verdunstung der Flüssigkeit wird das Gefäß zwei Mal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Neben Collagen I wird für die Kultivierung von PC12-Zellen auf Deckgläsern Matrigel (ECM-Gel) aus dem Engelberth-Holm Swarm Sarcom der Maus verwendet, welches hauptsächlich aus Laminin, Collagen IV, Heparansulphat-Proteoglycan, Entactin und Nidogen besteht (Carey et al. 1986). Zur Verflüssigung der 11,35 mg/ml Stammlösung wird diese bei 4 °C aufgetaut und anschließend mit gekühlten Pipettenspitzen in eiskaltem bidest. H<sub>2</sub>O auf 0,2 mg/ml verdünnt. Die Glas-Deckgläser werden über Nacht inkubiert (30 µg/cm<sup>2</sup>), die Lösung abgenommen und die Oberfläche ohne weitere Waschschriffe mit Zellen besiedelt. Für immunzytochemische Untersuchungen und die Messung des Neuritenwachstums werden die Zellen in Proliferationsmedium ausgesät und für 24 ± 2 h kultiviert. Am folgenden Tag wird das Proliferationsmedium durch Serum-reduziertes, NGF-haltiges Differenzierungsmedium ersetzt und die Zellen für 72 ± 2 h im Brutschrank inkubiert.

PC12-Differenzierungsmedium (van Bergeijk et al. 2006):

DMEM *high glucose*

1 % (v/v)	Pferde-Serum
6 mM	L-Glutamin
1 mM	Natriumpyruvat
100 IU/ml / 0,1 mg/ml	Penicillin/Streptomycin
100 ng/ml	NGF-β 7S

### 3.1.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293-Zellen stellen eine humane Zelllinie dar, die aus primären embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit Adenovirus Typ 5 DNA generiert wurde (Graham et al. 1977). HEK293T (293tsA1609neo) ist ein Derivat der Zelllinie und stammt ursprünglich aus dem Labor von M. Carlos an der Stanford University (DuBridge et al. 1987). Die Zellen exprimieren konstitutiv das große SV40 T-Antigen und lassen sich mit hoher Ausbeute transfizieren. HEK293T wurden dem Arbeitskreis von Priv. Doz. Dr. med. K. Krampfl aus der Klinik für Neurologie der Medizinischen Hochschule Hannover überlassen. Die Zellen werden zwei Mal pro Woche umgesetzt und auf unbeschichteten Kulturflaschen bei 37 °C und 8,5 % Kohlendioxid-Atmosphäre im befeuchteten Brutschrank kultiviert. Für immunzytochemische Untersuchungen werden die Zellen auf PLL-beschichteten Oberflächen ausgesät.

Medium für HEK293T-Zellen (Bruns et al. 2007):

DMEM *high glucose*

10 % (v/v)	Fetales Kälberserum
6 mM	L-Glutamin
1 mM	Natriumpyruvat
100 IU/ml / 0,1 mg/ml	Penicillin/Streptomycin

### 3.1.4 Kultivierung von primären Fibroblasten aus Patienten

Die primären humanen Fibroblasten wurden von Prof. Dr. Brunhilde Wirth der Universität Köln aus Hautbiopsien von SMA-Patienten gewonnen, in Kultur genommen, genetisch charakterisiert und dem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt. Die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule hat keine Bedenken gegen die molekularbiologischen Untersuchungen an den Patienten-Zellen in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. P. Claus geäußert (Bescheid vom 26.02.2002, Nr. 2879).

ML35 stellt eine Zellpopulation von einem gesunden Patienten dar, während ML63 und ML66 heterozygote SMA-Träger repräsentieren. Sie dienen als Kontrolle, während die Kulturen von ML16, ML17 und ML39 von SMA-Patienten Typ I stammen, die eine homozygote Deletion des SMN1-Gens aufweisen. ML17 und ML39 haben zwei, ML16 hat drei SMN2-Gen Kopien (Brichta et al. 2003). Die Kultivierung erfolgt im HEK293T-Medium auf unbeschichteten Zellkulturflaschen bei 37 °C und 8,5 % Kohlendioxid-Atmosphäre in einem befeuchteten Brutschrank. Die Zellen werden alle 14 bis 28 Tage umgesetzt.

### 3.1.5 Kryokonservierung von Vertebraten-Zellen

Die Konservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff bei -192 °C dient zum Schutz vor Kontaminationen und Veränderungen durch Kultivierung und Alterung. Beim Einfrierprozess beobachtet man extrazellulär und intrazellulär Eiskristallbildung. Extrazellulär führt die veränderte Osmolarität des Mediums zur Dehydratation der Zelle und zur Veränderung des pH-Wertes, während intrazellulär die Eiskristallbildung zur mechanischen Desintegration der Zelle führen kann (Meryman 1974). Die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) dient als Frostschutzzusatz und minimiert Schäden an den Zellen (Lovelock und Bishop 1959; Cavins et al. 1965; Anchordoguy et al. 1991).

Je nach Zelltyp werden 2 bis 4 Mio. Zellen in 1 ml Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO aufgenommen und in Cryo-Röhrchen abgefüllt. Diese werden zunächst über Nacht in einem Isopropanol ummantelten Behälter im -84 °C Tiefkühlschrank eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

## 3.2 Plasmide und Bakterienkultur

### 3.2.1 Aufbau der Plasmide

Die cDNA für das humane SMN<sup>wt</sup>-Protein wurde mit entsprechenden Primern aus dem entsprechenden pCMV-SPORT6 Vektor (Klon IMAGp998P0910174Q2, Deutsches Ressourcen Zentrum für Genomforschung - RZPD) amplifiziert. Die SMN-Deletionsmutanten wurden unter Verwendung entsprechender Primer und unter Einfuhr je einer EcoRI und Sall Restriktionsschnittstelle durch PCR erstellt. Nach Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden die PCR-Produkte in den pGEM-T Vektor eingesetzt, sequenziert und in einen pEGFP-N2 Vektor umkloniert (Claus et al. 2004; van Bergeijk et al. 2007). Das EGFP (enhanced green fluorescent protein) stellt eine photostabilere Mutation des monomeren grün fluoreszierenden Proteins aus der Seequalle *Aequorea victoria* dar und zeigt ein Absorptionsmaximum von 484 nm und ein Emissionsmaximum bei 510 nm.

Für die rekombinante Darstellung des Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelten Wildtyp-SMN-Proteins wurde die cDNA aus dem entsprechenden pGEM-T Vektor mit Hilfe der genannten Restriktionsenzyme in einen pET41a-Expressionsvektor umklontiert (Claus et al. 2004).

Die Gemin2 cDNA wurde in einem pSPORT6-Vektor vom RZPD (Klon IRAVp968A05103D6) bezogen (van Bergeijk et al. 2007). Für Immunfluoreszenz-Anwendungen wird zur Identifikation genetisch veränderter Zellen der pDsRed2-Vektor co-transfiziert. Das tetramere, rot fluoreszierende DsRed2-Protein, welches aus der Seeanemone *Discosoma striata* stammt, zeigt bei einer Absorption von 558 nm ein Emissionsmaximum bei 583 nm.

### 3.2.2 Darstellung von SMN-3xFlag-Fusionskonstrukten

Für Immunpräzipitationsversuche werden SMN-Deletionsmutanten mit einem dreifachen Flag-Anker bestehend aus den Aminosäure-Resten (DYKDDDDK)<sub>3</sub> versehen, der die Aufreinigung der Fusionsproteine und assoziierter Interaktionspartner ermöglicht. Zur Herstellung der pSMN-3xFlag-Fusionskonstrukte werden mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und SmaI die Inserts SMN1-294, SMN1-239 und SMN235-294 aus den entsprechenden pSMN-EFGP-N2 Plasmiden geschnitten. Hierzu werden 0,5 µg Plasmid-DNA zunächst mit 5 U SmaI in Tango-Puffer (Fermentas GmbH) für 3 h bei 30 °C verdaut. Anschließend erfolgt nach Fällung der DNA (s. Ziff. 3.2.9) das Schneiden mit 5 U EcoRI in entsprechendem Puffer (s. unten) für 3 h bei 37 °C.

Die Lösungen werden in DNA-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 1,5 % (w/v) Agarose-Gel in TBE-Puffer mit  $2 \times 10^{-4}$  % (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen und die DNA-Fragmente für ca. 45 min bei einer Spannung von 120 V elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt (Meyers et al. 1976). Zusätzlich wird ein 100 bp Marker und als Kontrolle ungeschnittener Vektor aufgetragen. Durch Interkalation des Chromophors Ethidiumbromid zwischen die Basen-Paare der DNA lässt sich mit Hilfe von UV-Licht und eines Geldokumentationssystems das aus dem Vektor geschnittene Insert identifizieren. Mit einer Minelute-Gelelektion der Firma Qiagen wird die DNA, wie im folgenden schematisch dargestellt, aufgereinigt. Die gewünschten DNA-Fragmente werden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten, gewogen und mit entsprechenden Volumina an Puffer nach Herstellerangaben (Qiagen GmbH) versetzt und bei 50 °C für 10 min. inkubiert. Es wird ein Gelvolumen an Isopropanol zugegeben und die Lösung auf die entsprechenden Zentrifugationssäulen gegeben. Nach dem Säulenauftrag und einem Waschschrift erfolgt die Elution der DNA-Fragmente mit bidest. H<sub>2</sub>O.

Ebenso wird 0,5 µg des p3xFlagCMV-14 Vektors mit 5 U BglII in Puffer-O (Fermentas GmbH) für 3 h bei 37 °C verdaut und über eine Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend werden die 5' Überhänge mit Hilfe der 5'-3'-Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes aufgefüllt. Hierzu werden 1 µg geschnittener Vektor in Klenow-Puffer (Fermentas GmbH) mit 5 U Klenow-Fragment versetzt und für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Inkubation bei 70 °C für 10 min. beendet.

Für die Ligation werden linearisiertes Plasmid und Insert im Verhältnis 1:3 mit 5 U T4-DNA-Ligase in Ligase-Puffer (Promega GmbH) gegeben und über Nacht bei 15 °C inkubiert (Ferretti und Sgaramella 1981). Durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min. im Wasserbad wird die Reaktion beendet. Nach

Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  und Plasmid-Präparation erfolgt eine DNA-Fällung und Sequenzierung.

EcoRI-Puffer (Fermentas GmbH): 100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/ml BSA; 0,02 % Triton-X-100

Klenow-Puffer (Fermentas GmbH): 50 mM Tris-HCl pH8,0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT, 2 mM dNTP-Mix

Probenpuffer: 1,17 M D-(+)-Saccharose; 100 mM EDTA; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Puffer-O (Fermentas GmbH): 100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/ml BSA

T4 Ligase-Puffer (Promega GmbH): 30 mM Tris-HCl pH7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM ATP

Tango-Puffer (Fermentas GmbH): 33 mM Tris-Acetat pH7,9; 10 mM Magnesiumacetat; 60 mM Kaliumacetat; 0,1 mg/ml BSA

TBE-Puffer: 89 mM Tris; 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

### 3.2.3 Design der siRNA und shRNA

Bei dem RNA-Interferenz vermittelten knock-down der mRNA-Translation eines Proteins wird durch die Einfuhr kleiner RNA-Moleküle (siRNA: small interfering RNA) der Abbau einer spezifischen mRNA Population in der Zelle induziert und so der Spiegel eines einzelnen Proteins herabgesetzt (Fire et al. 1998; Elbashir et al. 2001). Die 24 Nukleotid große doppelsträngige siRNA für den knock-down von Gemin2 wurde gegen die Nukleotide 351-375 der Gemin2 mRNA (Genbank Nr. NM\_053389.1) aus *Rattus norvegicus* generiert (Sequenz des sense-Stranges: 5'-GGCCGACACACAAGUGACAUAAGAGUU-3') (van Bergeijk et al. 2007). Eine willkürliche Sequenz, generiert aus den Nukleotiden des sense-Stranges, die keine Homologie zu bekannten Sequenzen zeigt, wird als Kontrolle verwendet (Sequenz des sense-Stranges: 5'-GGCCGACACAAGUGACAUAAGAGUU-3'). Nach Synthese der jeweiligen komplementären Stränge und Hybridisierung werden die Zellen mit dem liposomalen Reagenz Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 transfiziert (s. Ziff. 3.3.1) (van Bergeijk et al. 2007).

Für den SMN knock-down wird der pSuppressor-Vektor (Imgenex) verwendet, der ein doppelsträngiges RNA Fragment mit einer zusätzlichen Haarnadelschleife (shRNA: short-hairpin RNA) unter Kontrolle des U6 Promoters kodiert. Es wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die über eine Länge von 20 Nukleotiden der kodierenden Sequenz des SMN-Gens aus *R. norvegicus* entsprechen (Genbank-Nr.: NM\_022509). Die verwendeten Oligonukleotide für den sense-Strang (PC127-F) und den anti-sense-Strang (PC128-R) sind unten aufgeführt, wobei die das SMN-Gen im Bereich der Nukleotide 353-371 kodierende Sequenz in Groß-, die Haarnadelschleife kodierende Sequenz in kursiven Kleinbuchstaben gekennzeichnet ist:

PC127-F: 5'-tcg agG AGA AAC CTG TGT CGT GGT *Tga gta ctg* AAC CAC GAC ACA GGT TTC Tct ttt t-3'

PC128-R: 5'-cta gaa aaa GAG AAA CCT GTG TCG TGG *TTc agt act cAA* CGA CAC AGG TTT CTC c-3'

Zusätzlich wurden für die Klonierung mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI Sequenzen mit den entsprechenden Schnittstellen eingeführt, die durch Kleinbuchstaben markiert sind. Die Haarnadelschleife enthält außerdem eine Restriktionsschnittstelle für Scal, um Klone mit Plasmid und entsprechendem SMN-Konstrukt identifizieren zu können. Der fertige pSuppressor-Vektor (pSupp.SMN) wurde anschließend zur Kontrolle sequenziert (van Bergeijk et al. 2007).

### 3.2.4 Erzeugung kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen

Durch den Einsatz von divalenten Kalziumionen wird temporär die Permeabilität der Membran für Plasmid-DNA erhöht, so dass die Transformation dieser als kompetente Zellen beschriebenen Bakterien erleichtert wird (Mandel und Higa 1970). 4 ml LB-Medium werden mit *E. coli* DH5 $\alpha$  oder BL21(DE3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert (Ü/N-Kultur). Anschließend werden 40 ml LB-Medium im Verhältnis 10:1 mit 0,4 ml der Ü/N-Kultur angeimpft und bei 37°C für 2-3 h inkubiert. Bei einer OD<sub>550</sub> von 0,3 wird die Suspension für 10 min. bei 3000 x g zentrifugiert, das Pellet mit 20 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30 min. auf Eis gelagert. Es wird erneut für 10 min. bei 3000 x g zentrifugiert, das Pellet in 4 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 800  $\mu$ l Glycerin versetzt. Aliquots à 200  $\mu$ l werden abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -84°C.

### 3.2.5 Transformation von *E. coli* Stämmen

Für die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  und BL23(DE3) Zellen werden diese auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu$ g Plasmid-DNA versetzt und für 20 min. auf Eis gelagert. Anschließend wird für 1 min. bei 42 °C und für 2 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wird die Lösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 22000 x g wird der Überstand bis auf ca. 200  $\mu$ l abgenommen, das Pellet resuspendiert und auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht wird die Platte über Tag im Kühlschrank gelagert. Abends wird eine einzelne Kolonie gepickt und zum Animpfen von 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum verwendet.

Antibiotika-Konzentrationen:

Resistenz	pEGFP	pDsRed2	pSuppressor	p3xFlag-CMV14	pSPORT6	pET41a	pGEM-T
Kanamycin 30 $\mu$ g/ml	X	X	X			X	
Ampicillin 100 $\mu$ g/ml				X	X		X

Gentyp der Stämme

DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup> endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>+</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) glnV44 thi-1 recA1 gyrA(Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$ (lacZIZYA-argF) U169 deoR L $\Phi$ 80 dlac $\Delta$ (lacZ)M15

BL23(DE3): F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>b</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup> m<sub>b</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)

### 3.2.6 Plasmid-Isolation aus *E. coli* DH5 $\alpha$

Die transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  Stämme werden für die Lagerung bei -84 °C 1:1 mit Glycerin versetzt. Abhängig von der benötigten Menge an Plasmid-DNA und der damit verbundenen Art der Präparation (Mini- oder Maxi-Präparation) werden zwischen 5 ml und 100 ml 2 x LB-Medium mit Bakterien angeimpft, über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert und entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet (Qiagen). Die Isolation und Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und wird hier nur skizziert (Birnboim 1983).

Die Ernte erfolgt bei einer optischen Dichte der Bakterien-Suspension von  $OD_{600} \sim 0,4$  durch Zentrifugation. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in einem RNase-haltigen Tris-EDTA-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgt die Lyse der Zellen mit einem alkalischen SDS-Puffer, wobei die Lösung nach wenigen Minuten durch Zugabe eines Essigsäure-Puffers neutralisiert wird. Bei der Mini-Präparation erfolgt die Trennung der löslichen Plasmid-DNA von Zelltrümmern und chromosomaler durch Zentrifugation. Bei der Maxi-Präparation wird die Lösung über eine Filtersäule aufgereinigt. Die geklärte Lösung wird anschließend auf eine äquilibrierte Anionen-Austauscher-Säule auf Kieselgel-Basis gegeben. Nach zwei Waschschrritten erfolgt bei der Mini-Präparation die Elution über Zugabe von 10 mM Tris-HCl pH8,0; 1 mM EDTA-Puffer und erneuter Zentrifugation. Für die Maxi-Präparation wird die Plasmid-DNA durch Zugabe eines Puffers mit hoher NaCl-Konzentration von der Säule gewaschen. Für die Fällung der Nukleinsäure wird die Lösung mit 2/3 Äquivalenten Isopropanol versetzt und bei 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte DNA wird zum Lösen des Salzes mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Plasmid-DNA-Pellet an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lösung und spätere Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt in 10 mM Tris-HCl pH8,0 mit 1 mM EDTA.

### 3.2.7 Proteinextraktion aus *E. coli* BL21(DE3)

Es wird zunächst eine Ü/N-Kultur mit pET41a bzw. pET41a-SMN1-294 transformierten *E. coli* BL21(DE3) Stämmen angelegt und zum Animpfen von 40 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin verwendet. Bei einer  $OD_{550} = 0,5$  erfolgt die Induktion der Genexpression mit 0,4 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und eine weitere Inkubation für 3 h. Anschließend werden die Zellen für 10 min. bei 7600 x g zentrifugiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren, um die folgende Lyse zu erleichtern. Das Pellet wird gewogen, im Gewicht/Volumen-Verhältnis 3:1 mit BugBuster-Lösung (Novagen) resuspendiert und für 30 min. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Lösung bei 4 °C und 22000 x g für 30 min. zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wird auf 100 µl Glutathion-gekoppelte Beads gegeben, die zuvor zwei Mal mit Wasch-Puffer gespült worden sind. Es folgt die Inkubation der Beads mit den rekombinanten GST-Fusionsproteinen für 30 min. bei RT auf dem Überkopf-Schüttler. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 2 min. wird jeweils drei Mal mit Wasch-Puffer und PBS gewaschen und die Beads in PBS mit 2 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Für eine grobe Proteinbestimmung der Beads wird eine serielle Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) in PBS aufgestellt und 10 µl Beads-Suspension 1:1 mit 2xLaemmli-Puffer versetzt. Nach Denaturierung bei 96 °C für 5 min. werden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. Ziff. 3.5.3), dieses nach der Elektrophorese mit Coomassie G250 gefärbt (s. Ziff. 3.5.5) und die Bandenintensität der Beads-Proben mit denen der seriellen Verdünnungsreihe verglichen.

BugBuster-Lösung : 5000 U Lysozym/ g Pellet; 25 U/ml Benzonase, 2 % Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei) in 1x BugBuster der Firma Novagen

Wasch-Puffer (pH7,3): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

2xLaemmli-Puffer: 125 mM Tris-HCl pH6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

### 3.2.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten. Da in einer 10 mm starken Quarzküvette eine Lösung mit 50 µg/ml dsDNA einen  $OD_{260}$ -Wert von 1 besitzt, kann ohne weitere Berücksichtigung der molaren Absorptionskoeffizienten einzelner Nukleotide die Konzentration hinreichend genau bestimmt werden (Sambrook et al. 1989). Die DNA-Konzentration wird wie folgt bestimmt, wobei F den Verdünnungsfaktor und K einen spezifischen Faktor für die Art der Nukleinsäure darstellt ( $K_{DNA}$ : 50;  $K_{RNA}$ : 40):  $c_{(DNA)} = OD_{260nm} \times F \times K_{DNA}$  [µg/ml]

### 3.2.9 DNA-Fällung

2 µg Plasmid-DNA werden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 3 M Natriumacetat auf 300 mM Natriumacetat verdünnt, mit 2 Äquivalenten 96 % (v/v) Ethanol versetzt und für 15 min. bei 22000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird zwei Mal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

## 3.3 Transfektion von Vertebraten-Zellen

Die Transfektion von DNA oder auch siRNAs zur genetischen Modifizierung von Zellen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die bei der Wahl der Transfektionsmethode berücksichtigt werden müssen. Neben der Präzipitation von DNA mit Kalziumphosphat oder dem Einschluss von Nukleinsäuren in Liposomen, gibt es die Möglichkeit einer transienten Perforation der Zellmembran durch einen elektrischen Puls bei der Elektroporation (Wong und Neumann 1982; Felgner et al. 1987; Chen und Okayama 1988; Klenchin et al. 1991; Sukharev et al. 1992). Die Kombination von Transfektionsreagenzien mit einem elektrischen Feld wird bei der *Nukleofektion* eingesetzt (Gresch et al. 2004).

### 3.3.1 Transfektion mit Metafectene<sup>®</sup> und Lipofectamine 2000<sup>®</sup>

Metafectene<sup>®</sup> und Lipofectamine 2000<sup>®</sup> basieren auf kationischen Lipiden. Für die Transfektion mit Metafectene<sup>®</sup> werden im 24-well zunächst 30000 Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank gelagert. Dann werden 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl Metafectene<sup>®</sup> jeweils in 30 µl serumfreiem Medium verdünnt, die Lösungen zusammen gegeben und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Gemisch vorsichtig auf die Zellen pipettiert und diese zurück in den Inkubator überführt. Bei der Co-Transfektion von zwei Plasmiden (z.B. pDsRed2 und pSuppressor) werden von jedem Plasmid 1 µg DNA zusammengegeben und anschließend mit 4 µl Metafectene<sup>®</sup> vermischt. Für die Transfektion von Zellen mit siRNAs wird das Reagenz Lipofectamine 2000<sup>®</sup> verwendet, welches zu einer höheren Transfektionsausbeute führt. Im 24-well Format werden 50 pmol dsRNA mit 1 µl Lipofectamine 2000<sup>®</sup> jeweils in 30 µl serumfreiem Medium angesetzt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Lösungen vorsichtig gemischt und für weitere 20 min. bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Bei der Co-Transfektion mit Fluorescein-markierten

Oligonukleotiden bzw. pDsRed2-Vektor werden jeweils 50 pmol RNA bzw. 1,2 µg Plasmid-DNA zusätzlich zugesetzt und insgesamt 2 µl Lipofectamine 2000<sup>®</sup> verwendet.

### **3.3.2 Transfektion mit Polyethylenimin**

Die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) ist eine sehr kostengünstige Methode und wird hier für die Transfektion von HEK293T-Zellen zur Gewinnung von großen Mengen an Zelllysat verwendet (Ehrhardt et al. 2006). Es werden 300.000 Zellen in einer 60 mm Petri-Schale ausgesät und über Nacht im Brutschrank gelagert. Dann werden 5,8 µg Plasmid-DNA und 17,3 µl Polyethylenimin-Lösung (PEI, 1 mg/ml mit HCl auf pH7) jeweils in 350 µl serumfreiem Medium verdünnt, vermischt und anschließend für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA/PEI-Lösung wird auf den Zellen verteilt und diese im Brutschrank für  $24 \pm 2$  h inkubiert.

### **3.3.3 Elektroporation**

Die Transfektion der PC12-Zellen erfolgt in einer 4 mm Küvette mit einem Puls im EasyJecT Elektroporator in der Abteilung für Neurologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Für die Optimierung werden die Zellzahl (1.000.000 vs. 3.000.000), die Menge an Plasmid-DNA sowie am Gerät die Spannung (260, 300 oder 350 V) und die Kapazität (750, 975, 1050 und 1500 µF) moduliert, während der Nebenwiderstand konstant bei 335 Ω bleibt. Die Transfektionsrate wird nach Fixierung der Zellen über das Verhältnis von fluoreszierenden, transfizierten Zellen zur Gesamtzellzahl durch 4',6-Diaminphenylindol (DAPI)-Markierung bestimmt. Bei Transfektionsausbeuten von unter 20 % bzw. einer Letalität von über 50 % wird der Versuch bei diesen Parametern nicht wiederholt. Unter Berücksichtigung der Vitalität stellen 3 Millionen Zellen und 90 µg DNA sowie eine Spannung von 350 V und Kapazität von 975 µF die idealen und später verwendeten Bedingungen für die Elektroporation dar. Die Zellen werden direkt nach dem Puls je nach Anwendung in Proliferationsmedium verdünnt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Standardmäßig werden für die Elektroporation 1.000.000 Zellen in 500 µl Proliferationsmedium aufgenommen, mit 30 µg Plasmid-DNA versetzt und auf ein Volumen von 600 µl aufgefüllt. Bei der Co-Transfektion von zwei oder drei Plasmiden werden von jedem Plasmid 30 µg DNA eingesetzt. Für proteinchemische Untersuchungen von PC12-Zellen bei SMN knock-down werden 3.000.000 Zellen mit 90 µg pSuppressor-Plasmid elektroporiert und über Nacht unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Zur Anreicherung transfizierter Zellen wird anschließend mit 750 µg/ml Geniticin in Differenzierungsmedium für  $72 \pm 2$  h selektioniert.

## **3.4 Immunzytochemie**

Bei der Immunzytochemie (ICC) werden bestimmte intra- oder extrazelluläre Antigene mit spezifischen Antikörpern markiert. Durch Verwendung unterschiedlich fluoreszierender Antikörper können so Verteilungsmuster von bestimmten Proteinen oder Strukturen in der Zelle ermittelt werden.

### 3.4.1 Fixierung von Zellen

Vor der immunzytochemischen Markierung werden die Zellen entweder mit Paraformaldehyd (PFA) oder  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Methanol fixiert. Das polymere PFA wird bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  in PBS suspendiert und löst sich unter Bildung reaktiver Formaldehyd-Monomere. Zunächst wird eine 8 %ige (w/v) PFA-Lösung mit einem  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  Filter geklärt und als Stock-Lösung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Fixierung wird ein Aliquot bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, mit PBS 1:1 verdünnt und für 15 min. auf die Zellen gegeben. Anschließend werden diese in Abständen von 5 min. dreimal mit PBS gewaschen.

Die Fixierung mit Methanol erfolgt nur bei nichttransfizierten Zellen, da es zu einer Abnahme des Fluoreszenz-Signals durch Methanol kommt. Der  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalte Alkohol wird direkt auf die Zellen gegeben. Die Dauer der Applikation und die Anzahl der Waschschrte werden wie bei der Verwendung von PFA eingehalten.

### 3.4.2 Immunzytochemische Markierung

Die fixierten Zellen werden mit 5 % (w/v) BSA in PBS mit 0,3 % (v/v) Triton-X-100 für 60 min. vorinkubiert. Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen und Permeabilisierung der Zelle erfolgt die Inkubation mit dem ersten Primärantikörper in 1 % (w/v) BSA in PBS und 0,3 % (v/v) Triton-X-100 für 180 min. Nach dreimaligen Waschen in PBS erfolgt eine zweite Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 1 % (w/v) BSA in PBS für 150 min. Es folgen erneut drei Waschschrte mit PBS. Für die Markierung eines weiteren Antigens im Rahmen einer Co-Lokalisationsuntersuchung werden die Zellen erneut für 1 h mit 5 % (w/v) BSA in PBS vorinkubiert und anschließend mit dem zweiten Primär- (120 min.) bzw. Sekundärantikörper (90 min.) in 1 % (w/v) BSA in PBS inkubiert. Die Kernmarkierung speziell von Chromatin erfolgt mit  $3\text{ }\mu\text{M}$  4',6-Diaminphenylindol (DAPI) in PBS für 15 min.. Die Zellen werden mit PBS gespült und an einem inversen IX70 Olympus Mikroskop untersucht. Für die Betrachtung an einem konfokalen Mikroskop werden die auf Deckgläsern kultivierten Zellen nach der immunzytochemischen Markierung mit  $30\text{ }\mu\text{l}$  ProLong Gold Antifade auf Objektträgern eingebettet.

### 3.4.3 Bildverarbeitung

Die fixierten Zellen werden entweder unter einem inversen Olympus IX70-Epifluoreszenzmikroskop mit CCD Digitalkamera (Colorview-II) oder einem konfokalen Leica TCS SP2 Mikroskop untersucht (Lichtman und Conchello 2005; Ehrhardt et al. 2006). Die Aufnahmen am Olympus IX70 werden mit einem UPlan FI (10x, numerische Apertur 0,3) und zwei LCPlan FI (20x, numerische Apertur 0,4 und 40x, numerische Apertur 0,6) Objektiven sowie den Filtereinsätzen UMNU (360-370 nm, Sperrfilter  $>420\text{ nm}$ ), UMNb (470-490 nm, Sperrfilter  $>515\text{ nm}$ ) und UMNG (530-550 nm, Sperrfilter  $>590\text{ nm}$ ) aufgenommen. Am Leica TCS SP2 werden die Öl-Immersionsobjektive HCX PL APO CS40 (40x, numerische Apertur 1,25) HCX PL APO BL (63x, numerische Apertur 1,4) verwendet. Die Aufnahme von Fotos und die Fluoreszenzverarbeitung erfolgt mit Hilfe der Programme *analySIS3.0*<sup>®</sup> bzw. *LCS Lite*<sup>®</sup> (*Leica convocal software*) und Adobe Photoshop CS2<sup>®</sup>.

### 3.5 Proteinchemie

#### 3.5.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen zur Untersuchung der Genexpression

Zur semi-quantitativen Untersuchung der Genexpression in Zellen werden diese einmal mit PBS gespült und für 10 min. mit Radioimmunpräzitationspuffer (RIPA-Puffer) auf Eis inkubiert (20  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Die Zellen werden mit einer 25G Kanüle geschert und bei 15000 x g und 4 °C für 30 min. zentrifugiert. Das Pellet mit chromosomaler DNA und Zelltrümmern wird verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand mit einem BCA-Assay bestimmt (s. Ziff. 3.5.2). Die Lagerung der Proben erfolgt bei -84 °C. Die Proben werden anschließend normalisiert, so dass äquivalente Proteinmengen auf das Gel aufgetragen werden können. Die Verdünnungen werden 1:1 mit 2xLaemmli-Puffer versetzt (s. Ziff. 3.2.7), denaturiert und auf ein SDS-Gel gegeben (s. Ziff. 3.5.3). Es folgt der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (s. Ziff. 3.5.6) und die Inkubation mit entsprechenden Antikörpern.

RIPA-Puffer:

137 mM NaCl; 50 mM NaF; 20 mM Tris-HCl pH7,5; 25 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 2 mM EDTA; 1 mM Natrium-Orthovanadat; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 2 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei); 1 % (v/v) Triton-X-100, 1 % (w/v) Natrium-Desoxycholat; 1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1

#### 3.5.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wird qualitativ über einen Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) bestimmt (Smith et al. 1985). Grundlage bildet die Biuret-Reaktion, bei der es unter Verwendung von Carbamoylharnstoff (Biuret) und Kupfersulphat zur Bildung eines Farbkomplexes aus Cu(II) Ionen und zwei Amidbindungen kommt. Beim BCA-Assay wird das Reduktionspotential von Proteinen unter alkalischen Bedingungen genutzt, um Cu(II) zu Cu(I) zu reduzieren, welches dann mit dem Salz der Bicinchoninsäure komplexiert (Wiechelman et al. 1988). Der dabei entstehende violette Farbkomplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 562 \text{ nm}$ .

Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe einer seriellen Verdünnungsreihe eines BSA-Proteinstandards zwischen 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  auf einer 96-*well*-Platte. Neben den Verdünnungsstufen und PBS als Leerprobe werden alle Proben als Triplikate aufgetragen. Pro *well* werden 25  $\mu\text{l}$  Probenlösung vorgelegt, zügig mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reaktionsreagenz (2 % (v/v) Pierce BCA-Reagenz B in BCA-Reagenz A) versetzt und für 15 min. bei 37 °C inkubiert. Es erfolgt die Absorptionsmessung bei 580 nm in einem BioTek-Multiplate Reader.

#### 3.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese in einem Natriumdodecylsulfat-haltigen Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) geht auf U.K. Laemmli und J.V. Maizel zurück und wurde erstmals für die Auftrennung von Strukturproteinen des Bakteriophagen T4 verwendet (Laemmli 1970). Es werden zwei Gele kombiniert, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße unterscheiden. Im weitporigen Sammelgel wird die Mobilität durch die Ladung bestimmt und die Proteine werden in einer Bande fokussiert. Im sich anschließenden Trenngel sinkt die Porengröße, während der pH-Wert steigt, und es folgt eine

Trennung der Proteine nach ihrer Masse.

Es wird je nach Anwendung zunächst ein 10 – 15 % Trenngel gegossen und mit bidest. H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach der Polymerisation wird eine 5 %iges Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen und vor dem Aushärten mit einem 10er Kamm (Taschenvolumen von ca. 50 µl) versehen. Die in 2xLaemmli-Puffer (s. Ziff. 3.2.7) aufgenommenen Proben werden für 5 min. bei 96 °C denaturiert und neben einem farbigen Größenmarker mit Hilfe einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in einer Bio-Rad II Kammer bei konstanter Spannung von 100 V für 10 min. und 180 V bis der Marker das Gel-Ende erreicht hat.

Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 3,5 mM SDS

Trenngelpuffer: 1,12 M Tris-HCl pH8,8; 10 mM SDS

Sammelgelpuffer: 274 mM Tris-HCl pH6,8; 20 mM SDS

Trenngel:	10 %	12,5 %	15%
Bidest. H <sub>2</sub> O [ml]	7,5	6,35	5,25
Trenngelpuffer [ml]	6	6	6
40 % Acrylamid-Lösung (Acrylamid-Bisacrylamid 29:1) [ml]	4,5	5,65	6,75
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) [µl]	9		
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulphat (APS) [µl]	180		
Gesamtvolumen [ml]	18,189		

6 ml Sammelgel (5 %): 3,7 ml bidest. H<sub>2</sub>O + 1,3 ml 40 % Acrylamid-Lösung (29:1) + 1 ml Sammelgelpuffer + 3 µl TEMED + 60 µl 10 % APS.

### 3.5.4 2D-Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Klose und O'Farrell findet die Auftrennung eines Proteingemisches nach Ladung bzw. pH-Wert und Größe statt (Klose 1975; O'Farrell 1975). Nach der isoelektrischen Fokussierung in einem Polyacrylamid-Gel mit immobilisierten pH-Gradienten durch entsprechende Ampholyte findet eine Aufspaltung der Probe nach Größe durch eine SDS-PAGE statt (Bjellqvist et al. 1982). Das Verfahren erhöht die Auflösung und ermöglicht die Untersuchung von posttranslationalen Modifizierungen, die den isoelektrischen Punkt des Proteins verändern.

Die Zellysate (s. Ziff. 3.5.1) werden in Slide-A-Lyzer Dialyse-Rahmen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa für 24 ± 2 h gegen (3x) 600 ml bidest H<sub>2</sub>O dialysiert. Die Lösung wird durch Gefriertrocknung bei -80 °C für 4 ± 1 h eingengt und die Proteinmenge über einen BCA-Assay bestimmt. Für die 2D-Gelelektrophorese wird das ZOOM<sup>®</sup>-IPGRunner System von Invitrogen entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Hierzu wird pro Ansatz ein ZOOM<sup>®</sup>-Streifen (pH-Bereich 4 – 7) mit 150 µg Protein 1:1 in Proben-Rehydratationspuffer aufgenommen und über Nacht in der IPGRunner-Kassette inkubiert. Am folgenden Tag wird die IPGRunner-Zelle zusammengebaut und 650 ml bidest. H<sub>2</sub>O befüllt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgt diskontinuierlich über eine Spannung von 200 - 2000 V für 2 h (200 V: 20 min.; 450 V: 15 min.; 750 V: 15 min.; 2000 V: 105 min.) bei konstanter Leistung von 1 W und einer Stromstärke von 1 mA. Anschließend werden die ZOOM<sup>®</sup>-Streifen für 15 min. in 5 ml 2 x-SDS-Puffer auf dem Schüttler

inkubiert und mit Hilfe einer Pinzette auf ein 5 % Sammelgel mit 15 % Trenngel für die SDS-PAGE überführt. Durch Überschichten mit 70 °C warmer 0,5 % (w/v) Agarose in Elektrophorese-Puffer wird der Streifen fixiert. Es folgt die SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot zur Analyse der Proben.

Rehydratationspuffer: 91 % (v/v) 1.1x ZOOM® 2D Protein-Solubilizer-1 (Invitrogen GmbH); 20 mM Dithiothreitol (DTT); 0,8 % (v/v) ZOOM® Carrier Ampholytes (pH4-7, Invitrogen GmbH); 0,05 % (w/v) Bromphenol-Blau

2x-SDS-Puffer: 125 mM Tris-HCl pH6,8; 140 mM SDS; 20 mM DTT; 0,03 mM Bromphenol-Blau; 20 % (v/v) Glycerin

### 3.5.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach der SDS-PAGE wird das Gel in die Coomassie-Färbelösung gegeben und über Nacht in dieser auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gel mit der Entfärbelösung gewaschen, bis das gewünschte Banden/Hintergrund-Verhältnis erreicht ist. Anschließend erfolgt eine Rehydratation in bidest. H<sub>2</sub>O für 15 min. und eine Fixierung in der entsprechenden Lösung (s. unten) über Nacht.

Coomassie-Lösung: 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 1,25 mg/ml (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

Entfärbelösung: 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Fixierlösung: 20 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Glycerin

### 3.5.6 Westernblot

Mit dem Westernblot (WB)-Verfahren wird eine Replica einer Proteinprobe, die elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurde, erzeugt. Anschließend können durch Verwendung spezifischer Antikörper einzelne Banden markiert und analysiert werden (Towbin et al. 1979). Die Proteine werden zuerst in einem SDS-haltigen Gel ein- oder zweidimensional aufgetrennt. Danach erfolgt die elektrophoretische Übertragung der Proben vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. Ähnlich wie bei der Immunzytochemie erfolgt der visuelle Nachweis einzelner Proteinproben über Primär- und Sekundärantikörper. Letztgenannte sind an eine Peroxidase gekoppelt, die die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid unter Emission von Lichtquanten katalysiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilms werden die Signale nachgewiesen.

Die Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgt durch ein von außen angelegtes elektrisches Feld konstanter Spannung von 120 V für 60 min. in Transfer Puffer. Zwei Schwämme der Apparatur, zwei 3 mm Whatman Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran werden in Transferpuffer eingeweicht und in diesem sandwichartig zusammengelegt.

**Kathode:** Schwamm<sub>1</sub>-Whatmann-Filterpapier<sub>1</sub>-Gel-Membran-Whatmann-Filterpapier<sub>2</sub>-Schwamm<sub>2</sub>; **Anode**

Nach dem Elektroblothing wird die Nitrozellulose-Membran einmal in TBST-Lösung gewaschen. Die Membran wird anschließend mit einer 5 % (w/v) Proteinlösung in TBST inkubiert, die auch zur Verdünnung der Antikörper verwendet wird. Je nach Herstellerangaben der Antikörper wird entweder BSA oder Milchpulver eingesetzt. Nach einer Blockierung der Membran für 60 min. bei Raumtemperatur wird der Primärantikörper zugegeben und die Membran mit diesem über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschrritten für jeweils 5 min. in TBST erfolgt die Zugabe des

Sekundärantikörpers für 1 h. Anschließend wird die Membran sechs Mal mit TBST gespült und in der Dunkelkammer auf Cellofan-Folie mit 2 ml Pierce ECL-Substrat-Lösung (Lösung A und Lösung B 1:1) für 1 min. inkubiert. Nach Einschlagen der Membran in die Folie wird ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Signalintensität zwischen 15 s und 5 h exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgt für 1 – 2 min. im Entwicklerbad. Nach dem Spülen mit entionisiertem Wasser wird der Film für 10 min. im Fixierer (Kodak) gebadet, erneut in dH<sub>2</sub>O gewaschen und an der Luft getrocknet.

Für die Inkubation mit einem weiteren Antikörper wird die Membran zunächst einmal mit TBST gewaschen und anschließend für 10 min. in 100 mM Glycin-HCl pH2,5 inkubiert. Nach drei Waschschritten für 5 min. in TBST erfolgt die Reinkubation mit einer 5 % (w/v) Proteinlösung wie oben beschrieben.

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

TBST-Puffer: 137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH7,6; 0,1 % (v/v) Tween-20

### **3.5.7 Densitometrie der Signale auf dem Röntgenfilm**

Der Westernblot dient primär dem Nachweis von bestimmten Proteinen in Lösungen. Aufgrund zahlreicher Gleichgewichtsreaktionen sind Signalintensität und Proteinmenge nur eingeschränkt linear, so dass nur semi-quantitative Aussagen über Konzentrationsveränderungen möglich sind. Die entwickelten Röntgenfilme werden mit einem AGFA 1212u Scanner digitalisiert und die Banden mit Hilfe des Programms ScionImage Vers. 4.032 und dem Makro Gelplot2 densitometriert. Die Mittelwerte mit dem Fehler der Standardabweichung werden statistisch analysiert.

## **3.6 Molekularbiologische und funktionelle Assays**

### **3.6.1 Co-Immunpräzipitation**

Die Co-Immunpräzipitation dient dem Nachweis einer Bindung zweier Proteine in einer Zelle *in vivo*, wobei die Interaktion nicht direkt erfolgen muss, sondern über Proteine, Nukleinsäuren oder andere Bindungspartner vermittelt werden kann.

Es werden 50 µl einer 50 % (w/v) Protein-G-gekoppelten Agarose-Beads Suspension in Immunpräzipitationspuffers (IP-Puffer) aufgenommen und für 5 min. auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Äquilibration der Beads mit IP-Puffer erfolgt durch einmaliges Waschen mit Puffer, Zentrifugation (700 x g, 30 sec.) und erneutes Spülen der Beads auf dem Schüttler über Nacht. Am nächste Tag werden die Zellen (HEK293T bzw. PC12) in eiskaltem IP-Puffer suspendiert und mit einer Ultraschall-Sonde (6 Pulse à 1 sec. mit ca. 17 % Energie) auf Eis aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C für 30 min. erfolgt eine BCA-Proteinbestimmung des Überstandes (s. Ziff. 3.5.2).

Für die Aufreinigung eines Proteins werden pro Ansatz ca. 600 µg Zellextrakt mit 2 µg Antikörper in 500 µl IP-Puffer verdünnt und in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung auf die äquilibrierten Agarose-Beads gegeben und für 90 min. bei 4 °C

geschüttelt. Die Beads werden vier Mal mit Puffer und zwei Mal mit PBS gewaschen und danach in 50 µl 1xLaemmli-Puffer aufgekocht. Der Nachweis erfolgt über SDS-PAGE und Westernblot.

Für die Optimierung der IP-Puffer-Bedingungen wurden Tris- und phosphatgepufferte Lösungen sowie der Zusatz verschiedener Konzentrationen von Natriumchlorid, BSA und Igepal-CA630 sowie die Verwendung alternativer Beads (magnetische Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH) getestet. Die idealen Pufferbedingungen für Protein-G-gekoppelte Agarose-Beads sind aufgeführt.

IP-Puffer (pH7,4): 136,9 mM NaCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF; 2 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei); 1 % (v/v) Triton-X-100,

### 3.6.2 Pull-down von Actin mit dem Fusionsprotein SMN1-294-GST

Der pull-down dient zum Nachweis einer direkten Interaktion von zwei Proteinen *in vitro*. Es werden hierzu ungefähr 10 µg SMN1-294-GST bzw. GST-Protein auf Beads (s. Ziff. 3.2.7) einmal für 5 min. mit Puffer-A versetzt, auf dem Überkopf-Schüttler gewaschen und anschließend in Puffer-B für 30 min. auf diesem bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Ansatz werden 5 µg Actin in 700 µl Puffer-B aufgenommen und für 90 min. bei 4 °C zu den Beads auf den Schüttler gegeben. Anschließend erfolgen sechs Waschstschritte bei Raumtemperatur: 1 x für 5 min. in Puffer-B, 2 x in Puffer-C für 5 min., 1 x in Puffer-C für 10 min. und 2 x in Puffer-A für 5 min. Die Beads werden 2xLaemmli-Puffer (s. Ziff. 3.2.7) aufgenommen, aufgekocht und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel gegeben (s. Ziff. 3.5.3). Der Nachweis von Actin erfolgt über einen Westernblot (s. Ziff. 3.5.6).

Puffer-A: 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH7,5

Puffer-B: 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH7,5; 25 mM β-Glycerophosphat; 2 mM EDTA; 1 mM Natrium-Orthovanadat; 5 % (w/v) Milchpulver; 2 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei); 1 % (w/v) Natrium-Desoxycholat; 1 % (v/v) Triton-X-100; 0,1 (v/v) % Igepal-CA630

Puffer-C: 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH7,5; 25 mM β-Glycerophosphat; 2 mM EDTA; 1 mM Natrium-Orthovanadat; 2 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei); 1 % (w/v) Natrium-Desoxycholat; 1 % (v/v) Triton-X-100; 0,1 % (v/v) Igepal-CA630

### 3.6.3 G- / F-Actin Assay

Mit Hilfe des G-/F-Actin Assays kann über Ultrazentrifugation und Fraktionierung des Zelllysates das Verhältnis von monomeren G-Actin (globulär) zu polymerisiertem F-Actin (filamentös) in der Zelle bestimmt werden (Tu et al. 2003). Die Benutzung einer Sorvall-Ultrazentrifuge erfolgt nach Rücksprache mit Prof. Dr. med. Ingo Just und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ralf Gehard am Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Zellen aus zu 80 % konfluent bewachsenen 60 mm Petri-Schale werden hierzu einmal mit vorgewärmten (37 °C) PBS gewaschen und anschließend in 500 µl temperierten (37 °C) LAS-Puffer lysiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt mechanisch mit Hilfe einer 25 G Kanüle. Die Lösung wird für maximal 10 min. bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle werden zusätzlich Zellen entweder mit 1 mM Phalloidin in LAS-Puffer zur F-Actin Stabilisierung oder mit 10 mM Cytochalasin D in LAS-Puffer zur Depolymerisation von F-Actin behandelt. Die Lysate werden anschließend im vorgewärmten (37 °C)

Rotor bei 380 x g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Ultrazentrifuge überführt und bei 100.000 x g, 37 °C für 1 h in eine Pellet- und Überstand-Fraktion getrennt. Der Überstand enthält das monomere G-Actin und wird auf Eis gestellt, während das Pellet mit der F-Actin Fraktion mit einem Äquivalent des Probenvolumens in 10 mM Cytochalasin D mit 2 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail resuspendiert wird. Nach einer BCA-Proteinbestimmung (siehe Ziff. 3.5.2) der Pellet-Lösungen werden gleiche Proteinmengen und äquivalente Volumina der Überstandsfractionen mit 2xLaemmli Puffer aufgenommen, denaturiert und nach SDS-Gelelektrophorese auf Nitrocellulose transferiert (vgl. Ziff. 3.5.3 und 3.5.6).

#### **3.6.4 Bestimmung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen unter verschiedenen Stimuli**

Die Messung des Neuritenwachstums erfolgt drei Tage nach Fixierung der Zellen mit Hilfe der Funktion „Polygonlänge“ unter *analySIS3.0*<sup>®</sup>. Um nur neuronal differenzierte Zellen zu untersuchen, werden drei Selektionskriterien festgelegt (van Bergeijk et al. 2006). Von jeder Zelle wird nur der längste neuronale Ausläufer (I) untersucht. Dieser darf nicht kleiner als der Zelldurchmesser sein (II) und muss mindestens eine Länge von 40 µm aufweisen (III). Da die Grenze zwischen Zellkörper und Fortsatz nicht immer genau zu bestimmen ist, erfolgt die Messung vom Mittelpunkt der Zelle bis zur äußersten Spitze des Ausläufers. Bei der Messung der Neuritenlänge in Differenzierungsmedium ohne NGF in Anwesenheit des ROCK-Inhibitors Y27632 bzw. bidest. H<sub>2</sub>O wird aufgrund der relativ kurzen Ausläufer auf das Kriterium III verzichtet. Der Ausgangspunkt für jede Messung ist der obere Scheitelpunkt im 24-well. Es werden pro Versuch und Ansatz fortlaufend ca. 50 positive Zellen bestimmt. Das Experiment wird mindestens drei Mal wiederholt.

Bei der genetischen Manipulation von PC12-Zellen mit siRNAs oder Vektoren, die kein fluoreszierendes Fusionsprotein kodieren (z. B. pSPORT6-Gemin2, pSuppressor etc.) erfolgt die Co-Transfektion mit dem pDsRed2-Vektor zur Identifikation genetisch veränderter Zellen. Die Inkubation in Differenzierungsmedium erfolgt anschließend für 72 ± 2 h.

#### **3.6.5 Bestimmung der Anzahl SMN-positiver Kernkörperchen**

HEK293T-Zellen werden zunächst mit der Kontroll- bzw. gegen Gemin2 mRNA gerichteten siRNA und Fluorescein-markierten Oligonukleotiden transfiziert, für drei Tage inkubiert und anschließend mit PFA fixiert. Nach der immunzytochemischen Markierung von SMN mit dem entsprechenden Primärantikörper aus der Maus und dem gegen Maus gerichteten IgG-Alexa555 Sekundärantikörper aus der Ziege können in den grün fluoreszierenden, transfizierten Zellen die rot-fluoreszierenden SMN Kern-Körperchen gezählt werden. Das Experiment wird in drei unabhängigen Versuchen wiederholt und anschließend statistisch ausgewertet.

### **3.7 Statistische Auswertung:**

Die gesammelten Messwerte (n) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (N) werden mit dem Programm *SigmaStat8.0*<sup>®</sup> auf Normalverteilung nach D'Agostino und Pearson untersucht und mit

einem für das Experiment entsprechenden, in der Abbildung angegebenen Test analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen Wertepaaren werden durch p-Werte und Sterne (\*) angegeben ( $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*)). Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Fehler der Standardabweichung des Mittelwertes.

### 3.8 Antikörper

Für die Markierung von Antigenen werden für die Immunzytochemie (ICC) und Westernblots (WB) folgende Antikörper verwendet:

Antigen	Herkunft	Spezifität	WB	ICC	
Actin AB-5	Maus	monoklonal	1:3000		Clontech, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
$\beta$ III-Tubulin	Maus	monoklonal	1:3500	1:400	Upstate/Millipore Corp., Billerica, MA 01821, U.S.A.
$\beta$ -Tubulin, E7	Maus	monoklonal	1:3000	1:300	Develop. Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, U.S.A.
Cofilin	Kaninchen	polyklonal	1:1000		Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, U.S.A.
Cofilin, phosphoryliert	Kaninchen	polyklonal	1:1000		Clontech, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Coilin	Maus	monoklonal	1:1000		Clontech, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FLAG-M2	Maus	monoklonal	1:3000		Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
GAPDH	Maus	monoklonal	1:3500		Chemicon/ Millipore Corp., Billerica, MA, U.S.A.
Gemin-2, Klon 2E17	Maus	monoklonal	1:2000		Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
GFP (Klon 7.1 & 13.1)	Maus	monoklonal	1:2000		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
HSP90	Kaninchen	polyklonal	1:1500		Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, U.S.A.
Immunglobuline	Maus	monoklonal			Dako GmbH, Hamburg, D
LimK1	Kaninchen	polyklonal	1:1000		Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, U.S.A.
Phospho-LimK1 / P-LimK2	Kaninchen	polyklonal	1:1000		Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, U.S.A.
PRMT5-21	Maus	monoklonal	1:1000		Abcam, Ltd., Cambridge, UK
Profilin2	Huhn, IgY	polyklonal	1:600		Abcam, Ltd., Cambridge, UK
Sm-AB1, Y12	Maus	monoklonal	1:800		Abcam, Ltd., Cambridge, UK
Neurofilament 68 (NF-68)	Maus	monoklonal	1 : 750		Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
SMN	Maus	monoklonal	1:4000	1:400	Clontech, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
anti-Maus Alexa555	Ziege	monoklonal		1:500	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
anti-Maus Alexa633	Ziege	monoklonal		1:400	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
anti-Maus Peroxidase	Schaf		1:4000		Amersham plc, Little Chalfont, GB
anti-Kaninchen Peroxidase	Ziege		1:4000		Pierce Chemical Company, Rockford, U.S.A
anti-Huhn Peroxidase	Kaninchen		1:8000		Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
DNaseI-Alexa488	Enzym	Enzym		1:500	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phalloidin-Alexa546	<i>Amanita phalloides</i>	Toxin		1:40	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

### 3.9 Chemikalien

#### Chemikalien

0,05 % (w/v) Trypsin / 0,83 mM EDTA  
 1.1x ZOOM<sup>®</sup> 2D Protein-Solubilizer-1  
 30 %ige Salzsäure (HCl)  
 4',6-Diaminphenylindol (DAPI)  
 40 %-Acrylamid-Lösung (29:1)  
 Actin, Kaninchenmuskel  
 Adenosintriphosphat, (Na<sub>2</sub>ATP)  
 Agarose  
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)  
 Antifoam-C  
 BCA-200 Protein Assay Kit  
 Benzonase<sup>®</sup>

#### Hersteller

PAA GmbH, Pasching, Österreich  
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D  
 Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz  
 Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D  
 Roth GmbH, Karlsruhe, D  
 Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D  
 Pierce Chemical Company, Rockford, U.S.A  
 Biomol GmbH, Hamburg, D

Bilddokumentationssystem	Biometra GmbH, Göttingen, D
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Bugbuster <sup>®</sup> -Proteinextraktion	Novagen/EMD, Merck KGaA, Darmstadt, D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Collagen I	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck KGaA, Darmstadt, D
Cryo-Röhrchen	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
D-(+)-Saccharose	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
DMEM High Glucose	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS	Biochrom AG, Berlin, D
ECL-Substrat-Lösungen 1 + 2	Pierce Chemical Company, Rockford, U.S.A
ECM-Gel	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraacetat; Na <sub>2</sub> -EDTA)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraacetat)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Elektroporator, Equibio EasyJecT Optima	Thermo Elektron Corp., Milford, U.S.A
Elektroporationsküvetten, 4 mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ethanol	JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Fotoentwickler-Lösung	Eastman Kodak Comp., New York, U.S.A
fetales Kälberserum, FCS GOLD	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Fotofixier-Lösung	Eastman Kodak Comp., New York, U.S.A
fluorescent oligonucleotides	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, D
Genitacin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
IGEPAL-CA630	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Injektionskanüle	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Isopropanol	JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
IX70 Fluoreszenzmikroskop	Olympus Europa GmbH, Hamburg, D
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Laminin	tebu-bio GmbH, Offenbach, D
LB Broth (für Flüssigkultur)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
LB-Agar	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Leica TCS2 SP2 <i>convocal microscope</i>	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
L-Glutamin 200 mM	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Lipofectamine 2000 <sup>®</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Lysozym	Biomol GmbH, Hamburg, D
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Metafectene <sup>®</sup>	Biontex-Laboratories GmbH, Martinsried D
Methanol	JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA
Milchpulver	Heirler Canovis GmbH, Radolsfeld, D
Millex <sup>®</sup> -HA 0,22 µm	Millipore GmbH, Schwallbach, D
Millex <sup>®</sup> -HA 0,45 µm	Millipore GmbH, Schwallbach, D
MinElute Gelextraktion	Qiagen GmbH, Hilden, D

## Material und Methoden

---

Mini-/Maxi-Plasmid-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Multiplate Reader	ELX-800, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdesoxycholat	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumpyruvat 100 mM	PAA GmbH, Pasching, Österreich
NGF-β 7S	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Nitrocellulose-Membran Hyperbond™	Amersham, Biosciences, Little Chalfont, GB
Nunclon™ Kulturflaschen	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D
p3xFlagCMV 14	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Paraformaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
pDsRed2-Vektor	Clontech, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
pEGFP-N2-Vektor	Clontech, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
pET41-Vektor	Novagen/EMD, Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Pferde-Serum	GibcoBRL-Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
pGEM-T-Vektor	Promega GmbH, Mannheim, D
Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Photometer	DU520, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Piperazin-N-N'-bis(ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
PowerPac 200 bzw. 300 Spannungsquelle	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg, D
ProLong Gold Antifade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Protean-II® Kammer	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Protein G gekoppelte Agarose Beads	Amersham plc, Little Chalfont, GB
Protein G gekoppelte Dynabeads	Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, D
pSuppressor	IMG-800, Imgenex, Biomol GmbH, Hamburg, D
Rainbow-Multimark	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Restriktionsenzyme + entsprechende Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
Röntgenfilm	Eastman Kodak Comp., New York, U.S.A
SDS ( <i>sodium dodecylsulphate</i> )	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Slide-A-Lyzer® Dialyse-Rahmen	Pierce Chemical Company, Rockford, U.S.A
T4 Ligase + Puffer	Promega GmbH, Mannheim, D
TPP-Kulturflaschen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton®-X-100	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tween®-20	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Wasser	Ampuwa®, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, D
Whatman Filterpapiere	Whatman International Ltd, Kent, GB
Y27632 ROCK-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
ZOOM® Carrier Ampholytes (pH4-7)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
ZOOM® IPGRRunner System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Schnelldorf, D

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Veränderung der Genexpression von SMN und assoziierten Proteinen während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen

PC12-Zellen entstammen den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, die sich embryonal aus der Neuralleiste entwickeln. Nach Differenzierung mit dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) zeigen die Zellen einen Phänotyp, der sympathischen Neuronen ähnelt und bilden neuronale Ausläufer, die eine Länge von 0,5 bis 1 mm erreichen können (Greene und Tischler 1976)

Um die Regulation verschiedener SMN assoziierter Proteine während der initialen Phase der neuronalen Differenzierung zu untersuchen, wurden PC12-Zellen auf Collagen I beschichteten Oberflächen für 72 h mit NGF differenziert und die Expressionsveränderung einzelner Zielproteine nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot densitometrisch evaluiert (Abb. 4, A). Dabei wurden die Werte auf die Proteinspiegel vor einer neuronalen Differenzierung mit NGF (Tag 0) normiert und in Relation zur konstitutiv exprimierten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Glykolyse gesetzt. Als weitere Kontrolle wurde der Proteinspiegel des Hitzeschockproteins-90 (HSP90) untersucht. HSP90 ist an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt, wie am Beispiel des Glucocorticoid-Rezeptors gezeigt werden konnte (Dittmar et al. 1996). Verschiedene Stress-Stimuli führen zu einem Anstieg der Transkription der konstitutiv exprimierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen von HSP90 (Sreedhar et al. 2004).

Simultan mit der Ausbildung von ersten neuronalen Fortsätzen 24 h nach NGF-Zugabe stieg die Expression von SMN signifikant um Faktor  $1,7 \pm 0,1$  an ( $p < 0,05$ ) und war auch nach 72 h unter Differenzierungsbedingungen um Faktor  $1,6 \pm 0,2$  erhöht ( $p < 0,05$ , vgl. Abb. 4, B). Zu diesem Zeitpunkt zeigen auf Poly-L-Ornithin/Laminin kultivierte PC12-Zellen neuronale Ausläufer mit einer durchschnittlichen Länge von  $71,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$  ( $N=3$ ,  $n=438$  Zellen) (van Bergeijk et al. 2006). Parallel nahm der Proteinspiegel der 68 kDa Isoform der Neurofilamente (NF-68) deutlich zu. Eine Hochregulation der NF-68 mRNA Transkription während der neuronalen Differenzierung mit NGF wurde bereits beschrieben (Lindenbaum et al. 1988) und hier auf translationaler Ebene bestätigt.

Während der neuronalen Differenzierung mit NGF blieben die Proteinspiegel von Gemin2, SmB und der Proteinmethyltransferase-5 (PRMT5) konstant (s. Abb. 4, A und B). SMN interagiert direkt über unterschiedliche Domänen mit Gemin2 (Liu et al. 1997; Young et al. 2000) und SmB (Buhler et al. 1999; Pellizzoni et al. 1999), einem von sieben Sm-Proteinen, die einen heptameren Ring zur Bindung von snRNA an den SMN-Komplex bilden (Raker et al. 1996; Meister et al. 2001a). Die Aktivierung der Sm-Proteine und folgende Bindung an den SMN-Komplex wird durch eine PRMT5 katalysierte Methylierung Arginin-reicher Motive vermittelt (Meister et al. 2002). Die Bindung von Gemin2 und der Sm-Proteine (Buhler et al. 1999) an den SMN-Komplex ist für die Assemblierung von snRNPs von essentieller Bedeutung (Fischer et al. 1997; Feng et al. 2005). Die alternative Regulation von SMN weist auf eine mögliche, vom snRNP-Komplex unabhängige Funktion des SMN-Proteins bei der neuronalen Differenzierung hin.

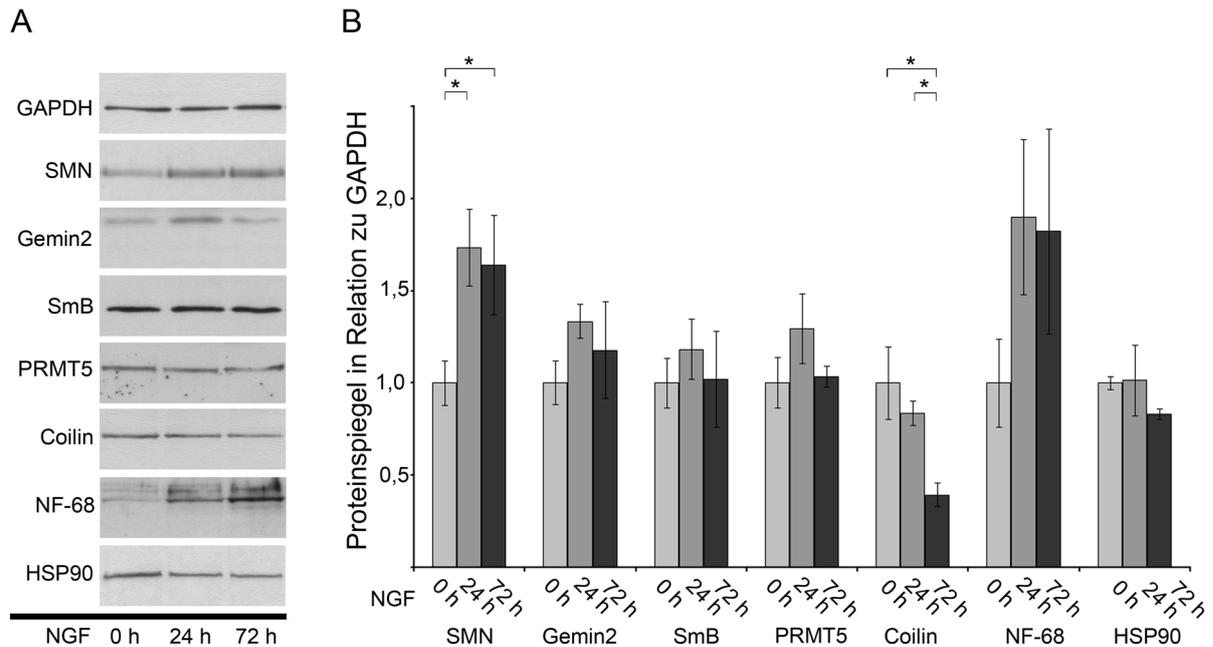


Abb. 4 Veränderung der SMN-Genexpression und assoziierter Proteine während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen. (A) PC12-Zellen wurden auf Collagen I beschichteten Oberflächen ausgesät und entweder nach Kultivierung für 24 h unter Proliferationsbedingungen (0 h NGF) oder nach zusätzlicher Kultivierung unter Serum-Reduktion und Anwesenheit von 100 ng/ml NGF für 24 h bzw. 72 h lysiert. Nach SDS-PAGE gleicher Proteinmengen und Westernblot wurde die Membranen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. (B) Die Bandenintensität wurde densitometrisch quantifiziert und die Proteinspiegel ins Verhältnis zu GAPDH gesetzt. Die statistische Auswertung von jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen ( $N \geq 3$ ) erfolgte mit Hilfe eines zweiseitigen Mann-Whitney Tests (\*,  $p < 0,05$ ). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Fehlern der Standardabweichung angegeben.

Die Expression von Coilin, einem ausschließlich nukleären Interaktionspartner des SMN-Proteins, verhielt sich antagonistisch zu SMN. Nach dreitägiger Inkubation mit NGF sank der Proteinspiegel signifikant um  $60,6 \pm 6,2$  % auf den Wert  $0,4 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ , vgl. Abb. 4, B). Coilin ist ein Markerprotein für Kernstrukturen, die als Cajal-Körper bezeichnet werden (Andrade et al. 1991; Hebert et al. 2001). Es wurde ferner gezeigt, dass während der Embryonalentwicklung die Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern, die mit Cajal-Körpern co-lokalisieren deutlich ansteigt (Young et al. 2001).

#### 4.2 SMN knock-down führt zu vermindertem Wachstum neuronaler Ausläufer in PC12-Zellen

Bei SMA-Patienten besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem SMN-Proteinspiegel und dem Schweregrad der Erkrankung, wie exemplarisch an fötalen Gewebe aus der Leber und dem Rückenmark gezeigt wurde (Lefebvre et al. 1997). Aufgrund von Mutation oder Deletion des SMN1-Gens beobachtet man bei einer erhöhten SMN2-Genkopienzahl eine Kompensation der Defekte, da zumindest 10 % der SMN2-Gen Translationsprodukte in natives SMN-Protein münden (Campbell et al. 1997; Lorson et al. 1998; Schmalbruch und Haase 2001). Um die funktionelle Bedeutung des endogenen SMN-Proteinspiegels auf das Wachstum neuronaler Ausläufer während der Differenzierung zu untersuchen, wurde ein SMA-Zellkulturmodell mit Hilfe von PC12-Zellen entwickelt. Die Zellen wurden hierzu mit einem pSuppressor-Plasmid elektroporiert, welches eine shRNA kodiert, die eine 19 Nukleotid große, zur SMN-mRNA komplementäre Sequenz aufweist (pSupp.SMN). Nach Transfektion und Translation wird die shRNA intrazellulär zu einer siRNA prozessiert.

Zunächst wurden für die Optimierung der Transfektionsrate PC12-Zellen mit dem pDsRed2-Vektor transfiziert, der für eine Geneticin-Resistenz und das rot-fluoreszierende DsRed2 Tetramer (Wall et al. 2000) kodiert. In Einzelversuchen wurden die Geräteparameter Spannung und Kondensatorkapazität bei konstanter Zellzahl und DNA-Menge variiert, um bei einer Vitalität nach Lebendzellzahlbestimmung von mindestens 50 % eine Transfektionsrate von über 20 % zu erzielen. Anschließend wurde die Zellzahl und DNA-Menge angepasst und der Anteil transfizierter Zellen durch dreitägige Geneticin-Selektion in NGF-haltigem Differenzierungsmedium auf insgesamt  $49,4 \pm 0,2 \%$  (N=2, n>660 Zellen) gesteigert (Abb. 5).

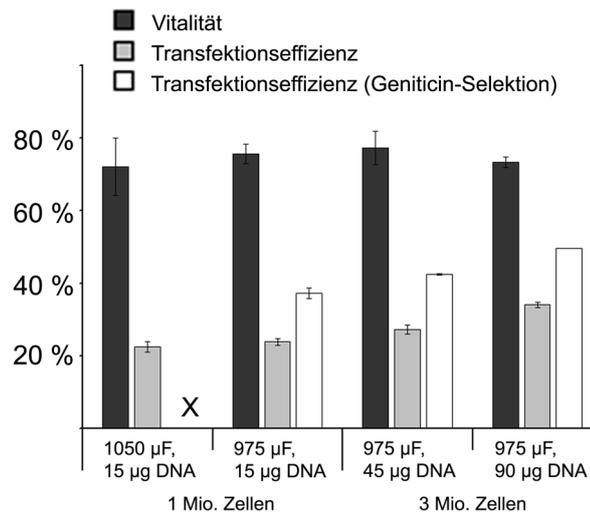


Abb. 5 Optimierung der Elektroporationsbedingungen für PC12-Zellen. Unterschiedliche Zellzahlen wurden bei konstantem Volumen mit verschiedenen Mengen an pDsRed2-Plasmid-DNA versetzt und mit einem einzigen Puls elektroporiert. Die Spannung (350 V) und der Nebenwiderstand (335  $\Omega$ ) wurden konstant gehalten. Die Vitalität wurde in zwei unabhängigen Experimenten (N=2) nach der Elektroporation mit Hilfe einer Trypanblau-Ausschlussfärbung anhand von jeweils n=300 Zellen durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für drei Tage in An- oder Abwesenheit von 750  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin auf Poly-L-Ornithin/Laminin unter Serum-Reduktion und 100 ng/ml NGF kultiviert. Die Transfektionsrate wurde anhand von DsRed2-positiven Zellen im Verhältnis zu DAPI-markierten Zellen (n>660) bestimmt. Aufgrund der geringeren Transfektionsrate und Vitalität bei einer Kapazität von 1050  $\mu\text{F}$  erfolgte hier keine Quantifizierung einer Geneticin-Selektion. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Fehlern der Standardabweichung angegeben.

Um den Einfluss eines SMN knock-downs auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die PC12-Zellen zunächst elektroporiert und über Nacht unter Proliferationsbedingungen auf Collagen I kultiviert. Anschließend erfolgte die neuronale Differenzierung mit NGF in Anwesenheit von Geneticin für 24 bis 72 h. Die Reduktion des SMN-Proteinspiegels wurde alle 24 h durch SDS-PAGE/Westernblot und anschließender Densitometrie der Banden überprüft (Abb. 6, A, B). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem leeren pSuppressor-Plasmid (pSupp.control) transfiziert wurden.  $\beta\text{III-Tubulin}$  ist ein neuronaler Marker (Fanarraga et al. 1999), diente als Auftragskontrolle und wurde zur Normalisierung der Daten verwendet.

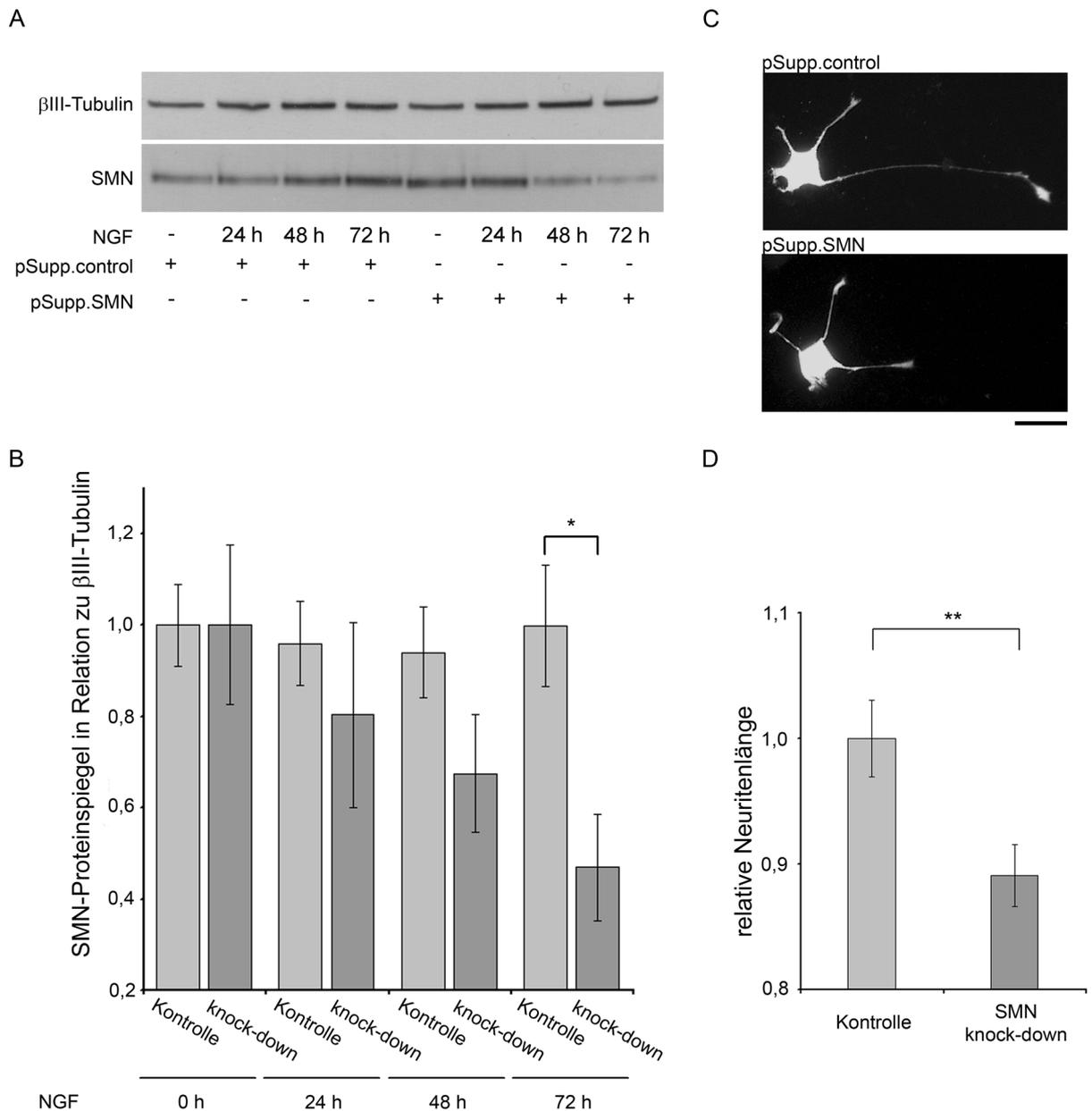


Abb. 6 ShRNA-vermittelte Reduktion des endogenen SMN-Proteinspiegels und Folgen für das Wachstum neuronaler Ausläufer in PC12-Zellen. (A) PC12-Zellen wurden entweder mit dem leeren Vektor (pSupp.control) oder shRNA-kodierenden pSupp.SMN-Plasmid transfiziert, für 24 h unter Proliferationsbedingungen (NGF 0 h) auf Collagen I kultiviert und anschließend für die jeweils angegebene Zeit in Anwesenheit von 750  $\mu$ g/ml Geneticin und 100 ng/ml NGF unter Serumreduktion differenziert. Nach der Lyse wurden gleiche Proteinmengen mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis von SMN und neuronalem  $\beta$ III-Tubulin erfolgte mit entsprechenden Antikörpern. (B) In drei unabhängigen Versuchen (N=3) wurde die Bandenintensität densitometrisch quantifiziert und der SMN-Proteinspiegel in Relation zu  $\beta$ III-Tubulin bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Mann-Whitney-Tests (\*,  $p < 0,05$ , einseitig). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Fehlern der Standardabweichung angegeben. (C) Um die Neuritenlänge genetisch veränderter Zellen zu bestimmen, erfolgte eine Co-Transfektion mit pDsRed2 neben den entsprechenden pSuppressor-Vektoren. Nach 24 h in Proliferationsmedium und neuronaler Differenzierung für 72 h wurden die Zellen fixiert. Dargestellt sind repräsentative, DsRed2-positive PC12-Zellen (Messbalken: 25  $\mu$ m). (D) Die Quantifizierung des veränderten Wachstums neuronaler Ausläufer bei SMN knock-down erfolgte durch die Bestimmung des jeweils längsten Neuriten einer pDsRed2-positiven Zelle. Der Fortsatz musste mindestens einen Zelldurchmesser und  $>40 \mu$ m lang sein. In drei voneinander unabhängigen Experimenten (N=3) wurden je Ansatz mindestens  $n=140$  Neuriten vermessen. Dargestellt ist die relative Veränderung der Neuritenlänge. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines Mann-Whitney-Tests bestimmt und mit \*\* ( $p < 0,01$ , zweiseitig) gekennzeichnet (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung).

Durch einen shRNA vermittelten SMN knock-down und Geneticin-Selektion konnte ein SMA-Zellkulturmodell erfolgreich etabliert werden. Nach dreitägiger neuronaler Differenzierung wurde in der gesamten Kultur eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) des SMN-Proteinspiegels auf  $47,6 \pm 8,5 \%$

verglichen mit  $\beta$ III-Tubulin (siehe Abb. 6, B) nachgewiesen, wobei eine durch NGF induzierte Steigerung der SMN-Genexpression (siehe Abb. 4, B) zusätzlich kompensiert werden musste. Das Proteinniveau in den PC12-Zellen entsprach nach 72 h dem Proteinspiegel in SMA-I Patienten, wie aus den Daten von humanen SMA-I Fibroblasten hervorgeht (vgl. Abb. 16, B).

Bei SMA-Patienten kommt es zu der Denervation der Muskelendplatte und einem deutlichen Verlust von Motoneuronen (Crawford und Pardo 1996). Im Tiermodell konnte bei einer ausgeprägten axonalen Degeneration der Motoneurone ein moderates Zellsterben beobachtet werden (Crawford und Pardo 1996). Um die Auswirkung eines reduzierten SMN-Proteinspiegels auf das Neuritenwachstum während der neuronalen Differenzierung zu untersuchen, wurden auf Collagen I kultivierte PC12-Zellen mit den entsprechenden pSuppressor-Vektoren (pSupp.SMN bzw. pSupp.control) und pDsRed2 co-transfiziert (Abb. 6, C). Es konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass bei liposomaler Transfektion von PC12-Zellen mit pEGFP-N2 und pDsRed2 93,6  $\pm$  5,7 % der DsRed2-positiven Zellen auch EGFP-positiv sind (van Bergeijk et al. 2007). Während der neuronalen Differenzierung führte der simultane knock-down von SMN zu einer signifikanten Inhibition ( $p < 0,01$ ) des Neuritenwachstums. Die deutliche Reduktion des SMN-Proteinspiegels simuliert die Situation in SMA-Patienten (Abb. 16, B) und führte bereits nach 72 h zu 11,0  $\pm$  2,5 % kürzeren Neuriten verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 6, D).

### 4.3 Lokalisation verschiedener SMN-Deletionsmutanten in PC12-Zellen

Um den Einfluss einzelner SMN-Domänen auf die intrazelluläre Lokalisation des SMN-Proteins zu untersuchen, wurden auf Collagen I kultivierte PC12-Zellen mit verschiedenen humanen SMN-Deletionsmutanten, die mit EGFP fusioniert waren, liposomal transfiziert. Die Konstrukte sind mit den Aminosäure-Resten des humanen SMN-Proteins angegeben (vgl. Abb. 7). Die Zellen wurden nach 24 h unter Proliferationsbedingungen für drei Tage mit NGF differenziert. Nach Fixierung erfolgte eine immunzytochemische Markierung von  $\beta$ -Tubulin mit dem entsprechenden Primär- und einem Alexa555-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Visualisierung wurde ein konfokales Mikroskop verwendet (siehe Abb. 8).

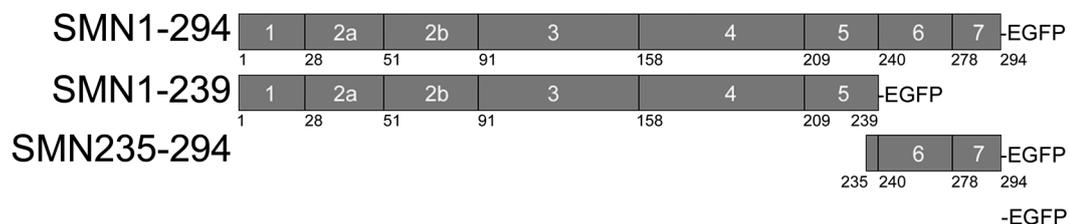


Abb. 7 Schematische Darstellung der verwendeten SMN-EGFP-Fusionskonstrukte. Die Zahlen geben die kodierenden Exone (Kästchen) und die Aminosäurereste des humanen SMN-Proteins wieder, wobei SMN1-294 dem Wildtyp entspricht. Daneben repräsentieren SMN1-239-EGFP und SMN235-294-EGFP N- bzw. C-terminale Deletionsmutanten, die wie SMN1-294 mit dem grün-fluoreszierenden Protein EGFP fusioniert wurden. Die Nummern in den Kästchen spiegeln die entsprechenden Exone auf DNA-Ebene wider.

Das endogene SMN-Protein wurde sowohl nukleär in Gems und Cajal-Körpern als auch zytoplasmatisch in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen (Liu und Dreyfuss 1996; Coover et al. 1997). Darüber hinaus wurden SMN-positive Granula in Axonen und Wachstumskegeln von P19-

Teratocarcinoma-Zellen (Fan und Simard 2002), Rückenmarks- und Vorderhirnneuronen aus der Ratte und dem Huhn sowie in Motoneuronen, die aus Stammzellen generiert wurden, beschrieben (Zhang et al. 2003; Zhang et al. 2006a).

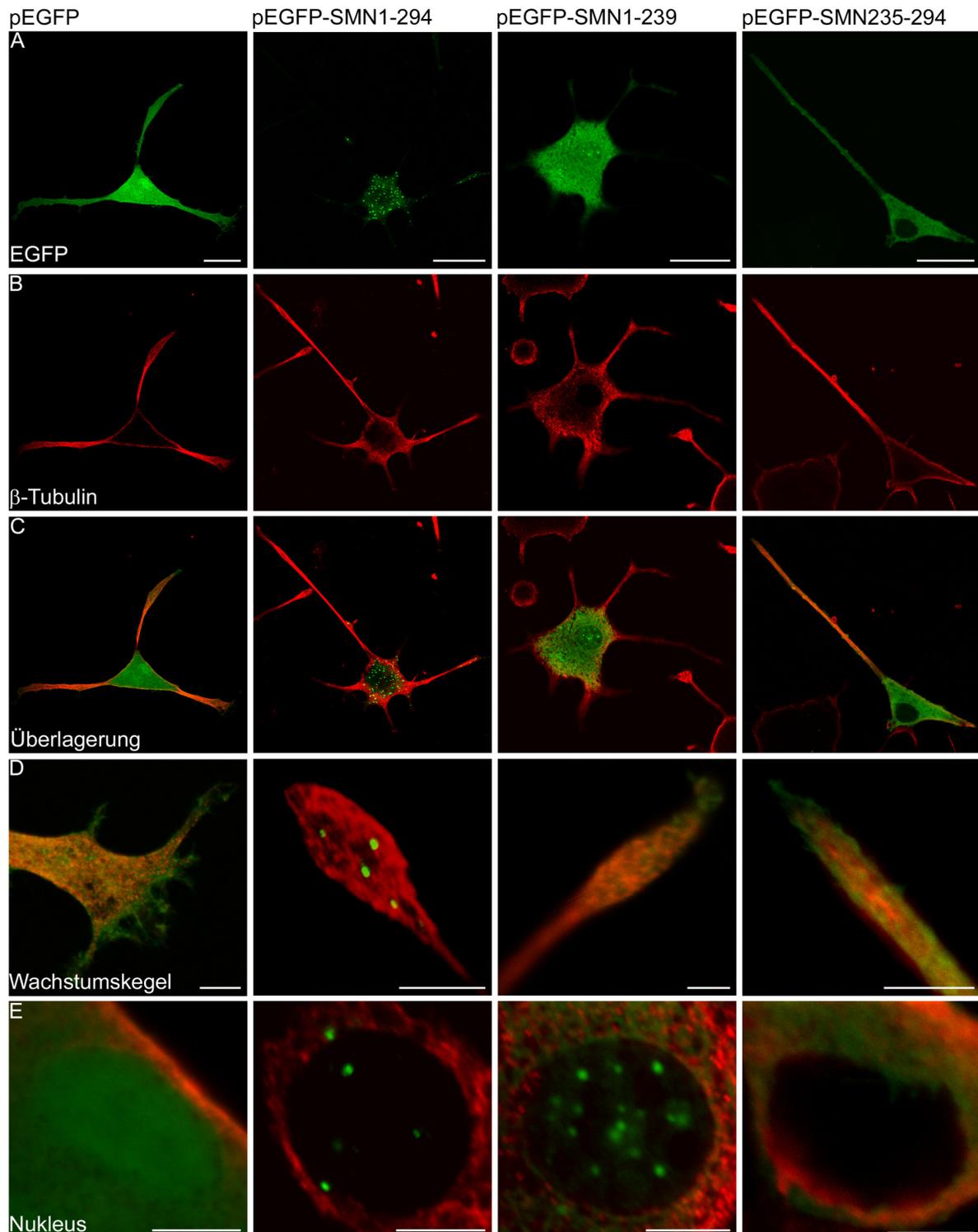


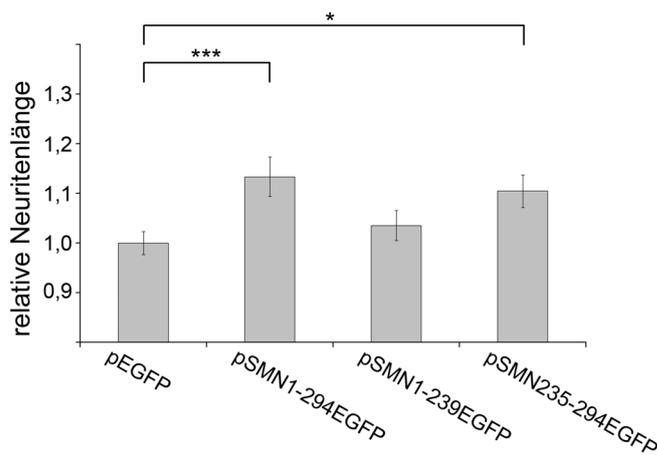
Abb. 8 Lokalisation verschiedener SMN-EGFP Deletionsmutanten in PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden auf Collagen I beschichteten Deckgläsern kultiviert, mit den entsprechenden pSMN-EGFP-Fusionskonstrukten und mit dem Kontrollvektor pEGFP liposomal transfiziert und nach 24 h für drei Tage mit 100 ng/ml NGF differenziert. Nach Fixierung wurde die immunzytochemische Markierung von  $\beta$ -Tubulin mit entsprechendem Primärantikörper und einem gegen Maus gerichteten, Alexa555-konjugierten Sekundärantikörper durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mit einem konfokalen Leica TCS SP2 Mikroskop, die Kanäle sind in A und B dargestellt. Die Bilderreihen C-E repräsentieren Vergrößerungen von Wachstumskegeln (D) und Kernen (E) und wurden durch Überlagerung beider Farbkanäle erstellt (Messbalken A-C: 25  $\mu$ m; D, E: 5  $\mu$ m).

Nach Überexpression des SMN1-294-EGFP-Fusionskonstrukts und neuronaler Differenzierung konnten zahlreiche SMN-positive Kernkörper nachgewiesen werden (Abb. 8, A). Darüber hinaus wurde eine punktförmige Verteilung im Zytoplasma sowie in den neuronalen Ausläufern und Wachstumskegeln beobachtet (Abb. 8, A und D). Die distinkten Strukturen unterschieden sich deutlich von der diffusen EGFP-Verteilung in den mit Kontrollvektor transfizierten Zellen (Abb. 8, A, D und E). Die pSMN1-239-EGFP Deletionsmutante kodiert die ersten 239 N-terminalen Aminosäure-Reste des humanen SMN-Proteins und zeigte eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation und eine verstärkte Aggregation SMN-positiver Kernkörper (Abb. 8, C und E). Das Signal in den Wachstumskegeln war deutlich schwächer als bei den anderen beiden Fusionsproteinen und insgesamt diffus (Abb. 8, A und D). Die Überexpression der C-terminalen 59 Aminosäure-Reste (SMN235-294-EGFP), die durch Exon 6 und 7 kodiert werden, führte zu einer deutlichen Abnahme an SMN-positiven Kernkörpern (Abb. 8, E). Während 93 % (n=44) der SMN1-294-EGFP und 89 % (n=46) der SMN1-239-EGFP transfizierten Zellen SMN-positive Kernkörper zeigten, betrug der Anteil bei SMN235-294-EGFP exprimierenden Zellen nur 31 % (n=85) (van Bergeijk et al. 2007). In den Wachstumskegeln lokalisierte SMN235-294-EGFP ähnlich granulär wie das endogene SMN (Vergleich Abb. 8, D mit Abb. 12, A-II).

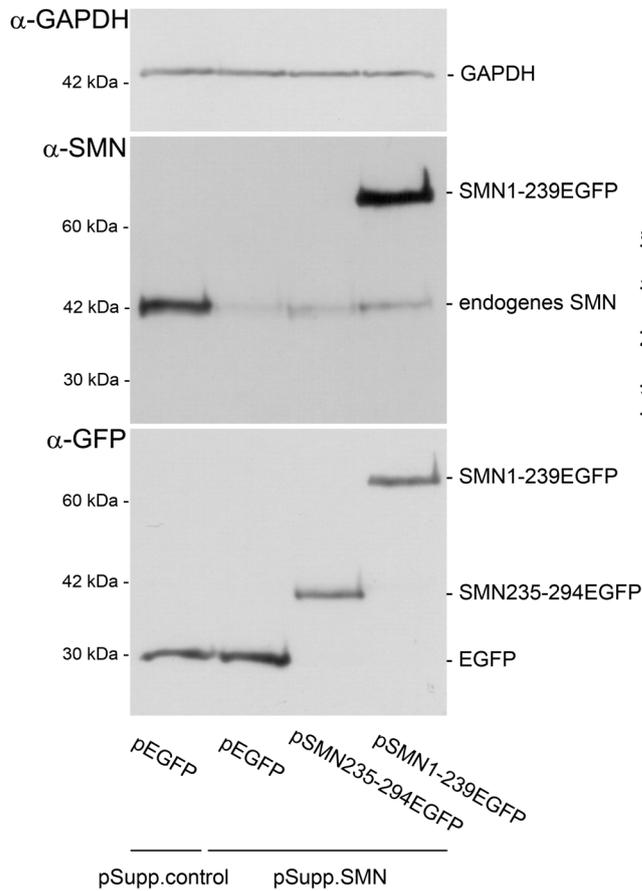
#### **4.4 Überexpression einer C-terminalen SMN-Deletionsmutante unter SMN knock-down Bedingungen führt zu einer funktionellen Wiederherstellung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen**

Die Überexpression des murinen SMN-Gens führt in PC12-Zellen zu einer Stimulation des Neuritenwachstums (Rossoll et al. 2003). Um die Funktion des humanen SMN-Proteins in den neuronalen Ausläufern zu untersuchen, wurden auf Collagen I kultivierte PC12-Zellen mit den verschiedenen humanen SMN-EGFP-Fusionskonstrukten transfiziert. Nach neuronaler Differenzierung mit NGF für 72 h und immunzytochemischer Markierung von  $\beta$ -Tubulin erfolgte eine Bestimmung der Neuritenlänge. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des humanen SMN1-Gens (pSMN1-294-EGFP) im Vergleich zum Kontrollplasmid (pEGFP) zu hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) längeren neuronalen Ausläufern führt (s. Abb. 9, A). Die Länge der Fortsätze nahm dabei im Mittel um  $13,4 \pm 4,0$  % zu. Die Überexpression des C-terminalen SMN-Fusionskonstruktes (SMN235-294) führte ebenfalls zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Steigerung des Längenwachstums um  $10,5 \pm 3,2$  %. Umgekehrt hatten die Aminosäure-Reste 1 bis 239 des SMN-Proteins bei Überexpression (pSMN1-239-EGFP), verglichen mit dem Kontrollvektor, keinen Einfluss auf das Auswachsen neuronaler Ausläufer. Auch andere N-terminale SMN-Deletionsmutanten zeigten keinen Einfluss auf das Längenwachstum von Neuriten (van Bergeijk et al. 2007). Der stimulierende Effekt des humanen SMN-Proteins auf das Auswachsen neuronaler Ausläufer wird daher möglicherweise über den C-Terminus (SMN235-294) des Proteins vermittelt.

A



B



C

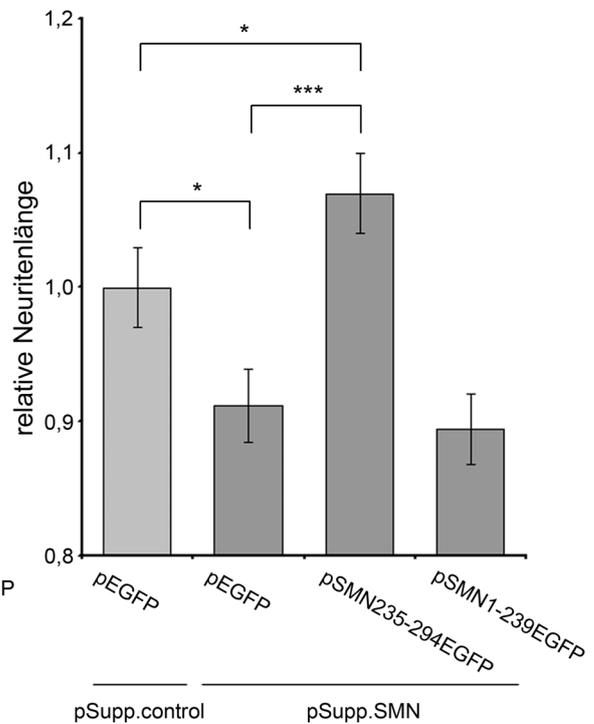


Abb. 9 Wiederherstellung des Neuritenwachstums unter SMN knock-down Bedingungen in PC12-Zellen. (A) Auf Collagen I kultivierte PC12-Zellen wurden mit unterschiedlichen SMN-EGFP-Fusionskonstrukten liposomal transfiziert, 24 h inkubiert und für 72 h mit 100 ng/ml NGF differenziert. Zur Identifikation der neuronalen Ausläufer wurden die Zellen mit  $\beta$ -Tubulin und einem gegen Maus gerichteten, Alexa555-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die Längenbestimmung erfolgte in drei voneinander unabhängigen Experimenten (N=3) an  $n \geq 100$  Neuriten pro Bedingung. Es wurden die relativen Neuritenlänge angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests (\*\*\*,  $p < 0,0001$  bzw. \*,  $p < 0,05$ ) bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung). (B) PC12-Zellen wurden über Elektroporation mit pDsRed2, pSupp.control oder pSupp.SMN und pEGFP, pSMN1-239- oder pSMN235-294-EGFP co-transfiziert, auf Collagen I kultiviert und nach 24 h für drei Tage neuronal differenziert. Der erfolgreiche SMN knock-down (pSupp.control vs. pSupp.SMN) und die simultane Überexpression der verschiedenen Deletionsmutanten wurden über SDS-PAGE/Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Dargestellt wurden die repräsentativen Blots. GAPDH diente dabei als Referenz und Auftragskontrolle. Die entsprechenden Molekulargewichte eines Proteinmarkers sind auf der linken Seite abgebildet. (C) In drei voneinander unabhängigen Experimenten (N=3) wurde die Länge von  $n \geq 200$  neuronalen Ausläufer DsRed- sowie zusätzlich SMN-EGFP-positiver Zellen bestimmt. Die Mittelwerte ( $\pm$  Fehler der Standardabweichung) der relativen Neuritenlänge wurden mit Hilfe eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht (\*\*\*,  $p < 0,0001$  bzw. \*,  $p < 0,05$ ).

Die stimulierende Wirkung der C-terminalen Bereiches auf das Neuritenwachstum kann eine unabhängige Funktion des SMN-Proteins darstellen oder auf einer Oligomerisierung der Deletionsmutante mit endogenem Protein hinweisen, da das SMN zwei Selbstbindungsdomänen, die N- und C-Terminal liegen, besitzt (Lorson et al. 1998; Young et al. 2000). Um die Effekte einer mögliche Heterodimerisierung von endogenem SMN mit humanem SMN235-294 zu bestimmen, wurden in PC12-Zellen unter SMN knock-down Bedingungen SMN-EGFP-Fusionskonstrukte und pDsRed2 überexprimiert. Über die Messung der Neuritenlänge DsRed2- und SMN-EGFP-Fusionskonstrukt-positiver PC12-Zellen sollte untersucht werden, ob durch Überexpression des C-Terminus eine funktionelle Wiederherstellung der durch SMN knock-down vermittelten Defekte möglich ist.

Die Reduktion des SMN-Proteinspiegels wurde mit Hilfe von SDS-PAGE und Westernblot verifiziert. Der Nachweis des SMN235-294-EGFP Konstrukts erfolgte dabei durch einen GFP-Antikörper, da der kommerziell erworbene SMN-Antikörper eine N-terminale Erkennungssequenz aufweist.

Unter SMN knock-down Bedingungen und simultaner Überexpression des pEGFP-Kontrollvektors nahm die Neuritenlänge erwartungsgemäß signifikant ( $p < 0,05$ ) ab (vgl. Abb. 9, C und Abb. 6). Die Überexpression des C-terminalen Fusionskonstrukts SMN235-294-EGFP führte trotz deutlicher Reduktion des endogenen SMN-Proteinspiegels (s. Abb. 9, A und Abb. 6) zu einer funktionellen Wiederherstellung des Neuritenwachstums. Darüber hinaus konnte eine Überkompensation der durch SMN knock-down verursachten Inhibition des Neuritenwachstums beobachtet werden, da die Überexpression des C-Terminus (pSupp.SMN + pSMN235-294-EGFP) zu einem signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg der Neuritenlänge verglichen mit der Kontrollgruppe (pSupp.control + pEGFP) führte (Abb. 9, C). Die Überexpression der N-terminalen SMN-Deletionsmutante (pSupp.SMN + pSMN1-239-EGFP) zeigte im Vergleich zum Kontrollvektor (pSupp.SMN + EGFP) keinen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum. Eine funktionelle Rekonstitution konnte hier nicht beobachtet werden. Da die Überexpression von humanen SMN1-239-EGFP trotz möglicher Heterodimerisierung mit endogenem SMN keinen Einfluss auf das Wachstum neuronaler Ausläufer zeigt, scheint dieser Bereich mit den entsprechenden Bindungspartner nicht essentiell für den wachstumsvermittelten Effekt von SMN zu sein.

#### **4.5 Die Veränderung des Gemin2-Proteinspiegels zeigen im Vergleich mit SMN antagonistische Effekte auf das Neuritenwachstum in PC12-Zellen**

Gemin2 bindet an den N-Terminus des SMN-Proteins und ist ein fester Bestandteil des snRNP/SMN-Komplexes (Liu et al. 1997; Young et al. 2000). Darüber hinaus konnten in Axonen von Motoneuronen aus der Ratte Gemin2-positive SMN-Komplexe nachgewiesen werden (Zhang et al. 2006a). Um die funktionelle Bedeutung des SMN-Gemin2-Komplexes auf das Auswachsen neuronaler Ausläufer zu untersuchen, wurde die Expression von Gemin2 während der neuronalen Differenzierung moduliert. Zunächst wurde ein siRNA-vermittelter Gemin2 knock-down durchgeführt. Die Transfektionsrate mit Fluorescein-markierten Oligonukleotiden betrug nach 24 h unter Proliferationsbedingungen  $35,5 \pm 6,1$  % (N=4, insgesamt n=2553 DAPI-pos. Zellen). Aufgrund eines raschen Abbaus der Oligonukleotide in den PC12-Zellen war die Markierung aber nur bedingt auswertbar. Die erfolgreiche Reduktion des Gemin2-Proteinspiegels wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot durch Vergleich mit  $\beta$ -Tubulin

densitometrisch verifiziert. Nach drei Tagen war der Gemin2-Proteinspiegel um  $78,6 \pm 4,5 \%$  im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA transfizierten Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) gesunken.

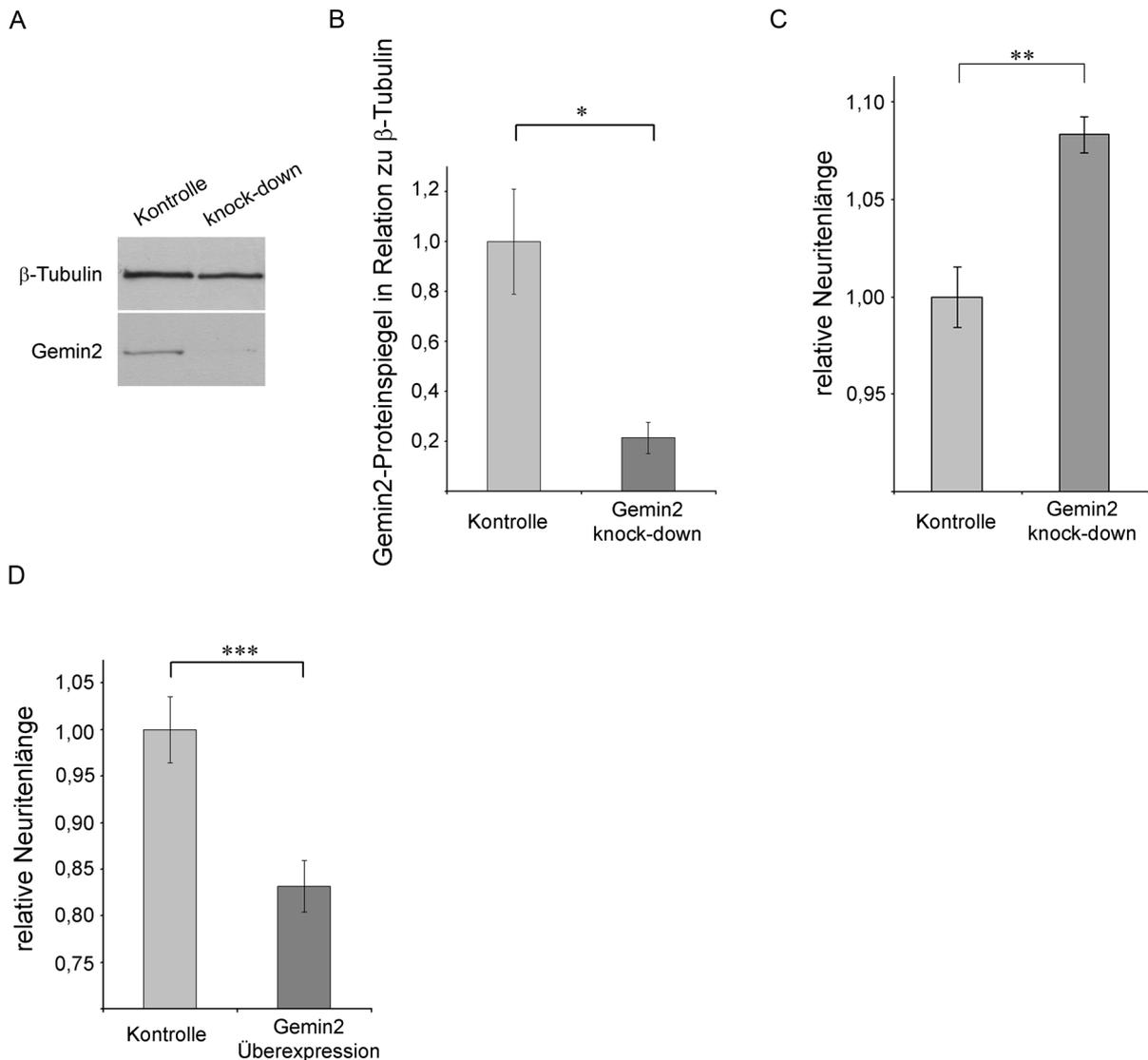


Abb. 10 Bedeutung des Gemin2-Proteinspiegels für das Längenwachstum neuronaler Ausläufer in PC12-Zellen. (A) PC12-Zellen wurden liposomal mit einer gegen Gemin2 mRNA gerichteten siRNA oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert und nach 24 h für 72 h mit 100 ng/ml NGF neuronal differenziert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Der Nachweis von Gemin2 und der Auftragskontrolle  $\beta$ -Tubulin erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern. (B) Für die Quantifizierung des Gemin2 knock-downs wurde in vier unabhängigen Experimenten (N=4) die Bandenintensität densitometrisch bestimmt und in Relation zu  $\beta$ -Tubulin gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (\*,  $p < 0,05$ ; zweiseitig). (C) Um den Einfluss eines Gemin2 knock-downs auf das Auswachsen neuronaler Ausläufer zu untersuchen wurden auf Collagen I kultivierte PC12-Zellen liposomal mit der entsprechenden siRNA und dem pDsRd2-Vektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Differenzierung mit NGF für 72 h. Der Mittelwert ( $\pm$  Fehler der Standardabweichung) der relativen Neuritenlänge ist angegeben (N=3, n=150 Zellen, Mann-Whitney-Test, zweiseitig: \*\*,  $p < 0,01$ ). (D) Die Überexpression von Gemin2 erfolgte mit Hilfe des pSPORT6-Gemin2 Plasmids bzw. dem Kontrollvektor und Co-Transfektion mit pDsRed2, wie bereits beschrieben. In drei unabhängigen Experimenten (N=3) wurden pro Gruppe n=160 Zellen analysiert (Mittelwert  $\pm$  Fehler der Standardabweichung; Mann-Whitney-Test, zweiseitig: \*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

Um die Folgen eines veränderten Gemin2-Proteinspiegels auf das Neuritenwachstum zu untersuchen, wurden in drei unabhängigen Experimenten auf Collagen I kultivierte PC12-Zellen liposomal entweder mit den entsprechenden siRNAs (Abb. 10, C) oder einem Gemin2-kodierenden Plasmid (Abb. 10, D)

sowie mit dem pDsRed2-Vektor co-transfiziert, um genetisch veränderte Zellen zu identifizieren. Nach neuronaler Differenzierung für 72 h wurden die Zellen fixiert und die Neuritenlänge bestimmt.

Die Reduktion des Gemin2-Proteinspiegels führte zu einem signifikanten ( $p < 0,01$ ) Anstieg des Längenwachstums neuronaler Ausläufer (Abb. 10, C). Umgekehrt wirkte sich eine Überexpression von Gemin2 inhibitorisch auf die Ausbildung neuronaler Ausläufer aus. Drei Tage nach der Transfektion zeigten die genetisch veränderten PC12-Zellen signifikant ( $p < 0,0001$ ) kürzere Neuriten, deren Länge um  $16,8 \pm 2,7$  % reduziert verglichen mit Kontrollvektor transfizierten Zellen war (Abb. 10, D). Damit wirkt sich der Gemin2- wie auch SMN-Proteinspiegel direkt auf die Ausbildung neuronaler Ausläufer aus, induziert jedoch funktionell einen antagonistischen Effekt (vgl. Abb. 10, C und D mit Abb. 6, D bzw. Abb. 9, A).

#### **4.6 Gemin2 knock-down führt zu einer Abnahme von SMN-positiven Kernkörpern in HEK293T-Zellen**

SMN und Gemin2 treten bei der Assemblierung spleißosomaler snRNPs am SMN-Komplex in Wechselwirkung (Fischer et al. 1997). Als Bestandteil des Multimers wird Gemin2 vermutlich mit dem snRNP/SMN-Komplex in den Kern transloziert und co-lokalisiert anschließend mit SMN in Gems (Liu und Dreyfuss 1996; Liu et al. 1997). In humanen Fibroblasten aus SMA Typ-I Patienten konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und einer verringerten Anzahl an SMN-positiven Kernkörpern beobachtet werden (Coover et al. 1997). Es konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es bei Überexpression von Gemin2 und der 23 kDa Isoform des Fibroblastenwachstumsfaktors 2 (FGF-2<sup>23</sup>) zu einer Verdrängung von Gemin2 am SMN-Komplex und zu einer Abnahme an SMN-positiven Kernstrukturen kommt (Bruns et al. 2007).

Um die Konsequenzen eines Gemin2 knock-downs auf die Häufigkeitsverteilung von SMN-positiven Strukturen im Kern zu untersuchen, wurden zunächst HEK293T-Zellen mit der entsprechenden siRNAs transfiziert und die Veränderung des Gemin2-Proteinspiegels 48 h und 72 h nach Transfektion bestimmt (Abb. 11, A). Die Transfektionsausbeute mit Fluorescein-markierten Oligonukleotiden, die sich zufällig in der Zelle verteilten (Abb. 11, C I und II), betrug nach 72 h  $57,3 \pm 8,3$  % (N=3, n=2659 DAPI-pos. Zellen). Nach drei Tagen konnte eine Reduktion des Proteinspiegels um  $55,2 \pm 6,0$  % beobachtet werden, die zu einer Veränderung in der Häufigkeitsverteilung von SMN-positiven Kernkörpern führte. HEK293T-Zellen wurden hierzu mit den entsprechenden siRNAs und Fluorescein-markierten Oligonukleotiden co-transfiziert, um genetisch veränderte Zellen zu erkennen. Anders als in den PC12-Zellen, blieb in den HEK293T-Zellen das Fluoreszenz-Signal über 72 h erhalten. Die Identifikation der Kernkörper erfolgte in Fluorescein-positiven Zellen nach immunzytochemischer Markierung von SMN. SMN zeigte in HEK293T-Zellen eine diffuse Verteilung im Zytoplasma, wobei eine perinukleäre Anreicherung erkennbar war. Im Nukleus konnten punktförmige Strukturen beobachtet werden (siehe Pfeile in Abb. 11, C I). In den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigten  $38,3 \pm 5,7$  % keinen und  $35,9 \pm 1,5$  % einen SMN-positiven Kernkörper. Darüber hinaus konnten auch Nuklei mit über sechs SMN-positiven Kernkörpern (6+,  $1,7 \pm 0,9$  %) nachgewiesen werden (Abb. 11, D Kontrolle). Der Gemin2 knock-down führte zu einer Abnahme der Gesamtanzahl und zu einer hoch signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Links-Verschiebung bei der Häufigkeitsverteilung SMN-positiver Kernkörper (Abb. 11, C und D).  $51,3 \pm 5,1$  % bzw.  $30,9 \pm 3,3$  % der Nuklei zeigten keinen oder nur

einen SMN-positiven Kernkörper (Abb. 11, D knock-down). Der Gemin2 knock-down in HEK293T-Zellen und der reduzierte SMN-Proteinspiegel in SMA-Fibroblasten (Coovert et al. 1997) führen demnach zu einem ähnlichen nukleären Phänotyp.

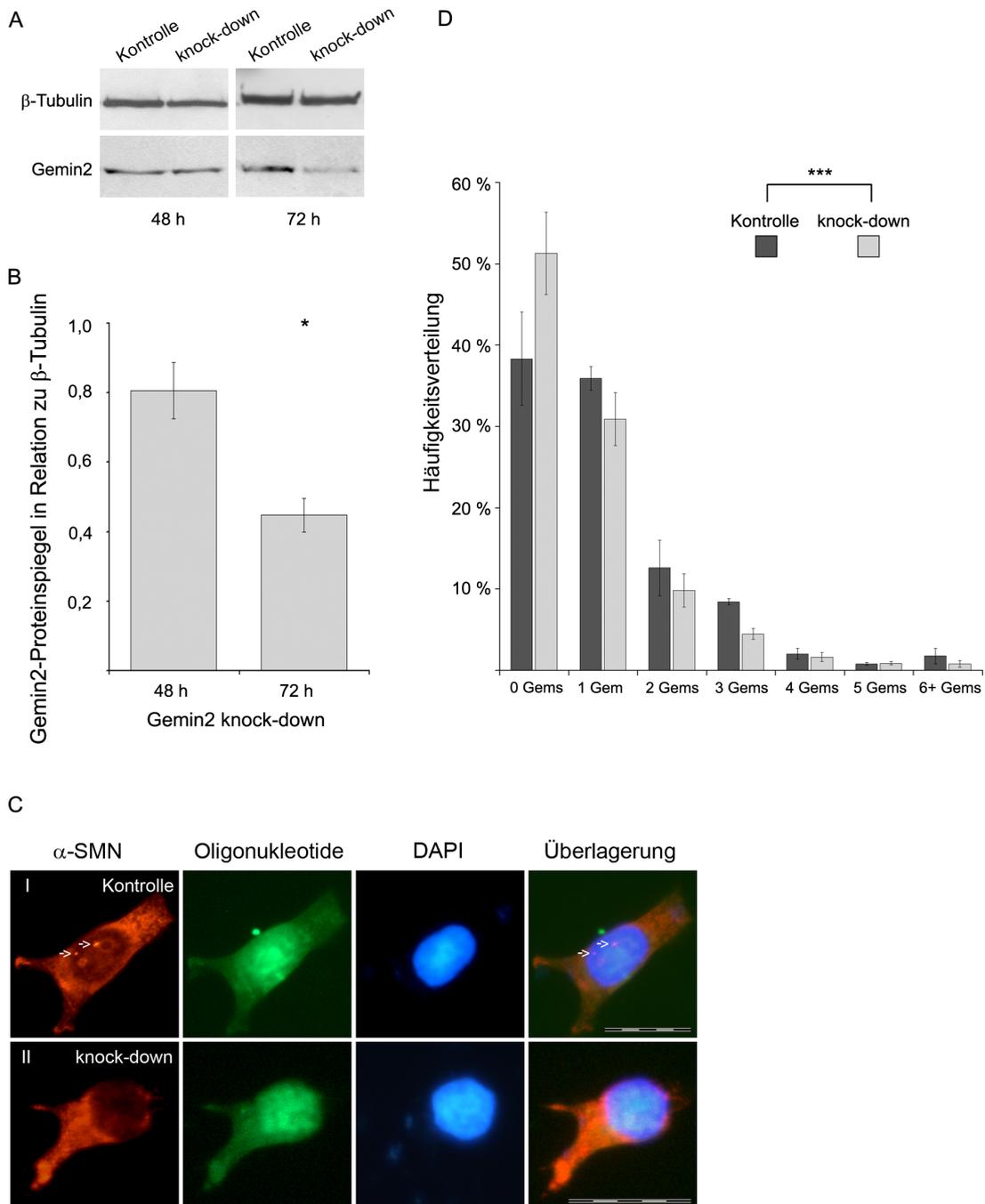


Abb. 11 Gemin2 knock-down führt zu einer Veränderung in der Häufigkeitsverteilung SMN-positiver Kernkörper in HEK293T-Zellen. (A) HEK293T-Zellen wurden mit einer gegen Gemin2-mRNA gerichteten siRNA oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert und für den angegebenen Zeitraum unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Nach der Lyse und SDS-PAGE erfolgte ein Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern, wobei  $\beta$ -Tubulin als Referenz verwendet wurde. (B) Die densitometrische Auswertung der Bandenintensität erfolgte in N=3 unabhängigen Versuchen und wurde mit den Mittelwerten und Fehlern der Standardabweichung in Relation zu  $\beta$ -Tubulin angegeben (Mann-Whitney-Test, einseitig: \*,  $p < 0,05$ ). (C) Für die Bestimmung der SMN-positiven Kernkörper wurden HEK293T-Zellen auf Poly-L-Lysin kultiviert, mit den entsprechenden siRNAs sowie zur Identifikation mit Fluorescein-markierten Oligonukleotiden co-transfiziert und nach drei Tagen unter Proliferationsbedingungen fixiert. Die immunzytochemische Markierung erfolgte mit einem SMN-Antikörper und einem gegen Maus gerichteten, Alexa555-konjugierten Sekundärantikörper. Der Kern wurde mit 4',6-Diaminphenylindol (DAPI) gefärbt (Messbalken: 25  $\mu$ m). (D) Die statistische Auswertung der Häufigkeitsverteilung SMN-positiver Strukturen, dargestellt als Mittelwerte mit den Fehlern der Standardabweichung, von N=3 unabhängigen Experimenten an insgesamt  $n \geq 800$  Zellen pro Ansatz, erfolgte mit dem  $\chi^2$ -Test (\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

#### 4.7 Das SMN-Protein interagiert mit dem Actin-Zytoskelett

Verschiedene Arbeiten weisen auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem SMN-Protein und dem Actin-Zytoskelett hin. SMN interagiert mit den Actin-bindenden Proteinen (ABP) Profilin (Giesemann et al. 1999) und  $\alpha$ -Actinin (Rajendra et al. 2007). Darüber hinaus wurde der Actin-abhängige Transport von SMN-positiven Strukturen in Axonen von embryonalen Vorderhirnneuronen aus dem Huhn beschrieben (Zhang et al. 2003). In embryonalen Motoneuronen aus der Maus konnte gezeigt werden, dass SMN über hnRNP-R den Transfer von  $\beta$ -Actin-mRNA in den Wachstumskegel vermittelt (Rossoll et al. 2003). Zusätzlich wurde kürzlich die Interaktion von SMN mit PABP in neuronalen Ausläufern beschrieben, so dass SMN vermutlich an der Assemblierung von mRNPs und am Transport weiterer mRNA-Moleküle beteiligt ist (Zhang et al. 2007).

##### 4.7.1 SMN co-lokalisiert mit G-Actin in Lamellipodien von humanen Fibroblasten und in Wachstumskegeln von PC12-Zellen

In P19-Teratocarcinoma-Zellen wurden eine Co-Lokalisation von SMN mit filamentösem Actin (F-Actin) beschrieben (Fan und Simard 2002) und in embryonalen Fibroblasten aus dem Huhn die Freisetzung SMN-positiver Granula unter Dissoziation F-Actin gezeigt (Zhang et al. 2003). Um die intrazelluläre Verteilung des endogenen SMN-Proteins in PC12-Zellen zu untersuchen, wurden diese auf Matrigel-beschichteten Deckgläsern kultiviert und für drei Tage mit NGF differenziert. Die Markierung von G-Actin erfolgte über Assoziation mit Alexa488-konjugierter DNaseI, die mit hoher Spezifität monomeres G-Actin bindet (Podolski und Steck 1988). Darüber hinaus führte das mit DNA-interagierende Enzym zu einer deutlichen Markierung des Kerns. F-Actin wurde über Assoziation von Alexa546-konjugiertem Phalloidin aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) nachgewiesen (Estes et al. 1981). SMN wurde über immunzytochemische Markierung mit dem Fluorophor Alexa633 markiert und lokalisierte ähnlich wie das überexprimierte SMN1-294-EGFP Fusionskonstrukt (vgl. Abb. 12 mit Abb. 8). Die Anzahl an nukleären SMN-positiven Kernkörpern war deutlich geringer (Abb. 12, A-III). In den Wachstumskegeln konnte eine granuläre Verteilung beobachtet werden, wobei einzelne SMN-positive Strukturen verstärkt mit monomerem G-Actin co-lokalisierten (Abb. 12, A-II). SMN war darüber hinaus nicht unmittelbar am Leitsaum, sondern eher im zentralen Bereich des Wachstumskegels angereichert. Die Phalloidin-Färbung zeigte insbesondere in den äußersten Filopodien sowie im Zytoplasma filamentöse, SMN-negative F-Actin-Strukturen.

In primären, humanen Fibroblasten verteilte sich das endogene SMN-Protein ähnlich wie in den HEK293T-Zellen (vgl. Abb. 11 mit Abb. 12). Neben SMN-positiven Kernkörpern konnten granuläre Strukturen in den Lamellipodien und Filopodien in unmittelbarer Nähe zum Leitsaum nachgewiesen werden (Abb. 12, B-II). In diesem Bereich konnte wie zuvor in den Wachstumskegeln von PC12-Zellen eine deutliche Co-Lokalisation von SMN und G-Actin beobachtet werden (vgl. Abb. 12, A-II und B-II). Dagegen zeigten die großen Phalloidin-markierten Actin-Filamente im Zytoplasma keine Überlagerung mit SMN-positiven Strukturen (Abb. 12, B-I). Möglicherweise interagiert SMN in den Zellen direkt oder indirekt mit monomerem G-Actin.

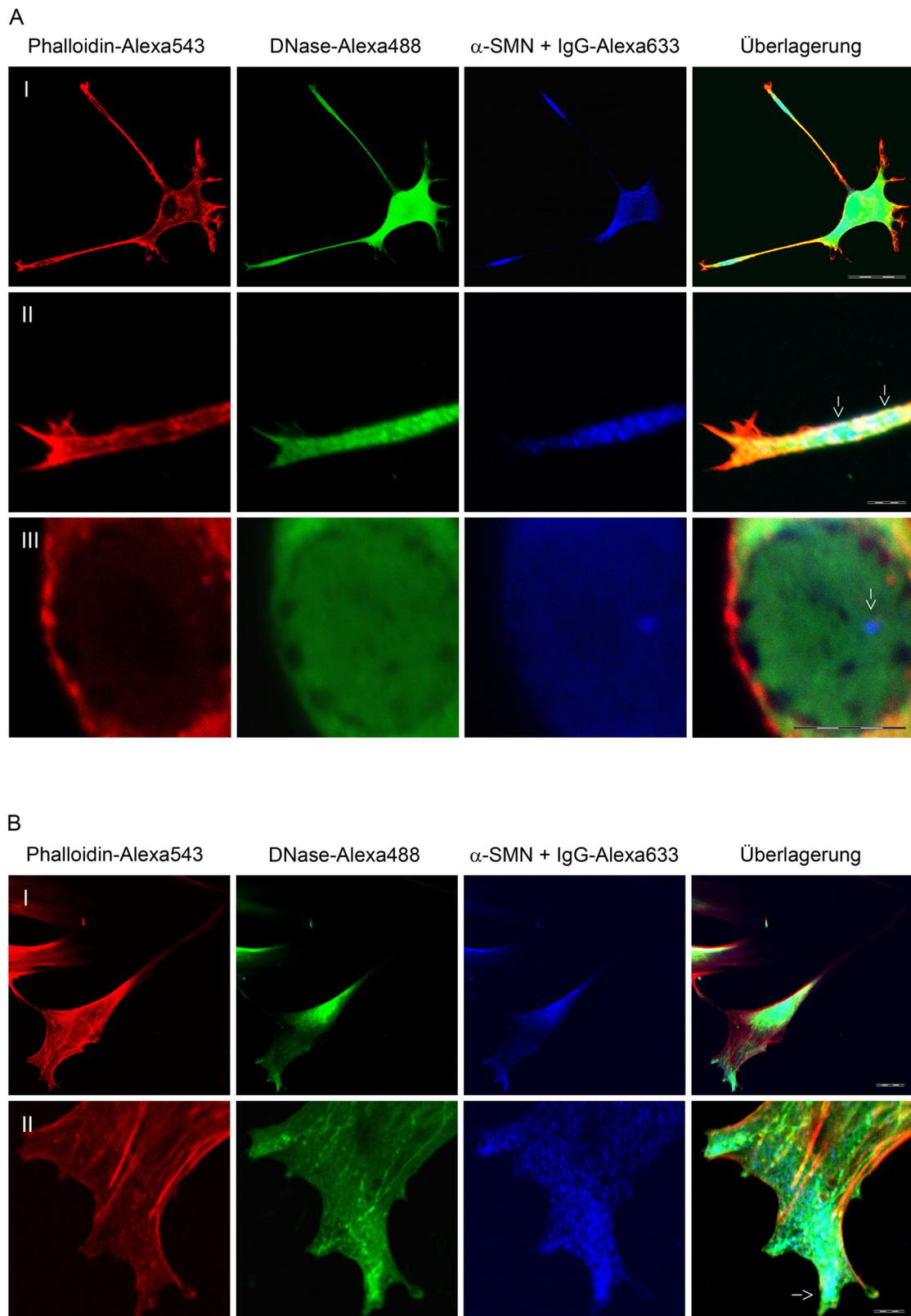


Abb. 12 Co-Lokalisation von endogenem SMN und monomerem G-Actin in Wachstumskegeln von PC12-Zellen und Lamellipodien von human primären Fibroblasten. (A) PC12-Zellen wurden auf Matrigel beschichteten Deckgläsern kultiviert und anschließend mit 100 ng/ml NGF für 72 h neuronal differenziert. Nach Fixierung erfolgte die immunzytochemische Markierung von SMN mit entsprechendem Antikörper und einem gegen Maus gerichteten, Alexa633-konjugierten Sekundäntikörper (hier blau dargestellt). G-Actin wurde durch Bindung von Alexa488-gekoppelter DNaseI und F-Actin über die Interaktion mit Alexa546-konjugierten Phalloidin nachgewiesen. Die Visualisierung repräsentativer Zellen erfolgte mit einem konfokalen Leica TCS SP2 Mikroskop. Eine Co-Lokalisation von G-Actin und SMN konnte insbesondere in den Wachstumskegeln beobachtet werden (weißer Pfeil in A-II). Darüber hinaus lokalisierte SMN in Kernkörpern (weißer Pfeil in A-III). (B) Die humanen Fibroblasten (ML35) wurden über Nacht auf unbeschichteten Deckgläsern kultiviert, fixiert und analog zu den PC12-Zellen markiert. Die Messbalken in A-I, A-III und B-I entsprechen 25  $\mu$ m, die in A-II sowie B-II 5  $\mu$ m.

#### 4.7.2 Die Interaktion von SMN mit Actin erfolgt *in vivo* nicht über den C-Terminus

SMN co-lokalisiert mit G-Actin in humanen Fibroblasten sowie in neuronal differenzierten PC12-Zellen und bindet über prolinreiche-Sequenzen im C-Terminus *in vivo* und *in vitro* an das Actin bindende Protein Profilin (Giesemann et al. 1999; Sharma et al. 2005). Um eine potentielle Interaktion von SMN und Actin *in vivo* nachzuweisen, wurde das endogene SMN-Protein oder Actin aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert und die Bindung von Actin bzw. SMN über SDS-PAGE und Westernblot untersucht. Sowohl der Zellaufschluss als auch die Pufferbedingungen mussten zunächst optimiert werden. Äquimolare Proteinmengen von Zelllysaten wurden jeweils mit SMN- bzw. Actin-Antikörpern versetzt, um in einem zweiten Schritt endogenes Protein mit Protein-G gekoppelten Agarose-Beads zu präzipitieren. Als Negativkontrolle wurden Proteinextrakte zusätzlich mit Immunglobulinen aus der Maus versetzt und auf die Beads gegeben, um unspezifische Bindungen von Actin oder SMN an Protein-G, die Agarose-Beads oder die in der Maus generierten Antikörper allgemein auszuschließen. Der Nachweis co-immunpräzipitierter Proteine erfolgte mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern in drei von einander unabhängigen Experimenten. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Actin teilweise mit dem SMN-Protein in einem Komplex vorliegt und mit diesem co-immunpräzipitiert werden kann (Abb. 13, A). Umgekehrt konnte auch am immobilisierten Actin das SMN-Protein nachgewiesen werden. Eine Bindung von Actin oder SMN an die mit Immunglobulinen aus der Maus inkubierten Beads konnte dagegen nicht beobachtet werden. Aufgrund der insgesamt schwachen Signale von co-immunpräzipitierten SMN bzw. Actin, bildet sich der Actin-SMN-Komplex jedoch möglicherweise nur temporär oder verhältnismäßig selten *in vivo* (Abb. 13, A).

*In vitro* wurde die Interaktion von Profilin mit den Aminosäure-Resten 188-294 des SMN-Proteins beschrieben (Giesemann et al. 1999). Darüber hinaus vermittelt der C-Terminus des SMN-Proteins (SMN235-294) das Wachstum neuronaler Ausläufer *in vivo* (siehe 4.4). Um zu untersuchen, ob die C-terminalen 59 Aminosäure-Reste (SMN235-294) die Assoziation mit dem Actin-Zytoskelett vermitteln, wurden die verschiedenen humanen SMN-EGFP-Fusionskonstrukte jeweils in einen p3xFlag-CMV14-Vektor umkloniert, um im Anschluss die SMN-3xFlag-Fusionsproteine über den dreifachen Flag-Tag (insgesamt 24 Aminosäure-Reste) aufzureinigen zu können. HEK293T-Zellen wurde mit Hilfe von Polyethylenimin mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und anschließend aufgeschlossen. Die Immunpräzipitation der 3xFlag-Konstrukte erfolgte jeweils über einen monoklonalen Flag-M2-Antikörper. Mit Kontrollvektor transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle, um eine mögliche unspezifische Bindung von endogenem Actin oder SMN-Protein an die Beads (s. oben) auszuschließen.

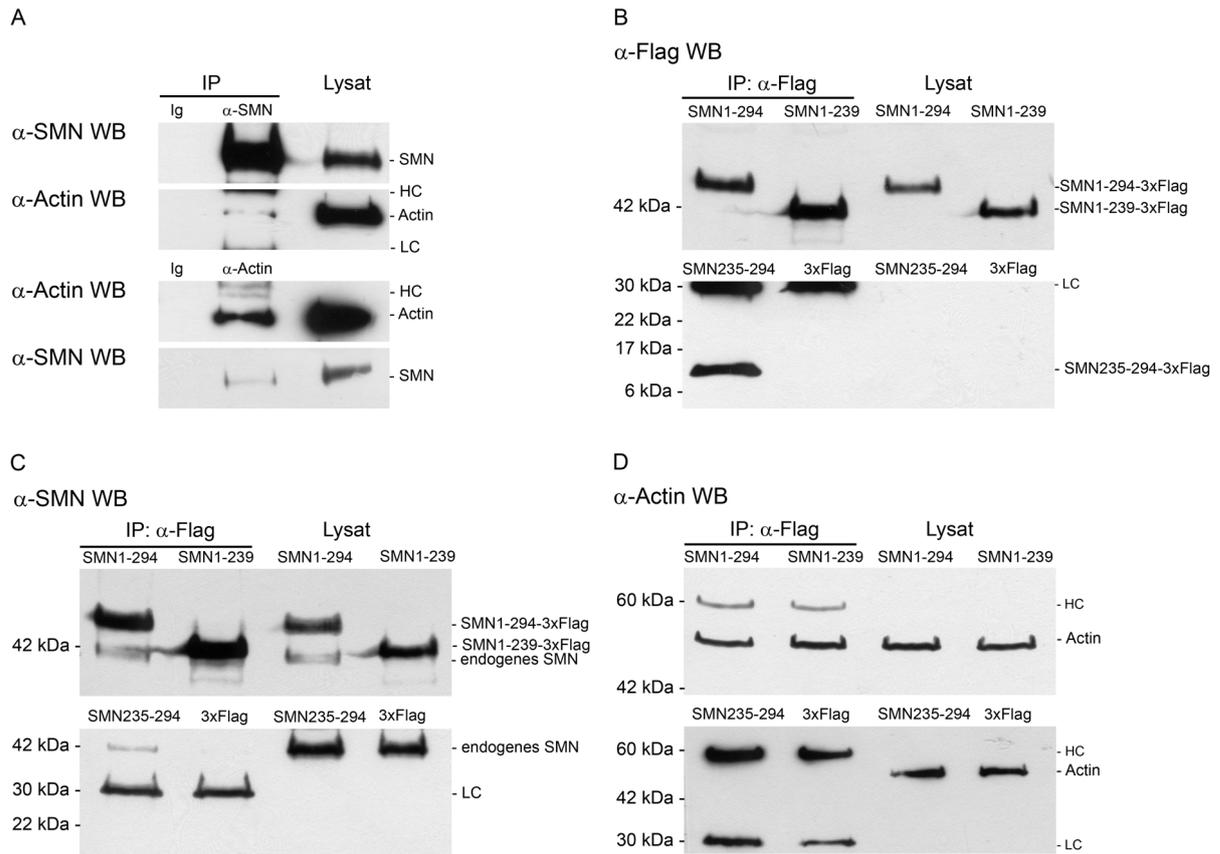


Abb. 13 Darstellung repräsentativer Westernblots der Co-Immunpräzipitation von SMN und Actin. (A) HEK293T-Zellen wurden kultiviert, zur Lyse sonifiziert und ca. 600 µg Proteinextrakt für die Immunpräzipitation (IP) mit 2 µg Maus-Immunglobulinen (Ig), α-Actin- oder α-SMN Antikörper über Nacht inkubiert. Protein-G gekoppelte Agarose-Beads wurden mit den Lösungen inkubiert, gewaschen und schließlich mit 2xLaemmli-Puffer aufgekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Westernblot (WB). Die immunpräzipitierten und assoziierten Proteine wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (IP), wobei die Probe mit den Maus-Immunglobulinen als Negativkontrolle für unspezifische Bindungen diente. Als Auftragskontrolle diente das Proteinrohextrakt vor jeglicher Prozessierung (Lysat). HC und LC bezeichnen die leichten bzw. schweren Ketten der verwendeten Immunglobuline. (B) HEK293T-Zellen wurden über Polyethylenimin mit verschiedenen SMN-3xFlag-Fusionskonstrukten bzw. dem Kontrollvektor (3xFlag) transfiziert. Wie zuvor kennzeichnen die Zahlen die Aminosäure-Reste des humanen SMN-Proteins. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse durch Sonifizierung. Das Proteinrohextrakt wurde mit 2 µg α-Flag-M2 Antikörper versetzt, wie oben beschrieben weiter verarbeitet und Flag-konjugierte sowie assoziierte Proteine auf den Beads immobilisiert. Nach SDS-PAGE/Westernblot erfolgte zunächst der Nachweis der immunpräzipitierten SMN-3xFlag-Fusionsproteine über einen Flag-M2 Antikörper. (C) Der Nachweis von endogenem SMN, welches über eine N- und C-terminale Bindungsstelle mit den SMN-3xFlag-Fusionskonstrukten di- bzw. oligomerisieren kann, erfolgte mit dem entsprechenden Antikörper. (D) Die Assoziation von Actin an das SMN-Protein (SMN1-294-3xFlag) wurde über den N-Terminus vermittelt, wie der Nachweis von co-immunpräzipitierten Actin mit der Deletionsmutante (SMN1-239-3xFlag) zeigte.

Die Präzipitation von SMN235-294-3xFlag erwies sich aufgrund der Größe (84 Aminosäure-Reste mit einem Molekulargewicht von ca. 9,2 kDa) als schwierig und der Nachweis erfolgte erst bei Anreicherung auf den Beads und nicht im Lysat (s. Abb. 13, B). Die unterschiedlich großen SMN1-294 und SMN1-239xFlag-Fusionsproteine konnten dagegen gut präzipitiert werden. Mit jedem der drei Konstrukte (SMN1-294, SMN1-239 und SMN235-294) konnte das endogene SMN-Protein aus dem Lysat co-immunpräzipitiert werden (s. Abb. 13, C). Vermittelt wird die Interaktion vermutlich über die N-terminale (AS-Reste 13-44 (Liu et al. 1997) bzw. 51-90 (Young et al. 2000)) sowie C-terminale (AS-Reste 240-277 (Lorson et al. 1998)) Selbstassoziationsdomäne. Eine unspezifische Bindung an die Beads oder den α-Flag-M2-Antikörper erfolgte nicht. Die in dieser Arbeit neu beschriebene Assoziation von SMN mit Actin konnte ferner auf die Aminosäure-Reste 1-239 des SMN-Proteins eingeschränkt werden. Eine Co-Immunpräzipitation von Actin war nur mit dem vollständigen

SMN1-294-3xFlag-Fusionskonstrukt und der Deletionsmutante SMN1-239-3xFlag, jedoch nicht mit SMN235-294-3xFlag möglich (Abb. 13, D).

#### 4.7.3 Das SMN-Protein bindet *in vitro* direkt an Actin

Die beschriebene Co-Lokalisation von SMN und Actin in Wachstumskegeln von PC12-Zellen und in Lamellipodien von humanen Fibroblasten (Abb. 12) sowie die erfolgreiche Co-Immunpräzipitation (Abb. 13, A und D) deuteten auf eine direkte oder indirekte Interaktion beider Proteine hin. Um eine mögliche direkte Bindung von Actin und SMN zu untersuchen, wurde humanes, Glutathion-S-Transferase konjugiertes SMN-Protein rekombinant in *E. coli* erzeugt (SMN1-294-GST), auf Glutathion-gekoppelten Beads immobilisiert und im Verhältnis 2:1 mit kommerziell erworbenem Actin aus dem Muskel von Kaninchen versetzt. Die entsprechende Negativkontrolle bestehend aus immobilisierter Glutathion-S-Transferase auf Glutathion-Beads wurde unter gleichen Bedingungen mit Actin versetzt, um eine unspezifische Actin Bindung an die Glutathion-S-Transferase oder die Beads auszuschließen. In drei von einander unabhängigen Experimenten konnte die direkte Bindung von Actin an das rekombinante humane SMN-Protein nachgewiesen werden. Eine unspezifische Bindung von Actin an die Beads oder Glutathion-S-Transferase wurde dabei nicht beobachtet (s. Abb. 14).

Damit konnte erstmals eine direkte Verbindung zwischen dem Actin-Zytoskelett und dem SMN-Protein gezeigt werden. (I) Das SMN-Protein und Actin interagieren direkt miteinander *in vitro*, (II) können *in vivo* aus HEK293T-Zelllysaten co-immunpräzipitiert werden und (III) co-lokalisieren in humanen Fibroblasten und in den neuronalen Ausläufern von PC12-Zellen.

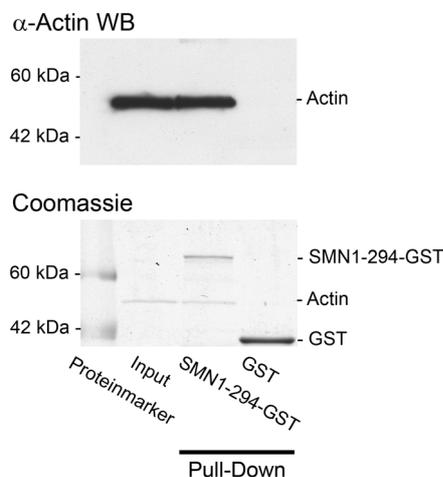


Abb. 14 Rekombinantes SMN-Protein bindet Actin *in vitro*. Mit Hilfe eines pET41a-Vektors und entsprechend transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurde Glutathion-S-Transferase gekoppeltes, humanes SMN1-Protein (SMN1-294-GST) über Glutathion-Beads aufgereinigt. Als Negativkontrolle wurden Beads mit immobilisierter Glutathion-S-Transferase verwendet. Der pull-down erfolgte bei einem SMN zu Actin Verhältnis von 2:1 und in Anwesenheit von 0,5 M NaCl und 5 % Milchpulver in RIPA-Puffer mit 0,1 % IGEPAL-CA630. Die Bindung wurde über SDS-PAGE/Westernblot nachgewiesen. Als Auftragskontrolle diente das Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gel.

#### 4.7.4 SMN knock-down führt zu einer Veränderung des G- zu F-Actin Verhältnisses in neuronal differenzierten PC12-Zellen

Die Regulation des Actin-Zytoskeletts und dessen Dynamik nimmt maßgeblichen Einfluss auf die Ausbildung neuronaler Ausläufer (Kuhn et al. 2000; Da Silva et al. 2003). Arbeiten an embryonalen

hippocampalen Neuronen aus der Ratte belegen, dass die Überexpression von dominant aktiven RhoA (V14RhoA) zu kürzeren Neuriten und einer Hyperstabilisierung von F-Actin führt (Da Silva et al. 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des endogenen SMN-Proteinspiegels zu einer signifikanten Inhibition des Neuritenwachstums in PC12-Zellen führt (Abb. 6 D). Ferner wurde nachgewiesen, dass das SMN-Protein mit Actin *in vitro* (s. Abb. 14) und *in vivo* (s. Abb. 13, A und D) interagiert.

Um den Einfluss eines reduzierten SMN-Proteinspiegels auf das G-/F-Actin-Gleichgewicht während der neuronalen Differenzierung in PC12-Zellen zu untersuchen, wurden diese wie zuvor über Elektroporation mit dem Kontrollvektor pSupp.control bzw. dem shRNA kodierenden Plasmid (pSupp.SMN) transfiziert, auf Collagen I kultiviert und für 72 h mit NGF neuronal differenziert. Zunächst wurde über SDS-PAGE und Westernblot die Veränderung des Actin-Proteinspiegels unter SMN knock-down Bedingungen untersucht (Abb. 15, A). Um auszuschließen, dass die Reduktion des SMN-Proteinspiegels direkt oder indirekt zu einer Veränderung der Actin-Genexpression führt, wurden in voneinander unabhängigen Experimenten die Proteinspiegel von SMN und Actin in Relation zur konstitutiv exprimierten GAPDH gesetzt. Dabei konnte unter SMN knock-down Bedingungen keine Veränderung der Actin-Proteinspiegel im Vergleich zu den mit Kontrollvektor transfizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 15, B).

Die Veränderung im Aufbau des Actin-Zytoskeletts wurde anschließend über eine differentielle Sedimentation des Lysats während der Ultrazentrifugation bestimmt. Während das monomere G-Actin im Überstand in Lösung blieb, wurde das filamentöse und quervernetzte F-Actin im Pellet konzentriert. Die Depolymerisation der F-Actin Filamente im Pellet für den anschließenden Westernblot erfolgte nach der Zentrifugation durch Zugabe von Cytochalasin D (Lin und Lin 1979; Flanagan und Lin 1980). Nach Auftrag äquimolarer Proteinmengen auf ein SDS-Polyacrylamidgel und anschließendem Westernblot, erfolgte der Actin-Nachweis über den entsprechenden Antikörper (Abb. 15, C). Als Positivkontrolle für F-Actin-Filamente wurden Zellen in Anwesenheit von Phalloidin, welches die F-Actin Filamente stabilisiert, lysiert und wie beschrieben aufgearbeitet (Dancker et al. 1975; Cooper 1987). Als Negativkontrolle und als Nachweis für die erfolgreiche Depolymerisation von F-Actin im Pellet durch Cytochalasin D wurden zusätzlich Zellen in Anwesenheit dieses Pilzgifts aufgeschlossen und analysiert. Nach SDS-PAGE/Westernblot konnte eine Stabilisierung der Filamente durch Phalloidin bzw. eine Depolymerisation durch Cytochalasin D in den Kontrollen bestätigt werden (Abb. 15, C). Es wurde erkennbar, dass entsprechend der Kontrolle jeweils nahezu das gesamte Actin entweder im Überstand oder im Pellet nachgewiesen werden konnte. Die Quantifizierung der Actin-Verteilung bei SMN knock-down im Vergleich zu den mit Kontrollvektor behandelten Zellen zeigte, dass die Reduktion des SMN-Proteinspiegels während der neuronalen Differenzierung mit einem signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg von F-Actin in PC12-Zellen verbunden war (s. Abb. 15, D). Die Veränderung des G- zu F-Actin Verhältnisses wurde dabei nicht durch Actin-Überexpression verursacht (Abb. 15, B). Somit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des SMN-Proteinspiegels neben einem verminderten Neuritenwachstum auch die Hyperstabilisierung von Actin-Filamenten induziert (s. Abb. 6, D und Abb. 15, D).

## Ergebnisse

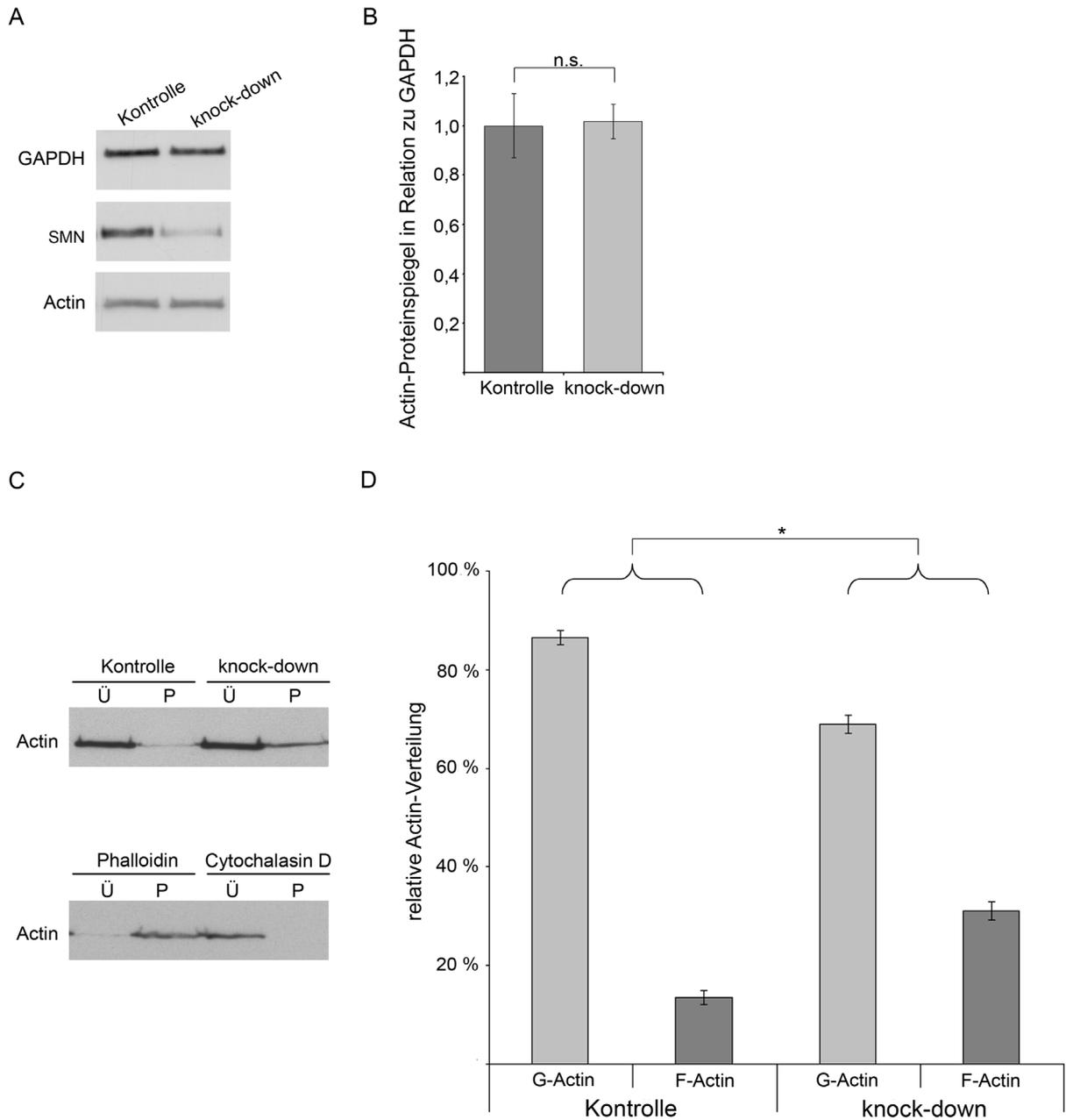


Abb. 15 SMN knock-down führt zu einer Veränderung im Aufbau des Actin-Zytoskeletts in PC12-Zellen. (A) PC12-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Kontrollvektor (pSupp.control) bzw. dem shRNA kodierenden-Plasmid (pSupp.SMN) transfiziert und wie zuvor beschrieben auf Collagen I kultiviert und für 72 h mit 100 ng/ml NGF neuronal differenziert. Die Reduktion des SMN-Proteinspiegels und die Actin-Genexpression wurden mit Hilfe von SDS-PAGE/Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Dargestellt wurde ein repräsentatives Abbild der Röntgenfilme. (B) In fünf unabhängigen Versuchen (N=5) wurde der Actin-Proteinspiegel im Verhältnis zu GAPDH über Densitometrie der Bandenintensität bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Mann-Whitney-Test (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung; n.s., nicht signifikant). (C) Die Veränderung im Aufbau des Actin-Zytoskeletts erfolgte mit Hilfe eines Sedimentationsassays. Die PC12-Zellen wurden hierzu unter SMN knock-down Bedingungen kultiviert (s. A und B), neuronal differenziert, aufgeschlossen und die Lysate mittels Ultrazentrifugation jeweils in Überstände (Ü) mit monomerem G-Actin und in Pellets bestehend aus F-Actin Filamenten fraktioniert. Zur Desintegration der Actin-Filamente wurde das Pellet mit einem äquivalenten Volumen einer 10  $\mu$ M Cytochalasin D-Lösung resuspendiert und äquimolare Proteinmengen der Pellet- und Überstand-Fraktion auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Veränderung der Actin-Verteilung wurde über einen Westernblot nachgewiesen. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden Zellen direkt in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Phalloidin bzw. 10  $\mu$ M Cytochalasin D lysiert und entsprechend aufgearbeitet. Das Alkaloid Phalloidin stabilisiert Mikrofilamente und führt zu einer Verschiebung des G- zu F-Actin-Verhältnisses zu filamentösen F-Actin. (D) Die densitometrische Auswertung erfolgte an drei unabhängigen Versuchen (N=3) und wurde mit Hilfe eines Mann-Whitney-Test auf statistische Unterschiede untersucht (\*,  $p < 0,05$ ; einseitig). Dargestellt sind die Verteilung in G- und F-Actin des nachgewiesenen Actins (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung).

#### **4.7.5 In humanen Fibroblasten aus SMA-I Patienten ist das G- zu F-Actin Verhältnis nicht verändert**

Primäre Fibroblasten von SMA-Patienten bilden eine wichtige Grundlage für molekularbiologische Arbeiten im Bereich der Spinalen Muskelatrophie (Coover et al. 1997; Lorson et al. 1999; Helmken et al. 2003) und werden häufig für die Entwicklung und erste Evaluierung möglicher Medikamente verwendet (Jablonka et al. 2000a; Brichta et al. 2003; Wolstencroft et al. 2005; Riessland et al. 2006). Um mögliche Veränderungen im zellulären G-/F-Actin-Gleichgewicht bei SMA-Patienten zu untersuchen, wurde bei Fibroblasten von SMA-Typ I Patienten das Verhältnis von G- zu F-Actin bestimmt. Die primären Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien gewonnen, genetisch charakterisiert (Brichta et al. 2003) und dem Arbeitskreis durch Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth der Universität Köln zur Verfügung gestellt. Die Patienten wiesen eine homozygote Deletion des SMN1-Gens auf und besaßen eine unterschiedliche Anzahl an SMN2-Genkopien (ML16: 3 x SMN2, ML17: 2 x SMN2, ML39: 2 x SMN2) (Brichta et al. 2003). Bei den Kontrollen handelte es sich bei ML35 um eine Kultur aus einem gesunden Patienten ohne Deletion sowie bei ML63 und ML66 um Zellen aus symptomfreien Patienten mit einer heterozygoten Deletion des SMN1-Gens.

Zunächst wurde der SMN-Proteinspiegel bei den SMA-Typ I Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen verglichen. Nach Westernblot und Densitometrie der Bandenintensität konnte eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) des SMN-Proteinspiegels in allen Proben verglichen mit den Kontrollen nachgewiesen werden, wobei eine direkte Korrelation zwischen SMN2-Kopien Anzahl und SMN-Proteinspiegel deutlich wurde (Abb. 16, A und B). Während ML17 (2 x SMN2) ein SMN-Niveau von  $45,2 \pm 10,7 \%$  und ML39 (2 x SMN2) von  $36,0 \pm 3,6 \%$  verglichen zu den Kontrollen zeigten, wurde in ML16 mit drei SMN2-Kopien nur eine Verminderung des SMN-Proteinspiegels auf  $57,9 \pm 6,4 \%$  nachgewiesen. Um auszuschließen, dass eine Veränderung im G- zu F-Actin-Verhältnis durch eine unterschiedliche Actin-Genexpression in den SMA-I Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen verursacht wird, wurde auch die Veränderung des Actin-Proteinspiegels quantifiziert. Im Vergleich konnte bei den verschiedenen Patientengruppen keine Korrelation zwischen der SMN-Genexpression und dem Actin-Proteinspiegel beobachtet werden. Das reduzierte SMN-Niveau führte zu keiner Veränderung der Actin-Genexpression (Abb. 16, B).

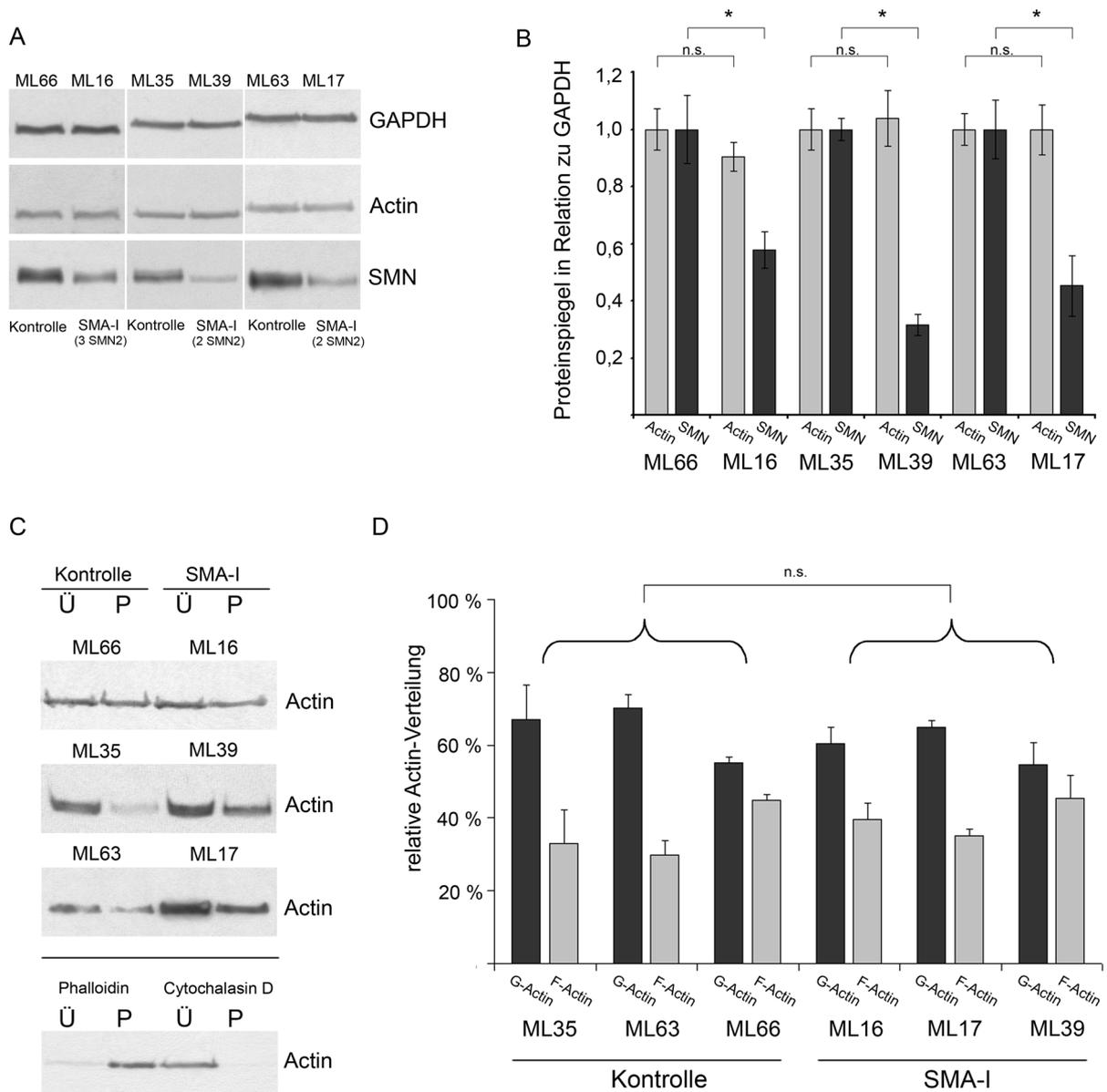


Abb. 16 Der reduzierte SMN-Proteinspiegel in primären Fibroblasten aus SMA-I-Patienten führt nicht zu einer Veränderung des G-/F-Actin Verhältnisses. Zur Untersuchung wurden drei unterschiedliche primäre Fibroblasten-Kulturen aus Patienten des SMA-Typs I herangezogen, die nach Genotypisierung eine SMN1 Deletion ( $SMN1^{-/-}$ ) und unterschiedliche SMN2-Genkopien aufwiesen (ML17, ML39: 2 SMN2 Kopien, ML16: 3 SMN2 Kopien). Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen aus den Patienten, die entweder keine (ML35) oder nur eine heterozygote Deletion (ML63 und ML66) aufwiesen und symptomfrei waren. (A) Nach Kultivierung und 80 % Konfluenz wurden die Zellen aufgeschlossen und die Veränderung der Actin- und SMN-Proteinspiegel in den Lysaten mittels SDS-PAGE/Westernblot analysiert. Es wurden exemplarische Röntgenbilder abgebildet. (B) Die Filme wurden densitometrisch vermessen und die Veränderung der Proteinspiegel in Relation zu GAPDH angegeben (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung). Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen ( $N=3$ ) erfolgte mit dem Mann-Whitney Test (\*,  $p<0,05$ ; einseitig). (C) Für die Bestimmung des G-/F-Actin Verhältnisses wurden Fibroblasten wie oben kultiviert und die Lysate durch Ultrazentrifugation fraktioniert. Die Actin-Verteilung wurde nach Auftrag äquivalenter Proteinmengen über SDS-PAGE/ Westernblots mit Actin-Antikörper analysiert. Als Kontrollen für die erfolgreiche Desintegration von Actin-Filamenten durch Cytochalasin D bzw. für deren Stabilisierung wurden ML63-Fibroblasten in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Cytochalasin D bzw.  $1 \mu\text{M}$  Phalloidin aufgearbeitet und entsprechend analysiert (Ü, Überstand; P, Pellet). (D) Die densitometrische Auswertung der Bandenintensität wurde als Verteilung des zellulären Actins in monomeres G-Actin und filamentöses F-Actin dargestellt. Der Versuch wurde für jedes der in C aufgeführten Paare mindestens vier Mal unabhängig voneinander wiederholt ( $N\geq 4$ , Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem einseitigen Mann-Whitney-Test unter Vergleich der SMA-I Patienten-Population mit der Kontroll-Gruppe (n.s., nicht signifikant).

Um den Einfluss des konstitutiv reduzierten SMN-Proteinspiegels auf das G- zu F-Actin-Gleichgewicht zu untersuchen, wurden die verschiedenen Fibroblasten-Kulturen, wie zuvor die neuronal

differenzierten PC12-Zellen (siehe 4.7.4), einem Sedimentationsassay unterworfen (Abb. 16, C). Die Auftrennung der unterschiedlichen Lysate in jeweils eine Fraktion mit monomerem G-Actin im Überstand bzw. filamentösem F-Actin im Pellet zeigte beim Vergleich von Zellen aus Kontroll- und SMA-I Patienten nach SDS-PAGE und Westernblot eine heterogene Verteilung des G-/F-Actin Verhältnisses (Abb. 16, D). Tendenziell konnte in den Kulturen aus SMA-I Patienten ein erhöhter F-Actin Anteil nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Fibroblasten ML63 und ML35 (Kontrollen) mit ML16 und ML39 (SMA-I) konnte ein Anstieg des F-Actin Anteils von  $29,9 \pm 3,8 \%$  (ML63, N=5) auf  $39,6 \pm 4,6 \%$  (ML16, N=5) bzw. von  $32,9 \pm 9,4 \%$  (ML35, N=6) auf  $45,4 \pm 6,2 \%$  (ML39, N=7) beobachtet werden (Abb. 16, D). ML17 (SMA-I) zeigte mit  $35,2 \pm 1,9 \%$  (N=4) F-Actin jedoch keinen deutlichen Unterschied zu den Kontrollen ML63 und ML35. Für die Kontrolle ML66 wurde ein F-Actin Anteil von  $44,9 \pm 1,5 \%$  (N=4) nachgewiesen, der größer als bei den SMA-I Fibroblasten ML16 ( $39,6 \pm 4,6 \%$ ) und ML17 ( $35,2 \pm 1,9 \%$ ) war. Aufgrund dieser Heterogenität konnte unter Berücksichtigung aller Proben einer Gruppe im Vergleich der Kontroll- mit der SMA-I Zellen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

#### **4.7.6 SMN knock-down führt zu Hypophosphorylierung der Lim-Kinase und deren Substrat Cofilin in neuronal differenzierten PC12-Zellen**

Der dynamische Auf- und Abbau des Actin-Zytoskelettes vermittelt das Wachstum neuronaler Ausläufer (Da Silva und Dotti 2002; Dent und Gertler 2003). Die Regulation erfolgt basal durch die Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42, die ein Netzwerk von modulatorischen Proteinen beeinflussen (Hall 1998; Schwartz 2004; Zigmond 2004). Dabei kommt der RhoA-bindenden Kinase (ROCK), im Zentralen Nervensystem insbesondere der Isoform ROCK-II, eine zentrale Bedeutung zu (Ishizaki et al. 1996; Nakagawa et al. 1996). Zielproteine dieser Serin/Threonin-Kinase sind speziell in neuronalem Gewebe Profilin2 (Da Silva et al. 2003) und die Lim-Kinase 1 (LimK1), die speziell in einigen motorischen Kernen gegenüber der LimK2 Isoform dominiert (Mori et al. 1997; Maekawa et al. 1999; Ohashi et al. 2000). Phosphorylierung der Lim-Kinase führt zur Aktivierung des Enzyms, welches im Anschluss den Umsatz von Cofilin zu Phospho-Cofilin katalysiert (Maekawa et al. 1999; Ohashi et al. 2000; Sumi et al. 2001). Cofilin bindet an F-Actin und ermöglicht sowohl ein Schneiden der Filamente unter Generierung freier (+)-Enden als auch die direkte Depolymerisation der Filamente am (-)-Ende (Nishida et al. 1984; Andrianantoandro und Pollard 2006) und wird durch Phosphorylierung inaktiviert (Yang et al. 1998; Sumi et al. 2001).

Da das SMN-Protein möglicherweise über Profilin2, welches in einem Komplex mit ROCK-II nachgewiesen werden konnte (Witke et al. 1998), mit der RhoA-ROCK-Kaskade in Wechselwirkung treten kann, wurden in neuronal differenzierten PC12-Zellen unter SMN knock-down Bedingungen die Phosphorylierungsmuster der Lim-Kinasen und deren Substrat Cofilin untersucht. PC12-Zellen wurden wie zuvor transfiziert (pSupp.control vs. pSupp.SMN), auf Collagen I kultiviert und für 72 h neuronal differenziert. Nach Aufarbeitung der Lysate und SDS-PAGE/Westernblot wurde zunächst der erfolgreiche SMN knock-down und anschließend die Expressionsniveaus von Cofilin und Lim-Kinase 1 im Vergleich mit der konstitutiv exprimierten GAPDH kontrolliert, um unspezifische Effekte der Elektroporation oder RNA-Interferenz auszuschließen (Abb. 17, A). Auf einer zweiten Membran wurden ferner die Proteinspiegel der phosphorylierten Proteine über die entsprechenden Antikörper

nachgewiesen und die Veränderung im Verhältnis zu GAPDH auf derselben Membran verglichen. Der verwendete Phospho-Lim-Kinase Antikörper ließ dabei keine Aussagen über den Anteil der beteiligten Isoformen zu, da beide Kinasen ein identisches Phospho-Epitop aufweisen. Nach Quantifizierung der Bandenintensitäten und Normalisierung der Proteinspiegel gegen GAPDH, konnte unter SMN knock-down Bedingungen eine deutliche Abnahme der Lim-Kinase Phosphorylierung beobachtet werden. Der Quotient aus phosphoryliertem Enzym zu Gesamtmenge an Enzym sank auf einen Wert von  $62,2 \pm 25,4 \%$  (N=3) verglichen mit der Kontrolle (Abb. 17, B). Die verminderte Phosphorylierung der Kinase führte zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms. Dies ist möglicherweise die Ursache für eine gleichzeitig beobachtete Abnahme der Cofilin Phosphorylierung (Abb. 17, A und B). Die Reduktion des SMN Proteinspiegels führte zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Abnahme an Phospho-Cofilin, wobei die Cofilin-Genexpression insgesamt unverändert blieb. Beim Vergleich der Kontrolle mit den SMN knock-down Zellen zeigte sich eine massive Abnahme des p-Cofilin/Cofilin-Quotienten um  $69,8 \pm 7,8 \%$  (N=4, Abb. 17, B).

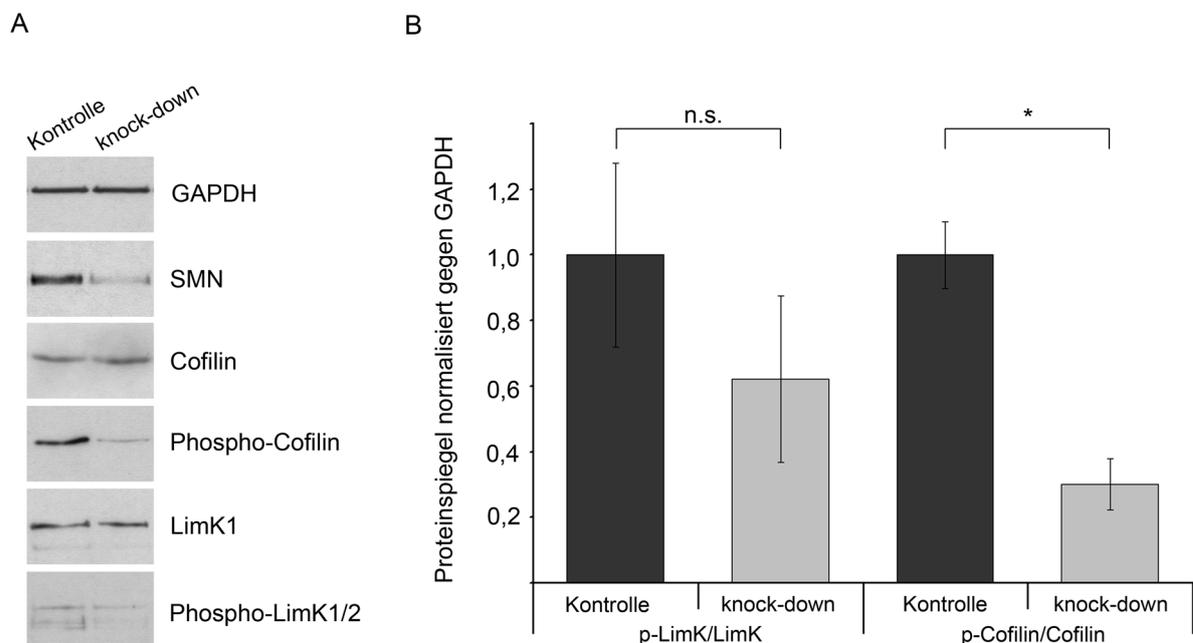


Abb. 17 Reduktion des SMN Proteinspiegels führt zu einer verminderten Phosphorylierung von Lim-Kinasen und deren Zielprotein Cofilin. (A) PC12-Zellen wurden wie bereits beschrieben über Elektroporation transfiziert (pSupp.control vs. pSupp.SMN) auf Collagen I kultiviert, und mit Hilfe von NGF für 72 h neuronal differenziert. Die Lysate wurden in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren aufgearbeitet und äquivalente Proteinmengen über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Der Nachweis von phosphorylierten Proteinen (p-Cofilin und p-LimK1/2) und Gesamtprotein (Cofilin und LimK1) erfolgte auf zwei unterschiedlichen Membranen. Der Phospho-Lim-Kinase Antikörper detektierte dabei aufgrund des homologen Epitops sowohl p-LimK1 als auch p-LimK2. (B) Die Bandenintensität einzelner Proteine wurde in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ( $N \geq 3$ ) densitometrisch quantifiziert und jeweils auf der entsprechenden Membran gegen GAPDH normalisiert. Um die Veränderung des Phosphorylierungsmusters zu analysieren, wurde die GAPDH-normalisierten Quotienten von phosphoryliertem Protein zu Gesamtprotein für die einzelnen Proben gebildet und als Mittelwerte mit den Fehlern der Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte über einen zweiseitigen Mann-Whitney-Test (\*,  $p < 0,05$ ; n.s., nicht signifikant). Aufgrund eines schlechten Signal:Hintergrund-Verhältnisses bei den verwendeten Lim-Kinase Antikörpern traten hier größere Schwankungen auf, so dass trotz eines deutlichen Trends kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und den SMN knock-down Zellen beobachtet werden konnte.

#### 4.7.7 Reduktion des SMN-Proteinspiegels während der neuronalen Differenzierung führt in PC12-Zellen zu einer Hyperphosphorylierung von Profilin2

Die RhoA-bindende Kinase II (ROCK-II) phosphoryliert Profilin2 (PFN2) (Da Silva et al. 2003). Profilin2 ist ein Actin-bindendes Protein, welches die Polymerisation von G-Actin zu F-Actin Filamenten sowohl inhibieren (Gieselmann et al. 1995; Lambrechts et al. 1995) als auch stimulieren kann (Da Silva et al. 2003; Yarmola und Bubb 2006). Profilin2 wird alternativ gespleißt, wobei Profilin2a (PFN2a) in neuronalem Gewebe die dominante Isoform dargestellt (Lambrechts et al. 2000). Neben einer Domäne für Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) (Lassing und Lindberg 1985) weist das Protein eine Polyprolin-Bindungsstelle auf, die die Interaktion mit dem C-Terminus des SMN-Proteins (Aminosäure-Reste 188–294) ermöglicht (Giesemann et al. 1999).

Um den Einfluss eines verringerten SMN-Proteinspiegels auf die Phosphorylierung von Profilin2 zu untersuchen, wurde wie zuvor in PC12-Zellen ein SMN knock-down durchgeführt und die Zellen für 72 h neuronal differenziert. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Profilin2- und ROCK-II-Genexpression unter SMN knock-down Bedingungen und die Kontrolle einer erfolgreichen Reduktion des SMN-Proteinspiegels (Abb. 18, A). Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten zeigte nach Normalisierung gegen GAPDH, dass SMN keinen Einfluss auf die Genexpression von Profilin2 oder ROCK-II ausübte. Die mit gegen SMN mRNA gerichteten shRNA behandelten Zellen zeigten im Verhältnis zu den mit Kontrollvektor transfizierten Zellen keine Unterschiede der ROCK-II oder Profilin2-Proteinspiegel. Um die Veränderung im Profilin2-Phosphorylierungsmuster unter SMN knock-down Bedingungen zu bestimmen, wurde eine isoelektrische Fokussierung der Lysate in einem Polyacrylamid-Gel mit immobilisierten Ampholyten (Klose 1975; O'Farrell 1975; Bjellqvist et al. 1982) und die Trennung nach Größe durch SDS-PAGE durchgeführt. Nach Transfer der Proben auf Nitrocellulose über Westernblot erfolgte der Nachweis von Profilin2 mit dem entsprechenden Antikörper (Abb. 18, B).

Humanes Profilin2 besitzt einen vorausberechneten isoelektrischen Punkt von 5,91 (Honore et al. 1993). Der *in silico* ermittelte isoelektrische Punkt für humanes Profilin2a bzw. PFN2a aus der *Rattus norvegicus* beträgt 6,55 (ExpASy-Server, (Bjellqvist et al. 1993)). Untersuchungen an neuronal differenzierten N1E115-Neuroblastoma-Zellen haben jedoch gezeigt, dass der rechnerisch bestimmte isoelektrische Punkt für Profilin2 (pI=6,78) aus der Maus deutlich von dem *in vitro* beobachteten Wert (pI=5,9) nach 2D-Gelelektrophorese abweichen kann (Oh et al. 2006). Rechnerisch ließ sich ferner eine Vorhersage über mögliche Serin-/Threonin- bzw. Tyrosin-Reste für eine Phosphorylierung treffen ((Blom et al. 1999), NetPhos2.0 Server, Technical University of Denmark). Demnach gäbe es fünf potentielle Serin-, aber keine Threonin-Reste, die durch eine Serin/Threonin-Kinase, z.B. ROCK phosphoryliert werden könnten.

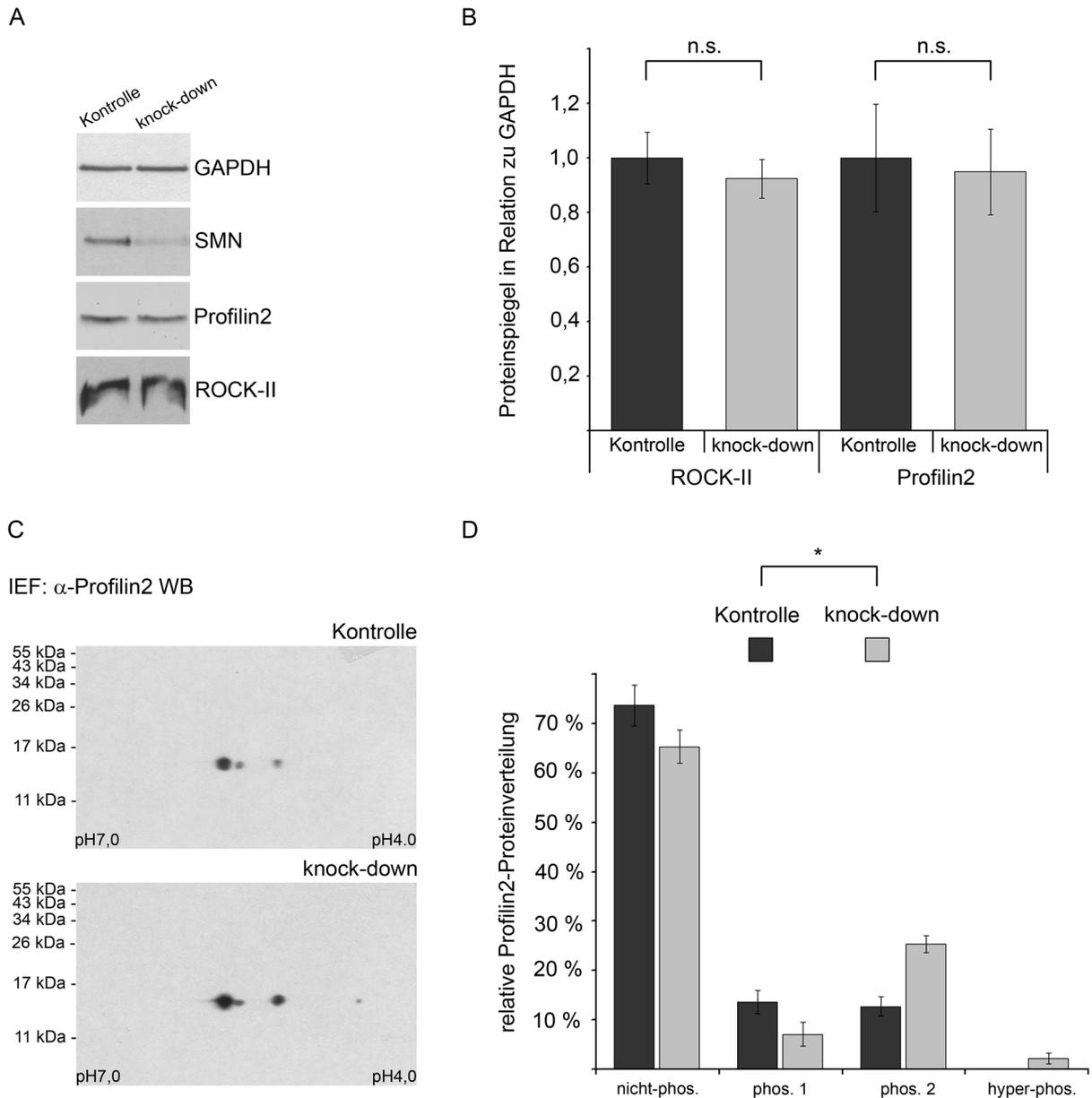


Abb. 18 SMN knock-down führt zu einer Hyperphosphorylierung von Profilin2 in PC12-Zellen. (A) PC12-Zellen wurden elektroporiert (pSupp.control vs. pSupp.SMN), auf Collagen I kultiviert und nach 24 h für 72 h mit 100 ng/ml NGF neuronal differenziert. Nach SDS-PAGE/Westernblot wurde die Veränderung der Proteinspiegel von Profilin2 und der RhoA bindenden Kinase 2 (ROCK2) im Vergleich zu GAPDH mit den entsprechenden Antikörpern bestimmt. Der Nachweis von SMN diente als Kontrolle für einen erfolgreichen knock-down. (B) In drei unabhängigen Experimenten (N=3) wurde die Bandenintensitäten densitometrisch bestimmt, gegen GAPDH normalisiert und die Mittelwerte mit den entsprechenden Fehlern der Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Mann-Whitney-Test (n.s., nicht signifikant). (C) Die Lysate wurden dialysiert und über 2D-Gelelektrophorese ihrem isoelektrischen Punkt (pH 4,0 – 7,0) sowie ihrer Größe nach entsprechend aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Nachweis erfolgte über einen ROCK-II bzw. Profilin2-Antikörper. Dargestellt sind zwei repräsentative Röntgenfilme, die bei SMN knock-down bzw. der Kontrolle unterschiedliche Profilin2-Phosphorylierungsmuster zeigen. (D) Die densitometrische Auswertung aus jeweils drei unabhängigen Versuchen (N=3) wurde als relative Profilin2-Verteilung je Spot im Verhältnis zur Gesamt-Profilin2-Proteinmenge unter Kontroll- bzw. SMN knock-down Bedingungen dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  Fehler der Standardabweichung). Der statistische Vergleich der Verteilungen erfolgte über einen  $\chi^2$ -Test für einen Trend (\*,  $p < 0,05$ ).

Die IEF-Fokussierung zeigte für die Kontrollvektor behandelten Zellen drei unterschiedlich große PFN2-Signale, wobei das größte mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von ca. 5,7 nicht-phosphoryliertem Profilin2 entsprechen sollte. Unter SMN knock-down Bedingungen konnte ein zusätzliches, viertes PFN2-Signal bei einem sehr niedrigen pH-Wert (pH 4,1 bis 4,5) sowie eine Signalzunahme des dritten Spots bei ca. pH 5,1 beobachtet werden (Abb. 18, C). Die Quantifizierung

der veränderten relativen Signalintensitäten zeigte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Rechts-Verschiebung in der Profilin2-Verteilung (Abb. 18, D). Der Anteil an nicht- bzw. gering phosphoryliertem PFN2 nahm beim Vergleich von Kontrolle zu SMN knock-down von  $73,7 \pm 4,1$  auf  $65,4 \pm 3,3$  % (nicht-phos., pl 5,7) bzw. von  $13,6 \pm 2,3$  auf  $7,1 \pm 2,4$  % (phos. 1, pl 5,5) ab. Dagegen stieg unter SMN knock-down Bedingungen die Menge an mehrfach phosphoryliertem Profilin2 um Faktor 2 von  $12,7 \pm 2,0$  auf  $25,4 \pm 1,7$  % (phos. 2, pl 5,1) beim dritten Signal an. Darüber hinaus induzierte der reduzierte SMN-Proteinspiegel eine Hyperphosphorylierung von Profilin2, welches mit einem pl von 4,1 bis 4,4 nachgewiesen wurde (Abb. 18, D).

#### **4.7.8 Keine funktionelle Wiederherstellung des Neuritenwachstums durch ROCK Inhibition unter SMN knock-down Bedingungen in PC12-Zellen**

Die RhoA-bindende Kinase II nimmt über die Lim-Kinase Einfluss auf die Phosphorylierung und Aktivität von Cofilin (Maekawa et al. 1999). Darüber hinaus phosphoryliert ROCK-II Profilin2 (Da Silva et al. 2003). Die ROCK-Inhibition mit dem kompetitiven Inhibitor Y27632 rief bei einer Konzentration von  $37 \mu\text{M}$  in embryonalen hippocampalen Neuronen der Ratte sowie bei  $25 \mu\text{M}$  in PC12-Zellen einen Anstieg des Wachstums neuronaler Ausläufer hervor (Da Silva et al. 2003; Zhang et al. 2006b). Profilin2 bildet einen Komplex mit ROCK-II (Witke et al. 1998) und ist in der Lage das SMN-Protein zu binden (Giesemann et al. 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der SMN knock-down in PC12-Zellen zu einer Veränderung der Profilin2-, LimK- und Cofilin-Phosphorylierung (s. Ziff. 4.7.6, Abb. 17 B und 4.7.7, Abb. 18 D) führte sowie eine Stabilisierung von F-Actin (s. Ziff. 4.7.4, Abb. 15) und eine Hemmung des Neuritenwachstums induzierte (s. Ziff. 4.4, Abb. 9).

Um zu untersuchen, ob die Behandlung von PC12-Zellen mit Y27632 unter SMN knock-down Bedingungen eine funktionelle Wiederherstellung des Neuritenwachstums induziert, wurden die Zellen wie zuvor beschrieben transfiziert (pDsRed2 + pSupp.control vs. pSupp. SMN) und auf Collagen I kultiviert. Die neuronale Differenzierung erfolgte zunächst mit NGF in Serum-reduziertem Medium in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von  $37 \mu\text{M}$  Y27632 für 72 h (Abb. 19, A). Die Identifikation transfizierter Zellen erfolgte über das rot-fluoreszierende DsRed2. Die Zugabe des ROCK-Inhibitors führte sowohl bei den mit Kontrollvektor als auch bei den mit shRNA kodierenden Plasmid behandelten Zellen zu einer verstärkten Verzweigung und einer höheren Anzahl von neuronalen Fortsätzen (Abb. 19, A). Zusätzlich zeigte die quantitative Auswertung der Kontrolle tendenziell ein verstärktes Längenwachstum des größten neuronalen Fortsatzes von durchschnittlich  $106,8 \pm 7,8$  auf  $118,4 \pm 8,5 \mu\text{m}$  in Anwesenheit des Inhibitors, wobei die Änderung statistisch nicht signifikant war. Unter SMN knock-down Bedingungen in Abwesenheit von Y27632 konnte wie bereits zuvor eine signifikante Abnahme des Neuritenwachstums im Mittel um  $14,9 \pm 6,1$  % beobachtet werden (Abb. 6, D und Abb. 19, B). Die Zugabe des ROCK-Inhibitors zeigte während des SMN knock-downs keinen positiven Effekt auf das Längenwachstum. Mit einer durchschnittlichen Neuritenlänge von  $86,9 \pm 6,5 \mu\text{m}$  waren die Ausläufer  $18,6 \pm 5,7$  % kürzer als die Kontrollvektor transfizierten Zellen (Abb. 19, D).

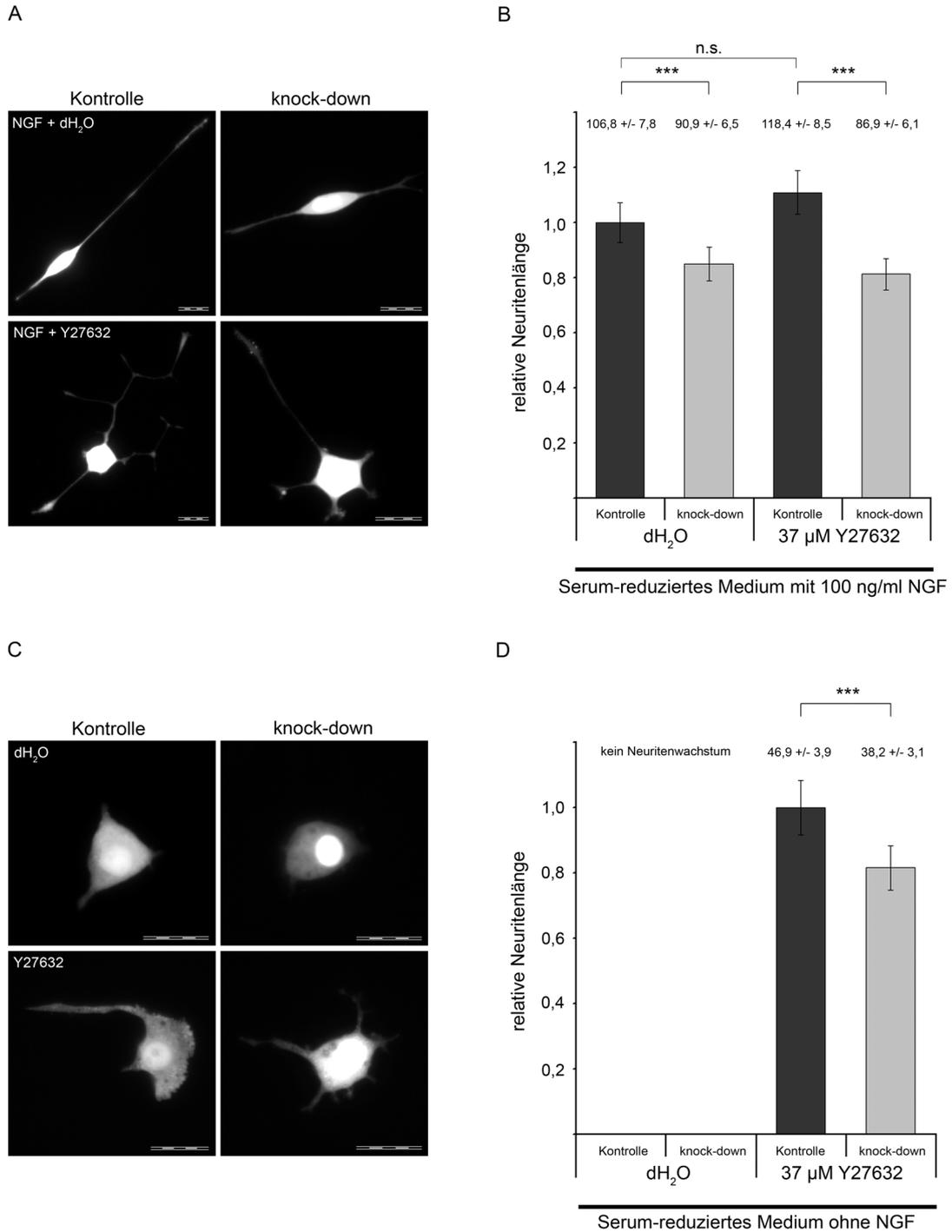


Abb. 19 Der ROCK-Inhibitor Y27632 führt unter SMN knock-down Bedingungen zu keiner funktionellen Wiederherstellung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen. (A) PC12 Zellen wurden wie bereits beschrieben über Elektroporation mit dem pDsRed2-Vektor zur Identifikation transfizierter Zellen und pSupp.control bzw. pSupp.SMN transfiziert und auf Collagen I kultiviert. Die Differenzierung mit 100 ng/ml NGF für 72 h erfolgte entweder in Ab- oder Anwesenheit von 37 µM Y27632 ROCK-Inhibitor. Dargestellt sind DsRed2-positive Zellen, wobei der Messbalken 25 µm entspricht. (B) In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils die neuronalen Ausläufer DsRed2-positiver PC12-Zellen ( $n > 180$  Zellen pro Bedingung) wie zuvor bestimmt und die Mittelwerte der absoluten (in µm) und relativen Länge mit den Fehlern der Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte über einen zweiseitigen Mann-Whitney-Test (\*\*\*,  $P < 0,0001$ ). (C) PC12-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert, allerdings erfolgte keine neuronale Differenzierung über NGF. Stattdessen erfolgte eine Kultivierung für 72 h unter Serum-Reduktion in An- bzw. Abwesenheit von 37 µM Y27632. Repräsentative DsRed2-positive Zellen sind in Grauwerten dargestellt (Messbalken: 25 µm). (D) Die Quantifizierung der Neuritenlänge unter Anwesenheit von 37 µM ROCK-Inhibitor Y27632 in Abwesenheit von NGF erfolgte an jeweils  $n > 145$  Zellen pro Bedingung in drei unabhängigen Experimenten ( $N = 3$ ). In Abwesenheit von NGF und Y27632 konnten keine neuronalen Fortsätze identifiziert werden. Bei den mit Inhibitor behandelten Zellen konnte aufgrund der kurzen Ausläufer nur unter Ausschluss des zuvor definierten Kriteriums 3 „Neuriten sind länger als 40 µm“ eine Längenbestimmung durchgeführt werden. Dargestellt wurden wie oben beschrieben die Mittelwerte der relativen und absoluten Neuritenlänge. Signifikante Unterschiede konnten aufgrund der Abwesenheit von Neuriten in der bidest. H<sub>2</sub>O Kontrolle nur für die ROCK-Inhibitor behandelten Zellen angegeben werden und wurden über einen zweiseitigen Mann-Whitney-Test ermittelt (\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

Die Signaltransduktion des neurotrophen Faktors NGF erfolgt hauptsächlich über den Rezeptor p75 sowie über Dimerisierung und Transphosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase TrkA (Huber et al. 2003). p75 führt zur Inhibition von RhoA und ROCK (Yamashita et al. 1999), während die Aktivierung von TrkA in PC12-Zellen sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-translationaler Ebene regulativ in die neuronale Differenzierung eingreift (Vaudry et al. 2002). So kommt es über Ras, B-Raf, Mek und Erk zu einer differentiellen Aktivierung des MAPK-Weges (MAPK: Mitogen-aktivierte-Proteinkinase) (Vaudry et al. 2002). Darüber hinaus aktiviert TrkA in PC12-Zellen die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die unter anderem über Rac1 RhoA inhibiert (Nusser et al. 2002).

Um den Einfluss des ROCK-Inhibitors auf das Neuritenwachstum frei von NGF-vermittelten Effekten zu untersuchen, wurden PC12-Zellen nach der Transfektion (pDsRed2, pSupp.control vs. pSupp.SMN) für drei Tage in serumreduziertem Medium auf Collagen I kultiviert und anschließend fixiert. In Abwesenheit von NGF zeigten sowohl die Kontrollvektor-behandelten als auch die SMN knock-down Zellen keine neuronalen Ausläufer (s. Abb. 19, C). An sehr wenigen Zellen konnten Fortsätze mit einer Länge von ca. 5  $\mu\text{m}$  beobachtet werden (s. Abb. 19, D), diese erfüllten aber nicht die zuvor festgelegten Kriterien (s. Ziff. 3.6.4) für neuronale Ausläufer (Größe von mindestens einem Zelldurchmesser und eine Länge von mehr als 40  $\mu\text{m}$ ). Es wurde daher auf die Ausschlussgrenze von 40  $\mu\text{m}$  verzichtet, jedoch an einer Ausläuferlänge von mindestens einem Zelldurchmesser festgehalten, damit Fortsätze als solche zweifelsfrei identifiziert werden konnten. In Abwesenheit von NGF konnten unter Berücksichtigung der Kriterien keine Ausläufer nachgewiesen werden. Die Zugabe von 37  $\mu\text{M}$  ROCK-Inhibitor in das serumreduzierte Medium führte zur Ausbildung von Fortsätzen, die morphologisch denen von NGF stimulierten Zellen entsprachen. Der Anteil an Zellen mit Ausläufern nahm unter Y27632 Behandlung deutlich zu. Nach 72 h konnte bei den Kontrollvektor-behandelten Zellen eine durchschnittliche Länge der Ausläufer von  $46,9 \pm 3,9 \mu\text{m}$  beobachtet werden (Abb. 19, D). Unter SMN knock-down Bedingungen konnte in Anwesenheit des Inhibitors ebenfalls ein starker Anstieg des Längenwachstums im Vergleich zu den mit bidest. H<sub>2</sub>O behandelten Zellen beobachtet werden, allerdings war die durchschnittliche Neuritenlänge mit  $38,2 \pm 3,1 \mu\text{m}$  signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedriger als bei den mit Kontrollplasmid behandelten Zellen (Abb. 19, D). Damit veränderte die Anwesenheit von NGF zwar die absolute Länge der Ausläufer nicht aber das Verhältnis von Kontrollvektor-behandelten zu SMN knock-down Zellen. In Anwesenheit von Y27632 betrug der Quotient der Neuritenlänge aus SMN knock-down zu Kontrolle mit NGF  $0,81 \pm 0,06$  und ohne NGF  $0,82 \pm 0,07$  (vgl. Abb. 19, B und D). Y27632 stimuliert zwar in Abwesenheit neurotropher Faktoren das Längenwachstum von Fortsätzen, der Inhibitor ermöglicht jedoch bei reduziertem SMN-Proteinspiegel und damit verbundenem vermindertem Neuritenwachstum nicht die funktionelle Kompensation des SMN vermittelten Defekts. Somit scheint das SMN-Protein und die RhoA-ROCK-Signalkaskade in einem gemeinsamen Weg zu münden. Darüber hinaus liegt das SMN möglicherweise unterhalb von ROCK, da der Inhibitor auch unter SMN knock-down Bedingungen das Neuritenwachstum deutlich steigerte.

## 5 Diskussion

### 5.1 Das SMN-Protein und Wachstum neuronaler Ausläufer

Bei der infantilen Spinalen Muskelatrophie (SMA) kommt es zur Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und Hirnstamm, die zur Denervation der Muskelendplatte und zur Atrophie der betroffenen Muskeln führt (Crawford und Pardo 1996). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von primären Motoneuronen und der Schwierigkeit die Zellen zu transfizieren, wurde in dieser Arbeit ein SMA-Zellkulturmodell in PC12-Zellen entwickelt, um die Funktion des SMN-Proteins in neuronalen Ausläufern zu untersuchen.

Während der NGF-vermittelten Differenzierung der PC12-Zellen konnte parallel zum Neuritenwachstum ein Anstieg des SMN-Proteinspiegels beobachtet werden. Der shRNA-vermittelte knock-down des endogenen SMN-Proteins führte während der neuronalen Differenzierung zu einer Abnahme des Proteinspiegels um ca. 53 % und zu einer Hemmung des Längenwachstums neuronaler Ausläufer. Das reduzierte SMN-Protein Niveau in den PC12-Zellen ähnelte der Situation in Patienten, da ein analoger SMN-Proteinspiegel in primären Fibroblasten aus SMA-Typ 1 Patienten beobachtet werden konnte (s. Abb. 16, B). Die Überexpression des humanen SMN1-294-EGFP-Proteins rief umgekehrt ein verstärktes Neuritenwachstum hervor. Eine Deletionsmutante aus den ersten 239 Aminosäure-Resten des humanen SMN-Proteins zeigte im Vergleich zum Kontrollvektor keinen, im Vergleich zu SMN1-294-EGFP einen inhibierenden Einfluss auf das Neuritenwachstum. Das Fusionskonstrukt ähnelt einer in SMA-Patienten beobachteten Mutation des SMN-Gens, die zur Translation eines defekten SMN-Proteins (SMN $\Delta$ 7) bestehend aus den Aminosäure-Resten 1-278 führt (Lorson et al. 1999).

Aufgrund der Beobachtung, dass die Reduktion des endogenen SMN-Proteinspiegels in neuronal differenzierten PC12-Zellen eine Hemmung und die Überexpression des humanen SMN-Proteins eine Stimulation des Neuritenwachstums induzierte, besteht möglicherweise eine direkte Korrelation zwischen der Länge der Ausläufer und dem SMN-Proteinspiegel. Dabei scheint das SMN-Protein einen modulierenden Effekt auf das Neuritenwachstum auszuüben, da der SMN-Proteinspiegel die Neuritenlänge nur zu 10 bis 20 % beeinflusste. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass trotz des SMN knock-downs der verbleibende SMN-Proteinspiegel relativ hoch war. Möglicherweise könnte bei einer deutlicheren Reduktion des SMN-Proteins ein größerer Effekt beobachtet werden. Darüber hinaus wurde bei der Bestimmung der Neuritenlänge eine Mindestgröße von einem Zelldurchmesser und einer Länge von 40  $\mu$ m vorgegeben, so dass lediglich der Einfluss auf größere Ausläufer und nicht auf kleine Zellfortsätze untersucht wurde. Aufgrund des Versuchsaufbaus, insbesondere bei der Co-Transfektion mehrerer Vektoren, sind außerdem System-inhärente Fehler nicht auszuschließen. Gleichwohl wurden bereits 72 h nach NGF Zugabe signifikante Unterschiede in der Neuritenlänge erkennbar. Diese Daten werden durch ähnliche Untersuchungen, bei denen eine stimulierende Wirkung des murinen SMN-Proteins auf das Neuritenwachstum gezeigt wurde, gestützt (Rossoll et al. 2003). Die Überexpression von humanem hSMN $\Delta$ 7-EGFP führte im Vergleich zum hSMN<sup>wt</sup>-EGFP-Protein in Vorderhirn-Neuronen aus dem Huhn zu verkürzten neuronalen Ausläufern (Zhang et al. 2003). Die Ergebnisse entsprechen den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zu SMN1-294- und SMN1-239-EGFP (s. oben).

Durch einen SMN knock-down und simultane Überexpression des C-terminalen SMN-Konstrukts konnte darüber hinaus erstmals gezeigt werden, dass die Aminosäure-Reste 235-294 des humanen SMN-Proteins unabhängig vom endogenen SMN-Proteinspiegel eine funktionelle Wiederherstellung des Neuritenwachstums ermöglichen (s. Abb. 9). Dabei ist auffällig, dass eine Oligomerisierung von SMN1-239-EGFP über die durch Exon 2b kodierte Domäne (Young et al. 2000) mit dem endogenem SMN-Protein, die auch bei der Co-Immünpräzipitation von SMN1-239-3xFlag und dem SMN<sup>wt</sup>-Protein in HEK293T-Zelllysaten beobachtet wurde (s. Abb. 13, C), keinen positiven Effekt auf das Auswachsen neuronaler Fortsätze zeigte. Eine vom zytoplasmatischen SMN-Oligomer unabhängige Funktion wird durch die Beobachtung gestützt, dass das SMN235-294-EGFP auch unter SMN knock-down Bedingungen das Wachstum neuronaler Ausläufer wiederherstellen konnte. Aufgrund des basalen SMN-Proteinspiegels unter SMN knock-down Bedingungen in den PC12-Zellen kann eine Heterodimerisierung der C-terminalen Deletionsmutante (SMN235-294) mit dem verbliebenen endogenen SMN-Protein nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch bei einem reduzierten SMN-Proteinspiegel nur die Überexpression von SMN235-294- und nicht von SMN1-239-EGFP das Neuritenwachstum wiederherstellen konnte, gleichwohl beide Mutanten eine SMN-Oligomerisierungsdomäne aufwiesen, ist eine Heterodimerisierung mit endogenem SMN-Protein als Ursache für die Stimulation unwahrscheinlich.

Dieser durch Exon 6 und 7 kodierte C-Terminus ist mit verschiedenen Punktmutationen assoziiert, die bei SMA-Patienten beobachtet wurden (Lefebvre et al. 1995; Hahnen et al. 1997; Rochette et al. 1997; Talbot 1997; Wang et al. 1998). Der C-Terminus vermittelt die Bindung insbesondere von Profilin (Giesemann et al. 1999), hnRNP-R und hnRNP-Q (Rossoll et al. 2002), Gemin3 (Charroux et al. 1999), Gemin7 (Baccon et al. 2002) und enthält jeweils eine der beiden Sm-Protein- und Oligomerisierungsdomänen (Liu et al. 1997; Lorson et al. 1998). Sowohl die über die Tudor-Domäne (AS-Reste 91-144) vermittelte direkte Wechselwirkung mit den SmD1 und SmD3-Proteinen (Ponting 1997; Selenko et al. 2001), als auch die N-terminale Interaktion (As-Reste 13-90) mit Gemin2 (Liu et al. 1997; Young et al. 2000) sind jedoch aufgrund der Abwesenheit entsprechender Bindungsdomänen gestört. Auch die beschriebene indirekte Assoziation von Gemin5 über Gemin2 an das SMN-Protein (Otter et al. 2007) ist unter diesen Umständen erschwert oder ausgeschlossen.

Es wurde in einem *in vitro* Spleiß-Assay gezeigt, dass die SMN $\Delta$ N27-Deletionsmutante, bei der N-terminal die ersten 27 Aminosäure-Reste fehlen, im Vergleich zum natürlichen SMN, Defekte bei der Assemblierung von spleißosomalen UsnRNPs bewirkte (Pellizzoni et al. 1998). Darüber hinaus führte in Oozyten aus dem afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) eine Antikörper-vermittelte Inhibition der Gemin2-Bindung an das SMN-Protein zur Störung der Assemblierung spleißosomaler UsnRNPs (Fischer et al. 1997). Aktuelle Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse und beschreiben bei einem Gemin2 knock-down die eingeschränkte Assemblierung des Sm-Heptamers und des spleißosomalen UsnRNP-Komplexes in HeLa-Zellextrakten (Feng et al. 2005; Shpargel und Matera 2005). Der Gemin5 knock-down ruft ebenfalls einen Aktivitätsverlust des SMN-Komplexes bei der Assemblierung von UsnRNPs hervor und führt zu einer verminderten Bindung von U4snRNA an den SMN-Komplex in Zellextrakten (Battle et al. 2006). Eine gestörte Assemblierung von UsnRNPs am SMN-Komplex wurde auch bei der Antikörper-vermittelten Inhibition einer Sm-Protein-Bindung an die Tudor-Domäne beschrieben (Buhler et al. 1999). Darüber hinaus wurde kürzlich berichtet, dass in

einem Zebrafisch-SMA-Modell die C-terminale Deletionsmutante (Exon $\Delta$ 7-VDQNNQKE) axonale Defekte unabhängig von einer SMN-Oligomerisierung oder Sm-Protein-Bindung kompensiert (Carrel et al. 2006). In dem Artikel fehlen jedoch die entsprechenden Abbildungen. Da die genannte Mutante sowohl beide Sm-Protein-Bindungsdomänen (Exon 3 (Buhler et al. 1999), Exon 6 (Liu et al. 1997)), als auch die Selbstassoziationsbereiche (Exon2b (Young et al. 2000), siehe auch Abb. 13 C: Co-Immunpräzipitation des endogenen SMN-Proteins mit SMN1-239-3xFlag in HEK293T-Lysaten) und Exon 6 (Lorson et al. 1998)) kodiert, sind diese Ergebnisse allerdings nicht eindeutig.

Gleichwohl führen die aufgeführten Befunde zu der Frage, welche Bedeutung die Assemblierung von snRNPs bei der Vermittlung des Neuritenwachstums zukommt. Zahlreiche Hinweise lassen eine von der snRNP-Assemblierung unabhängige Funktion des SMN-Proteins vermuten: (I) Verschiedene Sm-Proteine (Buhler et al. 1999), Gemin2 (Fischer et al. 1997; Young et al. 2000) sowie wahrscheinlich Gemin5 über Gemin2 (Otter et al. 2007) binden N-terminal an das SMN-Protein und wurden als essentiell für den Aufbau spleißosomaler snRNPs beschrieben (Feng et al. 2005; Battle et al. 2006), können jedoch nicht mit dem C-Terminus (AS-Reste: 235-294) in Wechselwirkung treten. Unter SMN knock-down Bedingungen war die Überexpression der C-terminalen Domäne jedoch hinreichend, um das gestörte Neuritenwachstum wiederherzustellen. (II) Darüber hinaus wurde während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen keine Co-Regulation der SMN-Genexpression mit verschiedenen Interaktionspartnern des snRNP/SMN-Komplexes, wie z.B. Gemin2, SmB oder PRMT5, beobachtet. Obwohl der SMN-Proteinspiegel deutlich anstieg, blieb die Genexpression der mit dem perinukleären SMN-Komplex assoziierten Proteine unverändert. Eine gesteigerte Assemblierung von snRNPs am SMN-Komplex sollte aufgrund des stöchiometrischen Bedarfs entsprechend mit einem Anstieg des Gemin2- und SmB-Proteinspiegels verbunden sein. (III) Immunzytochemische Arbeiten an unterschiedlichen kultivierten Neuronen deuten darauf hin, dass ein axonaler SMN-Komplex eine im Vergleich zum perinukleären UsnRNP/SMN-Komplex unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen muss. Quantitative Untersuchungen zur Verteilung des SMN-Proteins, Gemin2 und Gemin3 in Axonen von hippocampalen Neuronen aus der Ratte belegen, dass SMN-positive Strukturen nur zu 40 % mit Gemin2 und zu 48 % mit Gemin3 co-lokalisieren (Zhang et al. 2006a). Zusätzlich konnte in PC12-Zellen eine Co-Lokalisation von SMN mit Gemin2, Gemin6 und Gemin7, nicht jedoch mit Sm-Proteinen beobachtet werden (Sharma et al. 2005). In Motoneuronen, die aus Stammzellen generiert wurden, konnten in Axonen nur sehr vereinzelt Sm-Proteine nachgewiesen werden (Zhang et al. 2006a). Die alternative Zusammensetzung deutet ebenfalls auf eine von der snRNP-Assemblierung unabhängige Funktion in neuronalen Ausläufern hin.

## **5.2 Das SMN-Protein und Gemin2 zeigen einen gegensätzlichen Einfluss auf das Neuritenwachstum und eine Synergie bei der Assemblierung von Kernkörpern**

Um den potentiellen Einfluss der Gemin2-SMN-Wechselwirkung auf das Neuritenwachstums in PC12-Zellen zu untersuchen, wurde ein Gemin2 knock-down durchgeführt und Gemin2 überexprimiert. Die Gemin2-Überexpression hemmte, der knock-down förderte das Wachstum neuronaler Ausläufer in PC12-Zellen. Damit zeigte der Gemin2-Proteinspiegel einen zum SMN-Protein antagonistischen Effekt auf das Neuritenwachstum. Möglicherweise führte der Gemin2 knock-down zur Freisetzung des SMN-Proteins aus dem zytoplasmatischen UsnRNP/SMN-Komplex, so dass eine „axonale“ SMN-Funktion

verstärkt unterstützt wurde. Umgekehrt könnte die Überexpression von Gemin2 eine Komplexierung von SMN und Gemin2 induziert und somit die Menge an freiem SMN reduziert haben. Die Hypothese wird durch die in unserer Arbeitsgruppe gemachte Beobachtung gestützt, dass *in vitro* Gemin2 am SMN-Protein durch FGF-2<sup>23</sup> ab einem Verhältnis von 2:1 kompetitiv verdrängt wird (Bruns et al. 2007). *In vivo* führte die Co-Transfektion von SMN1-294 und FGF-2<sup>23</sup> im Vergleich zu SMN1-294 zu einer Inhibition des Neuritenwachstum in neuronal differenzierten PC12-Zellen (van Bergeijk 2004). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass der Gemin2 knock-down die N-terminale Oligomerisierung von SMN-Proteinen hemmt und den snRNP/SMN-Komplex destabilisiert (Ogawa et al. 2007).

SMN und Gemin2 knock-down zeigen einen gegensätzlichen Effekt auf das Neuritenwachstum, rufen jedoch in bezug auf die Bildung von Kernkörper (*nuclear bodies*) einen ähnlichen Phänotyp hervor. In HEK293T-Zellen verursachte die Reduktion des Gemin2-Proteinspiegels eine Veränderung in der Häufigkeitsverteilung SMN-positiver Kernkörper und eine Abnahme in der Anzahl.

In diesem Zelltyp co-lokalisieren 86 % der SMN-positiven Kernkörpern mit dem Markerprotein für Cajal-Körper Coilin und nur 14 % stellen SMN-positive, Coilin-negative Gems dar (Bruns et al. 2007). Die Destabilisierung des SMN/snRNP-Komplexes durch einen Gemin2 knock-down zeigt somit einen direkten Einfluss auf die Ausbildung von Gems und Cajal-Körper. Die Daten werden durch immunhistochemische Untersuchungen an Rückenmarksquerschnitten von FGF-2 transgenen Mäusen aus unserem Arbeitskreis gestützt, die eine Abnahme in der Häufigkeitsverteilung SMN-positiver Kernkörper in lumbalen Motoneuronen belegen (Bruns et al. 2007). In ihrer nukleären Funktion konvergieren Gemin2 und das SMN-Protein. Ein Rückgang der Anzahl SMN-positiver Kernkörper wurde bei primären Fibroblasten aus SMA-Patienten beschrieben (Coovert et al. 1997). Es kann dabei eine direkte Korrelation zwischen der Abnahme SMN-positiver Kernkörper und dem Schweregrad der Erkrankung (Coovert et al. 1997) sowie dem SMN-Proteinspiegel beobachtet werden (Lefebvre et al. 1997). In den SMA-Fibroblasten können im Gegensatz zu den Kontrollzellen keine SMN-positiven, Coilin-negativen Gems (*gemini of Cajal bodies*) detektiert werden, stattdessen co-lokalisiert das verbliebene SMN mit Coilin in Cajal-Körpern (Renvoise et al. 2006). Das SMN-Protein interagiert über die Tudor-Domäne mit Coilin (Hebert et al. 2001). Untersuchungen an HeLa-Zellen, in denen das SMN-Protein überwiegend mit Coilin in Cajal-Körpern überlagert (Carvalho et al. 1999), haben gezeigt, dass der SMN knock-down nicht nur zur Abnahme der Gem-Anzahl, sondern auch zur Desintegration von Cajal-Körpern führt (Girard et al. 2006). Demnach geht bei Reduktion des SMN-Proteinspiegels vermutlich zunächst die Anzahl der Gems und schließlich die der Cajal-Körper zurück. Da in primären Neuronen aus dem Ganglion trigeminale sowie Nucleus supraopticus des Hypothalamus der Ratte eine vollständige Co-Lokalisation von SMN und Coilin in Cajal-Körpern berichtet wird (Carvalho et al. 1999), wirkt sich in neuronalen Zellen die Reduktion des Gemin2- oder SMN-Proteinspiegels vermutlich direkt auf die Anzahl von Cajal-Körpern aus.

Einen Zuwachs an Gems relativ zu Cajal-Körpern kann dagegen bei der neuronalen Differenzierung eines PC12-Zellderivats UR61 (Navascues et al. 2004), wie auch unter proliferativen Bedingungen bei primären Schwann-Zellen aus der Ratte (Carvalho et al. 1999) beobachtet werden. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Abnahme des Coilin-Proteinspiegels während der neuronalen Differenzierung

von PC12-Zellen deutet demnach auf eine Veränderung in der Zusammensetzung oder Gesamtanzahl der Kernkörper hin.

Die Lokalisation des SMN-Proteins in der Zelle wird durch verschiedene Domänen beeinflusst. Die verwendete C-terminale Deletionsmutante SMN235-294-EGFP zeigte in neuronal differenzierten PC12-Zellen deutlich weniger SMN-positive Kernkörper als das vollständige SMN1-294- oder deletierte SMN1-239-EGFP-Fusionskonstrukt. Demgegenüber konnte bei SMN235-294-EGFP im Vergleich zu SMN1-239-EGFP eine verstärkte Lokalisation in den neuronalen Ausläufern beobachtet werden.

Die Überexpression von SMN1-278-EGFP (SMN $\Delta$ 7) und SMN1-208/240-277-EGFP (SMN $\Delta$ 5&7) führt in Vorderhirnneuronen aus dem Huhn zu einer ausschließlich nukleären Lokalisation. Die Aminosäure-Sequenz V D Q N Q K E, kodiert durch die ersten Nukleotide des Exons 7, dient als ein nukleäres Exportsignal (NES) (Zhang et al. 2003). In der COS-Primatenzelllinie wird für SMN1-254-EGFP eine sowohl nukleoplasmatische als auch zytoplasmatische Lokalisation beschrieben (Renvoise et al. 2006). Die in dieser Arbeit beobachtete sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Lokalisation von SMN1-239-EGFP sowie die hier nicht aufgeführte ausschließlich nukleäre Lokalisation von SMN1-90-EGFP, deuten auf ein alternatives NES im Bereich zwischen den Aminosäure-Resten 91-208 (Exon 3 + Exon 4) hin.

### 5.3 Das SMN-Protein interagiert mit dem Actin-Zytoskelett

Eine punktförmige Verteilung des SMN-Proteins in neuronalen Ausläufern und Wachstumskegeln von differenzierten PC12-Zellen konnte sowohl bei der Überexpression des humanen SMN1-294-EGFP-Fusionskonstrukts als auch bei der immunzytochemischen Markierung des endogenen SMN<sup>wt</sup>-Proteins beobachtet werden. Darüber hinaus co-lokalisierte das endogene SMN-Protein in den Wachstumskegeln mit monomerem G-Actin. Auch im Leitsaum (*leading edge*) von humanen Fibroblasten konnte eine direkte Überlagerung des SMN-Proteins mit Actin-Monomeren beobachtet werden. In beiden Strukturen wird die Mobilität durch ein dynamisches Actin-Zytoskelett vermittelt (Abraham et al. 1999; Bradke und Dotti 1999; Da Silva und Dotti 2002). In der Vergangenheit wurde die Co-Lokalisation des SMN-Proteins mit F-Actin in Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen von P19-Teratocarcinoma-Zellen beschrieben (Fan und Simard 2002). Die veröffentlichten Epifluoreszenz-Aufnahmen zeigen jedoch nur eine geringe Tiefenschärfe und eine mögliche Co-Lokalisation von SMN und G-Actin wurde nicht untersucht. Die kürzlich beobachtete Überlagerung von F-Actin und der axonalen SMN-Isoform in Filopodien von HeLa-Zellen (Setola et al. 2007) könnte eine Isoform-spezifische Funktion darstellen. Die reine Co-Lokalisation eines Proteins mit Bestandteilen des Zytoskeletts ist aufgrund deren ubiquitärer Verteilung in der Zelle ohnehin mit Vorsicht zu interpretieren. Die Interaktion des SMN-Proteins mit Actin wurde in dieser Arbeit daher über einen pull-down mit SMN1-294-GST und der Co-Immunpräzipitation beider Proteine aus dem Zellysate von HEK293T-Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass die Wechselwirkung nicht über den C-Terminus des SMN-Proteins (SMN235-294-3xFlag) vermittelt wird. Ob die Wechselwirkung zwischen dem SMN-Protein und Actin direkt oder indirekt erfolgt, lässt sich jedoch trotz des pull-down-Experiments nicht zweifelsfrei klären.

Da das kommerziell erworbene Actin nicht rekombinant hergestellt, sondern aus dem Kaninchenmuskel aufgereinigt wurde (Spudich und Watt 1971), sind Verunreinigungen mit anderen Actin-bindenden Proteinen wie  $\alpha$ -Actinin und Profilin möglich. Da das SMN-Protein mit  $\alpha$ -Actinin co-immunpräzipitiert (Rajendra et al. 2007) und über die AS-Reste 188-294 direkt mit Profilin1 und Profilin2 interagiert (Giesemann et al. 1999), ist eine indirekte Interaktion des SMN-Proteins mit Actin nicht auszuschließen.

Dennoch wird die Hypothese zur Bildung eines Actin/SMN-Komplexes durch verschiedene Arbeiten unterstützt. Es konnte an embryonalen Vorderhirn-Neuronen aus dem Huhn gezeigt werden, dass der Transport von SMN-EGFP-Granula in neuronalen Ausläufern von einem intakten Actin- und Tubulin-Zytoskelett abhängig ist (Zhang et al. 2003). Darüber hinaus wurde in derselben Arbeit an embryonalen Fibroblasten aus dem Huhn gezeigt, dass die Applikation von Cytochalasin D 70 % der SMN-EGFP-Granula freisetzt, während die Depolymerisation von Mikrotubuli mit Colchicin nur 26 % löst (Zhang et al. 2003). Bereits 1999 wurde nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen an zervikalen Rückenmarksquerschnitten aus der Ratte, eine Beteiligung des SMN-Proteins an Mikrotubuli-vermittelten Transportvorgängen in Dendriten von Motoneuronen vermutet (Bechade et al. 1999). Später konnte nach der Identifikation des neuen Interaktionspartners hnRNP-R (Rossoll et al. 2002) der SMN-Protein-vermittelte Transport von  $\beta$ -Actin-mRNA in Axonen von embryonalen Motoneuronen aus der Maus nachgewiesen werden (Rossoll et al. 2003). An embryonalen Fibroblasten aus dem Huhn wurde gezeigt, dass die gestörte Lokalisation der  $\beta$ -Actin-mRNA zum Leitsaum zu einer Abnahme in der zielgerichteten Bewegung führt, die Mobilität insgesamt jedoch nicht eingeschränkt ist (Shestakova et al. 2001). Aufgrund der Co-Lokalisation des SMN-Proteins mit poly(A)-mRNA und dem poly(A)-bindenden Protein (PABP) in embryonalen Vorderhirn-Neuronen aus dem Huhn, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das SMN-Protein auch an der Assemblierung von mRNA-Ribonukleoproteinen (mRNP) und deren axonalem Transport beteiligt ist (Zhang et al. 2007). Der Verlust des FMR-Proteins (FMRP: *fragile X mental retardation protein*), welches am dendritischen Transport unterschiedlicher mRNA-Moleküle beteiligt ist, führt zu Defekten bei der synaptischen Plastizität und verursacht bei Patienten mit dem sogenannten Fragilen-X-Syndrom kognitive Störungen (Irwin et al. 2001; Miyashiro et al. 2003). Aufgrund der Bedeutung der axonalen Translation für das zielgerichtete Auswachsen neuronaler Ausläufer (Wu et al. 2005; van Kesteren et al. 2006), wäre eine SMN-Protein-vermittelte Störung dieser Transportvorgänge eine mögliche Erklärung für das Absterben der Ausläufer und die Denervation der Muskelendplatte.

Berechnungen zur lokalen Translation von  $\beta$ -Actin-mRNA am Leitsaum (*leading edge*) von beweglichen Zellen deuten allerdings darauf hin, dass im Bereich der stimulierten Actin-Polymerisation die Gesamtmenge an mobilisierten Actin vermutlich nur zu 1 bis 7 % durch die Translation von  $\beta$ -Actin mRNA gespeist wird (Shestakova et al. 2001). Grundlage zu dieser Hypothese bilden Arbeiten zur Gesamtmenge an  $\beta$ -Actin-mRNA (2500 Moleküle pro Zelle) sowie der Translationsgeschwindigkeit einzelner  $\beta$ -Actin-mRNA-Moleküle (3900  $\beta$ -Actin-Proteine pro Sekunde, entsprechend  $2,34 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ ) (Kislauskis et al. 1997) und der Beobachtung, dass in der MTL3n-Mammakarzinomzelllinie eine Minute nach Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) die Anzahl an Actin-Monomeren um  $2,4 \times 10^7$  ansteigt (Chan et al. 1998). In einer anderen Arbeit wird ein Anstieg von  $6 \times 10^4$  bis  $6 \times 10^5$  Actin-Monomeren pro Sekunde ( $3,6 \times 10^6$  bis  $3,6 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$ ) am

Leitsaum approximiert (Kislauskis et al. 1997), so dass auf Grundlage dieser Daten eine induzierte Translation der  $\beta$ -Actin-mRNA nur zu ca. 1 bis 7 % zu der Gesamtmenge an polymerisierenden Actin beitragen würde .

Verschiedene Arbeiten deuten unabhängig von diesen Transportvorgängen auf eine direkte Wechselwirkung zwischen dem SMN-Protein und dem Actin-Zytoskelett hin (Giesemann et al. 1999; Sharma et al. 2005; Rajendra et al. 2007). Das SMN-Protein bindet über den C-Terminus an die beide Profilin-Isomere (Profilin1 und Profilin2), besitzt aber im Vergleich für Profilin2 eine höhere Affinität (Giesemann et al. 1999). Profilin2 ist zwischen den Spezies Mensch, Maus und Rind stark konserviert (ca. 95 % Sequenzidentität) und zeigt nur eine ca. 65 %ige Übereinstimmung zur Profilin1-Sequenz (Honore et al. 1993). Mit Hilfe eines Actin-Polymerisationsassays konnte gezeigt werden, dass Profilin1 und Profilin2 aufgrund einer Profilin/Actin-Dimerisierung und der damit verbundenen Reduktion an freien Actin-Monomeren die spontane Actin-Polymerisation *in vitro* hemmen (Lambrechts et al. 1995; Sharma et al. 2005). Erstaunlicherweise wurde durch Zugabe des SMN-Proteins, die Profilin2-vermittelte Inhibition der spontanen Actin-Polymerisation teilweise aufgehoben (Sharma et al. 2005). Vermutlich hemmt die Bindung des SMN-Proteins an Profilin2 dessen Interaktion mit Actin-Monomeren. In neuronalem Gewebe stellt die Spleißform Profilin2a gegenüber Profilin2b und Profilin1 die dominante Isoform dar (Honore et al. 1993; Lambrechts et al. 2000). Die Überexpression von Profilin2a induziert in embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte eine Hyperstabilisierung des filamentösen Actins und verursacht eine Reduktion des Längenwachstums neuronaler Ausläufer (Da Silva et al. 2003). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass der Profilin2 knock-down zu einem Anstieg an Actin-Monomeren und zu einem verstärkten Neuritenwachstum verglichen mit der Kontrolle führt (Da Silva et al. 2003).

Der Phänotyp einer Profilin2-Überexpression ähnelt der in dieser Arbeit beschriebenen Situation unter SMN knock-down Bedingungen: Während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen führte die Reduktion des SMN-Proteinspiegels zu einem vermindertem Wachstum neuronaler Fortsätze und zu einem Anstieg von F-Actin. Der Effekt beruhte dabei nicht auf einer Veränderung der Actin-Genexpression, sondern wurde durch eine Verschiebung des G- zu F-Actin-Verhältnisses verursacht. Die Bedeutung des G-/F-Actin-Gleichgewichts für die Ausbildung neuronaler Ausläufer konnte an embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte gezeigt werden (Bradke und Dotti 1999). Bei den kultivierten Nervenzellen bilden sich zunächst mehrere unpolarisierte Fortsätze. Der Ausläufer mit dem größten Wachstumskegel und dem dynamischsten Actin-Zytoskelett entwickelt sich schließlich zum Axon. Die Differenzierung der Fortsätze in Dendriten und Axone kann jedoch durch eine Cytochalsain D induzierte, unkontrollierte Depolymerisation von filamentösem Actin aufgehoben werden, so dass sich mehrere Tau-positive axonale Ausläufer bilden (Bradke und Dotti 1999). Die unter SMN knock-down beobachtete Stabilisierung von F-Actin in PC12-Zellen könnte die Dynamik des Wachstumskegels einschränken und einen Grund für die beobachtete Hemmung des Neuritenwachstums darstellen. Gegen eine mögliche Störung der axonalen  $\beta$ -Actin mRNA-Translation als Ursache für eine Hyperstabilisierung von F-Actin sprechen Ergebnisse aus embryonalen Hühner-Fibroblasten, die darauf hindeuten, dass die Delokalisation der  $\beta$ -Actin mRNA nicht die Polymerisation per se und die Bildung freier (+)-Enden an sich, sondern lediglich deren polare Lokalisation am

Leitsaum beeinflusst (Shestakova et al. 2001). Demnach würde sich möglicherweise die Verteilung des F-Actins, jedoch nicht der Anteil an G- und F-Actin in der Zelle verändern.

Bei den humanen SMA-Typ-1-Fibroblasten konnte beim Vergleich einzelner Kulturen mit den Kontrollzellen zum Teil ebenfalls eine leichte Stabilisierung des F-Actins beobachtet werden, die unabhängig von der Actin-Genexpression war. Unter Berücksichtigung der gesamten Proben unterschieden sich jedoch die SMA-Kulturen nicht signifikant von den Kontrollen. Ursachen hierfür sind vermutlich die Heterogenität der einzelnen Kulturen und damit verbundenen die kleine Fallzahl, da letztlich nur drei SMA-Patienten mit drei Kontrollen verglichen wurden. Darüber hinaus ist die infantile Spinale Muskelatrophie neurogenen Ursprungs und führt primär zur Degeneration von Motoneuronen. Axonale Defekte, die durch Reduktion des SMN-Proteinspiegels induziert werden, treten vielleicht in weniger polarisierten Zellen, wie z.B. Fibroblasten, nicht auf oder können aufgrund redundanter Funktionen anderer Proteinen eher kompensiert werden. In kultivierten Motoneuronen aus SMN<sup>-/-</sup>;SMN2-Mausembryonen konnte gezeigt werden, dass lediglich das Längenwachstum von Axonen, nicht jedoch von Dendriten gestört ist (Rossoll et al. 2003).

#### 5.4 Die RhoA-bindende Kinase-II (ROCK-II) und das SMN-Protein

Da in Mausgehirnen gezeigt werden konnte, dass Profilin2 in einem Komplex mit ROCK-II und Actin vorliegt (Witke et al. 1998) und die Kinase Profilin2 phosphoryliert (Da Silva et al. 2003), wurden in dieser Arbeit in PC12-Zellen unter SMN knock-down Bedingungen neben den genannten Proteinen auch die Lim-Kinase 1 (Ohashi et al. 2000) und deren Substrat Cofilin (Yang et al. 1998) als Bestandteile der RhoA-ROCK-Signalkaskade näher betrachtet (s. Einleitung, Abb. 3). Während der neuronalen Differenzierung der PC12-Zellen rief die Reduktion des SMN-Proteinspiegels einen leichten Rückgang in der Phosphorylierung der Lim-Kinase (LimK) hervor und induzierte damit eine deutliche Abnahme des Phospho-Cofilin-Proteinspiegels sowie einen Anstieg an aktivem Cofilin. Da die Proteinspiegel von ROCK-II, LimK und Cofilin konstant blieben, kann eine Veränderung der Genexpression unter SMN knock-down Bedingungen als Ursache für die Beobachtung ausgeschlossen werden.

Aktives Cofilin schneidet Actin-Filamente, beschleunigt die Depolymerisation am (-)-Ende und katalysiert einen schnellen Umsatz der Mikrofilamente. In einem Actin-Polymerisationsassay wurde nachgewiesen, dass photoinduzierbares *caged*-Cofilin, welches unter kovalenter Bindung an  $\alpha$ -Brom-2-nitrophenyllessigsäure inaktiv ist, durch UV-Licht aktiviert werden und *in vitro* die Polymerisation von Actin-Monomeren zu F-Actin deutlich beschleunigen kann (Ghosh et al. 2004). Eine aktuelle Arbeit zeigt, dass eine niedrige Cofilin-Konzentration *in vitro* die Depolymerisation von Actin-Filamenten induziert, während eine hohe Konzentration zur Heterodimerisierung mit G-Actin sowie zur Entstehung von Cofilin/Actin-Kondensationskeimen führt und so die Bildung von F-Actin fördert (Andrianantoandro und Pollard 2006). Darüber hinaus wurde *in vitro* ein Synergieeffekt von Arp2/3 und Cofilin auf die Bildung stark verzweigter Actin-Filamente beschrieben, da der stimulierende Effekt beider Proteine in Kombination größer als die Summe der Einzeleffekte war (Ichetovkin et al. 2002).

*In vivo* ruft der knock-down von Cofilin in der NIH-3T3-Fibroblasten- und B16F1-Melanomzelllinie einen verstärkte Bildung von F-Actin hervor und führt zu Defekten bei der Zellteilung (NIH-3T3) und Migration (B16F1) (Hotulainen et al. 2005). Umgekehrt konnte durch die direkte Injektion einer

konstitutiv aktiven S3A-Cofilin Mutante in MTLn3-Mammakarzinomzellen ein F-Actin Anstieg um 40 % induziert werden, während die inaktive Mutante S3E-Cofilin keinen Einfluss zeigt (Ghosh et al. 2004). Die Abwesenheit von Cofilin sowie ein ubiquitärer Überschuss an aktivem Cofilin führen demnach auch *in vivo* zu einer verstärkten Polymerisation von G-Actin oder zur Hyperstabilisierung von F-Actin. Eine partielle Aktivierung von *caged*-Cofilin induziert dagegen in MTLn3-Zellen eine lokale Membranausstülpung in diesem Bereich (Ghosh et al. 2004). Die gepulste Aktivierung über einen längeren Zeitraum steuert die Bewegung der Melanom-Zellen in Richtung der lokalen Cofilin-Aktivierung (Ghosh et al. 2004). Die Ergebnisse legen nahe, dass neben der Phosphorylierung von Cofilin auch dessen lokale Konzentration einen Einfluss auf das G-/F-Actin-Gleichgewicht und die Mobilität der Zelle hat.

Eine aktuelle Arbeit an der Zelllinie zeigt, dass die Überexpression einer enzymatisch inaktiven Lim-Kinase 1-Mutante (LimK1<sup>mt</sup>) im Vergleich zur LimK1<sup>wt</sup> und dem Kontrollvektor eine deutliche Abnahme des Phospho-Cofilin-Proteinspiegels induziert, die Anzahl an freien (+)-Enden am Leitsaum erhöht und die Beweglichkeit der Zellen insgesamt steigert (Wang et al. 2006). In Spinalganglienzellen aus dem Huhn wurde demonstriert, dass die Überexpression von LimK1<sup>wt</sup> im Vergleich zur enzymatisch inaktiven Mutante LimK1<sup>mt</sup> die Beweglichkeit der Wachstumskegels hemmt (Endo et al. 2003). Demnach scheint das aktive Cofilin die Dynamik des Actin-Zytoskeletts lokal zu erhöhen. Die Bildung von freien (+)-Enden führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer erneuten Actin-Polymerisation. Da die Überexpression von LimK1<sup>wt</sup> oder einer enzymatisch inaktiven Mutante LimK1<sup>kd</sup> in Neuronen aus der granulären Schicht des Kleinhirns der Maus keinen Einfluss auf die Länge neuronaler Ausläufer zeigt, scheinen, möglicherweise abhängig vom Zelltyp, weitere Faktoren das Neuritenwachstum zu beeinflussen (Bito et al. 2000). Ob der unter SMN knock-down Bedingungen beobachtete, ubiquitär in der Zelle reduzierte Phospho-Cofilin-Proteinspiegel die Ursache für das veränderte G-/F-Actin-Gleichgewicht und das verminderte Neuritenwachstum oder eine zelluläre Antwort auf den Defekt darstellt, ist nicht abzuschätzen (s. Abb. 20).

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Profilin1 und Cofilin an den beiden Enden von F-Actin komplementär arbeiten und so den *treadmilling*-Prozess erheblich beschleunigen (Didry et al. 1998). Neben einem veränderten Phosphorylierungsmuster der Lim-Kinasen und Cofilin, konnten unter SMN knock-down Bedingungen in dieser Arbeit auch für Profilin2 post-translationale Modifikationen mit unterschiedlicher Ladung beobachtet werden, die vermutlich durch eine Hyperphosphorylierung des Proteins verursacht wurden. Der isoelektrische Punkt des Proteins verschob sich dabei von pI 5,7 zu pI 4,1 bis 4,4, so dass vermutlich mehrere Serin- oder Threonin- möglicherweise auch Tyrosin-Reste phosphoryliert wurden. Dass in den Lysaten der Kontrollvektor-transfizierten PC12-Zellen drei Profilin2-Signale nachgewiesen werden konnte, anstatt von zweien wie in der Arbeit von 2003 aus der Gruppe um C.G. Dotti (Da Silva et al. 2003), lag vermutlich an einer höheren Auflösung bei der isoelektrischen Fokussierung (pH 4-7) und den Unterschieden beider Zelltypen (PC12 vs. primäre Neurone). Die biophysikalischen Eigenschaften des hyperphosphorylierten Profilin2 wurden nicht untersucht. Die Phosphorylierung von Profilin2 durch ROCK-II zeigt jedoch in den hippocampalen Zelllysaten aus der Ratte keinen direkten Einfluss auf die Profilin2/ROCK-II-Bindung (Da Silva et al. 2003). Da die Phosphorylierung ROCK-II-abhängig erfolgt und die Überexpression von ROCK-II in

embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte einen stabilisierenden Effekt auf filamentöses Actin und einen inhibierenden Einfluss auf die Ausbildung neuronaler Fortsätze ausübt (Da Silva et al. 2003), könnte hyperphosphoryliertes Profilin2 möglicherweise eher hemmend auf das Neuritenwachstum wirken. Aus der Milz aufgereinigtes Profilin, welches höchstwahrscheinlich Profilin1 darstellt (Lambrechts et al. 1995; Witke et al. 1998; Lambrechts et al. 2000), wird *in vitro* an einem konservierten Serin-Rest am C-Terminus des Profilin-Proteins durch die  $\zeta$ -Isoform der Proteinkinase-C (PKC- $\zeta$ ) phosphoryliert (Singh et al. 1996; Vemuri und Singh 2001) und zeigt eine erhöhte Affinität für Polyprolin-Bindungspartner. Darüber hinaus hemmt das phosphorylierte Protein verstärkt die spontane Actin-Polymerisation *in vitro*, da es verglichen zum nicht modifizierten Profilin vermehrt mit Actin dimerisiert (Sathish et al. 2004).

Die Beobachtung, dass die Überexpression von ROCK (s. oben), Profilin2a oder einer konstitutiv aktiven V14-RhoA-Mutante in embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte zu einer Verschiebung des G- zu F-Actin-Gleichgewichts und zu einer Stabilisierung von F-Actin sowie zu verkürztem Neuritenwachstum führt, deutet auf die Notwendigkeit eines dynamischen Actin-Zytoskeletts für das Auswachsen neuronaler Ausläufer hin (Da Silva et al. 2003). Möglicherweise stören starre Actin-Filamente die für das Auswachsen der Ausläufer notwendige Dynamik bei der Depolymerisation von F- und Repolymerisation von G-Actin. Da die Überexpression von ROCK unter Profilin2 knock-down Bedingungen in den Neuronen einen deutlich mildereren Phänotyp hervorruft (Da Silva et al. 2003), kommt der Profilin2-Konzentration möglicherweise bei der RhoA-ROCK vermittelten Signaltransduktion eine besondere Bedeutung zu.

In dieser Arbeit konnte nach einem SMN knock-down in den PC12-Zellen keine Veränderung des Profilin2-Proteinspiegels beobachtet werden, dennoch wäre eine Freisetzung von Profilin2 aus möglichen „inaktiven“ Profilin2/SMN-Komplexen denkbar (s. Abb. 20, A und C). Es wurde am Beispiel von VASP gezeigt, dass Profilin2 bei Überschuss eines Polyprolin-Interaktionspartners unter Bildung von Profilin-Dimeren an das Protein bindet (Lambrechts et al. 2000). Darüber hinaus wurde in einem *in vitro* Actin-Polymerisationsassay nachgewiesen, dass die SMN-Bindung an Profilin2 dessen Interaktion mit Actin möglicherweise hemmt (Sharma et al. 2005). Das SMN-Protein würde demnach ähnlich wie Phosphatidyl-4,5-bisphosphat die Menge an freiem Profilin2 begrenzen (Lassing und Lindberg 1985; Lambrechts et al. 1995). Folglich würden unter SMN knock-down Bedingungen für jedes fehlende SMN-Protein zwei-Profilin2-Moleküle frei, die daraufhin mit Actin-Monomeren in Wechselwirkung treten könnten. Ein Anstieg an freien ATP-G-Actin/Profilin2-Dimeren könnte potentiell, über die Interaktion von ATP-Actin/Profilin mit mDia1 (Watanabe et al. 1997; Krebs et al. 2001; Kovar et al. 2006) am (+)-Ende filamentösen Actins, die Addition von Actin-Monomeren und die Verlängerung bestehender Filamente verstärkt fördern (s. Abb. 20, C) und so das Neuritenwachstum hemmen. Zusätzlich könnte es zu einer gesteigerten ROCK-II/Profilin2-Komplexbildung (Witke et al. 1998) kommen, die eine Interaktion mit LimK in Form einer kompetitiven Inhibition erschweren würde. Möglicherweise existiert in gesunden Zelle ein ternärer Profilin2/ROCK-II/SMN-Komplexes, der unter SMN knock-down Bedingungen gestört wird. Das SMN-Protein interagiert mit Profilin2 (Sharma et al. 2005) und die Anwesenheit von ROCK-II/Profilin2-Komplexen wurde in neuronalem Gewebe aus der Maus nachgewiesen (Witke et al. 1998). Da es bei Reduktion des SMN-Proteinspiegels zu einer Hyperphosphorylierung von Profilin2 und Hypophosphorylierung von LimK kommt, könnte das SMN-

Protein als ein Modulator die ROCK-vermittelte Phosphorylierung der beiden Substrate in der Zelle beeinflussen. Der Verlust des SMN-Proteins würde so möglicherweise zu einer einseitigen Phosphorylierung von Profilin2 führen. Da die Aktivität der Lim-Kinase sowohl über RhoA-ROCK als auch über Cdc42/Rac1-PAK reguliert wird, wäre ein Rückkopplungsmechanismus über Cdc42/Rac1 als Antwort auf eine erhöhte F-Actin-Konzentration denkbar. RhoA und Cdc42/Rac1 wirken antagonistisch auf das Actin-Zytoskelett ein (s. Einleitung, Abb. 3) (Dan et al. 2002; Huber et al. 2003). Es gibt Hinweise auf eine mögliche Rückkopplungsschleife von Rac1/Cdc42 über das Actin-Zytoskelett zur Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zu sogenannten GEFs (*guanosine exchange factors*), die den Austausch von GDP zu GTP an den GTPasen katalysieren und so erneut Rac1 und Cdc42 aktivieren (Aoki et al. 2005). Unabhängig von den GTPasen konnte gezeigt werden, dass die Slingshot-Phosphatase hSSH-L F-Actin-abhängig LimK1/2 und Cofilin dephosphoryliert (Soosairajah et al. 2005). Demnach könnte der Anstieg filamentösen Actins unter SMN knock-down Bedingungen unabhängig von den Rho-GTPasen zu einer Inaktivierung von LimK und Aktivierung von Cofilin durch Rekrutierung von der Slingshot-Phosphatasen führen.

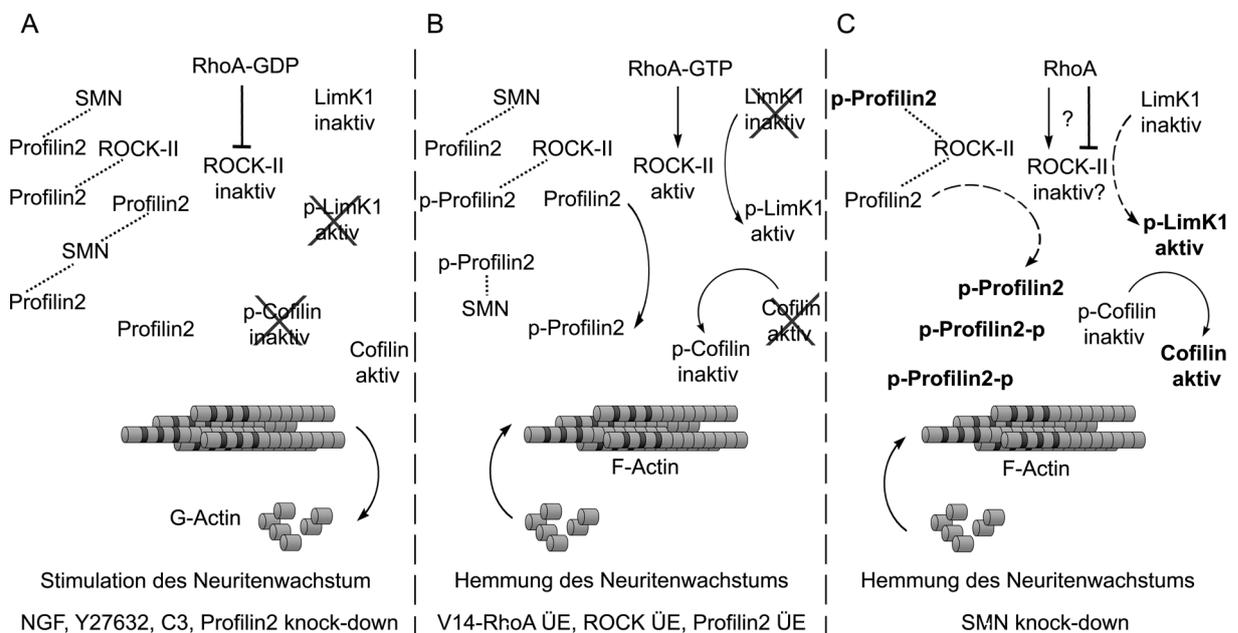


Abb. 20 Vereinfachte Darstellung zellulärer Prozesse während des Neuritenwachstums. (A) Die Inhibition der RhoA-GTPase durch das clostridiale Toxin C3 oder die spezifische Hemmung von ROCK durch Y27632 führen zu einer Abnahme in der Phosphorylierung von Cofilin sowie Profilin2 und induzieren über eine Verschiebung des G-/F-Actin-Gleichgewichts zu monomeren G-Actin das Wachstum neuronaler Fortsätze. (B) Die Aktivierung der RhoA-Signaltransduktion durch Überexpression einer dominant-aktiven RhoA-Mutante führt zur Phosphorylierung von Profilin2, der Lim-Kinase und Cofilin. Filamentöses Actin wird daraufhin stabilisiert und die Depolymerisation gehemmt. Die verminderte Dynamik im Actin-Auf- und Abbau führt zu einer Inhibition des Neuritenwachstums. (C) Wie in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, bedingt der SMN knock-down unabhängig von einer ROCK-Inhibition (indirekt über die NGF-vermittelte Inhibition von RhoA sowie direkt über Y27632) eine Hemmung des Längenwachstums neuronaler Fortsätze. Dabei kann eine Zunahme an F-Actin sowie eine Hyperphosphorylierung von Profilin2 beobachtet werden. Gleichzeitig nimmt die Phosphorylierung von LimK und Cofilin ab. Möglicherweise führt die Reduktion des SMN-Proteinspiegels zu einer verstärkten Freisetzung von Profilin2, so dass es ähnlich wie bei einer Profilin2-Überexpression, zu einer verstärkten Polymerisation von G- zu F-Actin kommt. Die Phosphorylierung von LimK und Cofilin induziert in kultivierten Zellen häufig eine Steigerung der Actin-Dynamik, so dass es sich eventuell um einen Rückkopplungsmechanismus über die p21-aktivierte Kinase (PAK) handelt.

LimK: Lim-Kinase, C3: *Clostridium botulinum* Toxin, NGF: Nervenwachstumsfaktor, V14-RhoA: dominant-aktive RhoA-GTPase, ÜE: Überexpression, ROCK: RhoA-bindende Kinase, p-Profilin2-p: hyperphosphoryliertes Profilin2

Eine deaktivierende Wirkung des SMN-Proteins aufgrund passiver Bindung und die dadurch verminderte Verfügbarkeit des Interaktionspartners, könnte auch bei der kürzlich in der embryonalen

S2-Zelllinie (Schneider-2, *Drosophila melanogaster*) und in *Drosophila*-Zelllysaten beobachteten Wechselwirkung zwischen dem SMN-Protein und  $\alpha$ -Actinin eine Rolle spielen (Rajendra et al. 2007).  $\alpha$ -Actinin bindet intramolekular an F-Actin und führt zu einer Quervernetzung sowie Bündelung von Actin-Filamenten (Blanchard et al. 1989). Darüber hinaus wird durch eine intermolekulare Wechselwirkung innerhalb eines Filamentes die Assoziation mit anderen Actin-bindenden Proteinen erschwert (Hampton et al. 2007).  $\alpha$ -Actinin-Isoformen wurden aus der glatten sowie quergestreiften Muskulatur und Hühner Gehirnen isoliert (Endo und Masaki 1982; Duhaiman und Bamberg 1984). Andere Arbeiten machen deutlich, dass die Nichtmuskel-Isoformen, die auch in Fibroblasten und Blutplättchen nachgewiesen wurden, Calcium-abhängig F-Actin binden, während die Muskel-Isoformen Calcium-unabhängig sind (Blanchard et al. 1989). Bei dem SMN knock-down in neuronal differenzierten PC12-Zellen könnte aufgrund eines reduzierten SMN-Proteinspiegels  $\alpha$ -Actinin vermehrt zur Verfügung stehen und eine verstärkte Quervernetzung filamentösen Actins induzieren. Die F-Actin Depolymerisation wäre unter diesen Bedingungen erschwert und das für das Neuritenwachstum wichtige, dynamische G-/F-Actin-Gleichgewicht gestört.

### 5.5 Das SMN-Protein befindet sich in der Signalkaskade unterhalb von RhoA-ROCK

Um den Einfluss des SMN-Proteins auf die RhoA-ROCK-Signalkaskade einzugrenzen, wurden PC12-Zellen unter SMN knock-down Bedingungen mit dem spezifischen ROCK-Inhibitor Y27632 behandelt. Das Dipeptid konkurriert mit ATP um die Bindung und zeigte im Vergleich zu ROCK-I ( $K_i=0,22 \mu\text{M}$ ) und ROCK-II ( $K_i=0,30 \mu\text{M}$ ) für andere Proteinkinasen einen deutlichen höheren Wert (*Citron kinase*,  $K_i=5,3 \mu\text{M}$ ; PKN,  $K_i=3,1 \mu\text{M}$ ; PKC- $\alpha$ ,  $K_i=73 \mu\text{M}$ ) für die inhibitorische Konstante  $K_i$  (Uehata et al. 1997; Ishizaki et al. 2000). In hippocampalen Neuronen aus Rattenembryonen induziert die Hemmung von ROCK (s. Abb. 20, A) eine Stimulation des Neuritenwachstums (Da Silva et al. 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von NGF der ROCK-Inhibitor nur einen schwachen Einfluss auf die Länge neuronaler Ausläufer in PC12-Zellen ausübte. Eine bereits zuvor unter SMN knock-down Bedingungen beobachtete Hemmung des Neuritenwachstums konnte auch durch Y27632 nicht kompensiert werden. Bei einem reduzierten SMN-Proteinspiegel hatte die Anwesenheit oder Abwesenheit des Inhibitors im Vergleich zu der Kontrolle keinen Effekt auf die Länge neuronaler Ausläufer.

PC12-Zellen zeigten in Abwesenheit von NGF keine neuronalen Ausläufer. Durch die Applikation des Inhibitors Y27632 konnte der Einfluss des ROCK-vermittelten Neuritenwachstums NGF-unabhängig untersucht werden. Die Kultivierung in Anwesenheit des ROCK-Hemmers führte im Vergleich zu den NGF-Kontrollen zu einer deutlichen Reduktion des Längenwachstums, da in Abwesenheit von NGF die Rac1- und Cdc42-vermittelten, wachstumsstimulierende Effekte nicht auftraten. Der ROCK-Inhibitor induzierte auch unter SMN knock-down Bedingungen die Ausbildung neuronaler Fortsätze. Der durch die Reduktion des SMN-Proteinspiegels bedingte hemmende Einfluss auf das Neuritenwachstum war vom Stimulus (Y27632 oder NGF) der Differenzierung unabhängig. Dies deutet auf eine SMN-Funktion unterhalb der RhoA-ROCK-Signalkaskade hin.

Der geringe Einfluss der ROCK-Inhibition auf das Neuritenwachstum während der NGF vermittelten Differenzierung in den Kontrollvektor-transfizierten Zellen wird vermutlich durch eine gleichzeitige, durch NGF vermittelte Hemmung der RhoA-Aktivierung verursacht. NGF-Bindung an den

Neurotrophinrezeptor p75 führt in embryonalen Ciliarganglienzellen aus dem Huhn zur Inaktivierung von RhoA und zu verstärktem Wachstum neuronaler Ausläufer (Yamashita et al. 1999). Arbeiten zur NGF-Signaltransduktion in PC12-Zellen zeigen, dass die TrkA-Rezeptortyrosinkinase-vermittelte Stimulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase und verschiedener GEFs (Sos, Vav2, Vav3) zur Aktivierung von Rac1 und Cdc42 und zur Deaktivierung von RhoA führen (Nusser et al. 2002). Dabei wurde eine temporäre Relokalisation der RhoA-GTPase von der Membran in das Zytoplasma beschrieben. Dass der SMN knock-down gleichwohl der Hemmung von RhoA durch NGF sowie von ROCK durch Y27632 eine Inhibition des Neuritenwachstum induziert, deutet darauf hin, dass das SMN-Protein möglicherweise unabhängig von der RhoA-GTPase oder unterhalb des RhoA-ROCK-Signalweges die Bildung neuronaler Ausläufer beeinflusst.

Es konnte in PC12-Zellen gezeigt werden, dass die ROCK-Inhibition durch Y27632 und einem alternativen ROCK-Inhibitor H-1152 zu einem Rückgang von Phospho-Cofilin (s. Abb. 20, A) und längeren Neuriten führt (Zhang et al. 2006b). Jene Arbeit bestätigt die Annahme, dass die Aktivierung des endogenen Cofilins die Dynamik des Actin-Zytoskeletts erhöht. In embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte bewirkt die Inhibition der RhoA-GTPase durch das clostridiale Toxin C3 sowie die Hemmung die Y27632-vermittelte Hemmung von ROCK eine Verschiebung des G-/F-Actin-Gleichgewichts zu monomerem G-Actin und die Stimulation des Wachstums neuronaler Fortsätze (Da Silva et al. 2003). Darüber hinaus wurde in den Zelllysaten von hippocampalen Neuronen, die in Anwesenheit von Y27632 kultiviert wurden, eine Abnahme in der Profilin2 Phosphorylierung nachgewiesen. In murinen Neuronen aus der granulären Schicht des Kleinhirns konnte nachgewiesen werden, dass die C3-vermittelte Inhibition von RhoA zu größeren Wachstumskegeln und zu einer Stimulation des Neuritenwachstums führt (Bito et al. 2000). Die Überexpression der dominant-aktiven V14-RhoA-GTPase sowie dominant-aktiven Delta3-RhoA-bindenden Kinase (Delta3-ROCK) führt umgekehrt zu kleineren Wachstumskegeln, zeigt aber nur einen geringen Einfluß auf die Länge der Ausläufer. Aufgrund alternativer Substrate der RhoA-bindenden Kinase, sind die durch ROCK-Inhibition evozierten Effekte jedoch nicht zwangsläufig auf Profilin2, Limk oder Cofilin zurückzuführen. Unabhängig von den Lim-Kinasen und Profilin, aktiviert ROCK auch Myosin II über Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC: *myosin light chain*) (Amano et al. 1996) und der Myosin Phosphatase (MCP), die dadurch inaktiviert wird (s. Abb. 3, Einleitung) (Matsumura 2005). Es wurde in der N1E115-Neuroblastoma-Zelllinie demonstriert, dass die Überexpression dominant-aktiver MLC sowie die Aktivierung von Myosin II durch RhoA und ROCK zu einer Inhibition des Neuritenwachstums führt (Amano et al. 1998). Umgekehrt hemmt die Inaktivierung von Myosin II durch Blebbistatin in *Aplysia Bag-cell*-Neuronen den retrograden Fluß von F-Actin aus dem Leitsaum (periphere Zone) in die Übergangzone des Wachstumskegels (Medeiros et al. 2006). Der dadurch gesteigerte Actin-Umsatz am äußersten Rand des Wachstumskegels erhöht deutlich die Mobilität des Leitsaums. Da die Inhibition von ROCK zu einer verminderten Aktivität von Myosin-II und zu einem möglicherweise gesteigerten Neuritenwachstum führen sollte, der inhibitorische Effekt des SMN knock-downs auf das Neuritenwachstum jedoch von einer ROCK-Inhibition unabhängig war, scheint das SMN-Protein wenn überhaupt unterhalb einer RhoA-ROCK-MLC-Myosin-II Signalkaskade zu liegen.

Obwohl in unterschiedlichen Neuronenkulturen die Inhibition von RhoA oder ROCK positive Effekte auf das Neuritenwachstum zeigt, wurde in transgenen Cre-LoxP-Mäusen, die die dominant-negative RhoA-GTPase (RhoA DN) oder die dominant-negative RhoA-bindende Kinase (Rho-K DN) ausschließlich in Neuronen exprimieren, die spezifische Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark von E10.5 Embryonen nachgewiesen (Kobayashi et al. 2004). Dabei nimmt die Anzahl an Islet1-positiven Motoneuronen bei RhoA DN um 42-56 %, bei Rho-K DN um ca. 41 % ab. Die Degeneration der Neurone liegt zeitlich deutlich vor dem natürlichen programmierten Zelltod während der Entwicklung der Motoneurone und zeigt keinen Einfluss auf die Entwicklung der Schwann-Zellen oder Muskeln (Kobayashi et al. 2004). Übereinstimmend mit den Daten zur Expression von dominant-negativem RhoA bzw. ROCK in murinen Neuronen, kann auch in SMA-Patienten die spezifische Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und Hirnstamm beobachtet werden (Crawford und Pardo 1996). In SMA-Typ 1 und insbesondere in SMA-Typ 0 Patienten können bereits pränatal Defekte bei der fötalen Bewegung nachgewiesen werden (Dubowitz 1999). Die Betroffenen zeigen nach der Geburt eine ausgeprägte axonale Degeneration und Denervation der Muskeln sowie eine extreme Muskelschwäche (MacLeod et al. 1999). Möglicherweise ist auch bei der infantilen Spinalen Muskelatrophie die Aktivität der RhoA-bindenden Kinase während der Embryonalentwicklung gestört. ROCK phosphoryliert und deaktiviert die Lim Kinase (Maekawa et al. 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter SMN knock-down Bedingungen die Phosphorylierung des Enzyms leicht und die des Substrates Cofilin stark zurück geht. Der Verlust der Lim-Kinase 1 ist mit dem Williams-Beuren-Syndrom assoziiert und führt beim Menschen zu einer mentalen Retardierung (IQ: 55-60) sowie zu Problemen bei der räumlichen Wahrnehmung (Frangiskakis et al. 1996). Im *Drosophila*-Modell führt die fast vollständige, homozygote Deletion des LimK-Gens (LimK<sup>5</sup>-Mutante) zu Defekten an der neuromuskulären Endplatte und zu einem Anstieg in der Anzahl präsynaptischer Boutons (Ang et al. 2006). Da die Überexpression der konstitutiv aktiven Lim-Kinase unter einem Motoneuronenspezifischen Promoter (LimK<sup>kd</sup>) zu einer Abnahme an Boutons und zu einer verkleinerten Synapse führte, scheint sich die Größe der Synapse umgekehrt proportional zur Aktivität der Lim-Kinase zu verhalten. In einem *Drosophila*-SMA-Modell konnten an der neuromuskulären Endplatte im Vergleich zu Kontrolltieren ebenfalls ein deutlicher Anstieg in der Anzahl an Boutons nachgewiesen werden (Chan et al. 2003). Darüber hinaus wurde eine Abnahme von Glutamatrezeptor-Clustern (GluR IIA) an der postsynaptischen Membran der Muskelendplatte beschrieben. Die verringerte Rezeptordichte bedingt nach Reizung eine verminderten Amplitude des erregenden postsynaptischen Stromflusses (EPSC) und stört demnach die Reizweiterleitung (Chan et al. 2003). Somit führt der Verlust von LimK1 und SMN zu ähnlichen Defekten an der neuromuskulären Endplatte. Da sowohl die verminderte Aktivierung von ROCK (RhoA DN) als auch die enzymatisch inaktive Mutante von ROCK (Rho-K DN) während der Embryonalentwicklung zur Degeneration von Motoneuronen führt und der Verlust der Lim-Kinase bzw. die fehlende Aktivität des Enzyms eine gestörten Entwicklung der Muskelendplatte verursacht, erscheint eine Assoziation des SMN-Proteins mit Funktionen der RhoA-bindenden Kinase wahrscheinlich. Untersuchungen an einem Cre-loxP Mausmodell, bei dem es zur Expression einer häufig in SMA-Patienten beobachteten C-terminalen SMN-Deletionsmutante (SMN $\Delta$ 7) in neuronalem Gewebe kommt (Frugier et al. 2000), weisen in eine ähnliche Richtung. Die SMN $\Delta$ 7-Expression verursacht massive Defekte an der neuromuskulären Endplatte. Darüber hinaus nimmt die Anzahl der

Motoneuronen-Zellkörper um 30 % und die der Axone um 78 % ab (Cifuentes-Diaz et al. 2002). Autopsiebefunde von SMA-Patienten deuten auf eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Fähigkeit der verbliebenen Motoneurone, durch axonales Sprossen auf die Denervation benachbarter Muskelfasern zu antworten, hin (Crawford und Pardo 1996). Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an den verschiedenen Tiermodellen sowie die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen weisen auf eine neue, axonale Funktion des SMN-Proteins hin, die von der Assemblierung spleißosomaler snRNP/SMN-Komplexe unabhängig ist. Die Daten legen nahe, dass das SMN-Protein über Profilin2, die Lim-Kinasen und Cofilin einen Einfluß auf die Dynamik des Actin-Zytoskelett ausübt und dadurch das Wachstum neuronaler Ausläufer hemmt.

## 6 Literatur

- Abo, A., J. Qu, M. S. Cammarano, C. Dan, A. Fritsch, et al. (1998). "PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia." **Embo J** 17(22): 6527-40.
- Abraham, V. C., V. Krishnamurthi, D. L. Taylor and F. Lanni (1999). "The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells." **Biophys J** 77(3): 1721-32.
- Achsel, T., H. Brahms, B. Kastner, A. Bachi, M. Wilm, et al. (1999). "A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro." **Embo J** 18(20): 5789-802.
- Amano, M., K. Chihara, N. Nakamura, Y. Fukata, T. Yano, et al. (1998). "Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase." **Genes Cells** 3(3): 177-88.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." **J Biol Chem** 271(34): 20246-9.
- Anchordoguy, T. J., C. A. Cecchini, J. H. Crowe and L. M. Crowe (1991). "Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers." **Cryobiology** 28(5): 467-73.
- Anderson, K., A. Potter, D. Baban and K. E. Davies (2003). "Protein expression changes in spinal muscular atrophy revealed with a novel antibody array technology." **Brain** 126(Pt 9): 2052-64.
- Andrade, L. E., E. K. Chan, I. Raska, C. L. Peebles, G. Roos, et al. (1991). "Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin." **J Exp Med** 173(6): 1407-19.
- Andrianantoandro, E. and T. D. Pollard (2006). "Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin." **Mol Cell** 24(1): 13-23.
- Ang, L. H., W. Chen, Y. Yao, R. Ozawa, E. Tao, et al. (2006). "Lim kinase regulates the development of olfactory and neuromuscular synapses." **Dev Biol** 293(1): 178-90.
- Aoki, K., T. Nakamura, K. Fujikawa and M. Matsuda (2005). "Local phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation recruits Vav2 and Vav3 to activate Rac1/Cdc42 and initiate neurite outgrowth in nerve growth factor-stimulated PC12 cells." **Mol Biol Cell** 16(5): 2207-17.
- Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2002). "Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex." **J Biol Chem** 277(35): 31957-62.
- Bannai, H., K. Fukatsu, A. Mizutani, T. Natsume, S. Iemura, et al. (2004). "An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites." **J Biol Chem** 279(51): 53427-34.
- Battaglia, G., A. Princivalle, F. Forti, C. Lizier and M. Zeviani (1997). "Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system." **Hum Mol Genet** 6(11): 1961-71.
- Batten, F. E. and G. Holmes (1912). "Progressive spinal muscular atrophy of infants (Werdnig-Hoffmann Type)." **Brain** 35: 38-49.

- Battle, D. J., C. K. Lau, L. Wan, H. Deng, F. Lotti, et al. (2006). "The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs." **Mol Cell** 23(2): 273-9.
- Bechade, C., P. Rostaing, C. Cisterni, R. Kalisch, V. La Bella, et al. (1999). "Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport." **Eur J Neurosci** 11(1): 293-304.
- Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." **Methods Enzymol** 100: 243-55.
- Bito, H., T. Furuyashiki, H. Ishihara, Y. Shibasaki, K. Ohashi, et al. (2000). "A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons." **Neuron** 26(2): 431-41.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, et al. (1982). "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications." **J Biochem Biophys Methods** 6(4): 317-39.
- Bjellqvist, B., G. J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, et al. (1993). "The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences." **Electrophoresis** 14(10): 1023-31.
- Blanchard, A., V. Ohanian and D. Critchley (1989). "The structure and function of alpha-actinin." **J Muscle Res Cell Motil** 10(4): 280-9.
- Blanchoin, L. and T. D. Pollard (1998). "Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin." **J Biol Chem** 273(39): 25106-11.
- Blom, N., S. Gammeltoft and S. Brunak (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." **J Mol Biol** 294(5): 1351-62.
- Bradke, F. and C. G. Dotti (1999). "The role of local actin instability in axon formation." **Science** 283(5409): 1931-4.
- Brahms, H., L. Meheus, V. de Brabandere, U. Fischer and 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(11): 1531-42.
- Brichta, L., Y. Hofmann, E. Hahnen, F. A. Siebzehnrubl, H. Raschke, et al. (2003). "Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy." **Hum Mol Genet** 12(19): 2481-9.
- Briese, M., D. U. Richter, D. B. Sattelle and N. Ulfing (2006). "SMN, the product of the spinal muscular atrophy-determining gene, is expressed widely but selectively in the developing human forebrain." **J Comp Neurol** 497(5): 808-16.
- Bruns, A. F., J. van Bergeijk, J. Jungnickel, C. Grothe and P. Claus (2007). "The Nuclear Growth Factor FGF-2 directly Influences the Number of SMN-positive Nuclear Bodies." in **preparation**.
- Buchthal, F. and P. Z. Olsen (1970). "Electromyography and muscle biopsy in infantile spinal muscular atrophy." **Brain** 93(1): 15-30.
- Buhler, D., V. Raker, R. Luhrmann and 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(13): 2351-7.

- Burghes, A. H. (1997). "When is a deletion not a deletion? When it is converted." **Am J Hum Genet** 61(1): 9-15.
- Burglen, L., S. Lefebvre, O. Clermont, P. Bulet, L. Viollet, et al. (1996). "Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene." **Genomics** 32(3): 479-82.
- Campbell, L., A. Potter, J. Ignatius, V. Dubowitz and K. Davies (1997). "Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype." **Am J Hum Genet** 61(1): 40-50.
- Carey, D. J., M. S. Todd and C. M. Rafferty (1986). "Schwann cell myelination: induction by exogenous basement membrane-like extracellular matrix." **J Cell Biol** 102(6): 2254-63.
- Carissimi, C., J. Baccon, M. Straccia, P. Chiarella, A. Maiolica, et al. (2005). "Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly." **FEBS Lett** 579(11): 2348-54.
- Carissimi, C., L. Saieva, J. Baccon, P. Chiarella, A. Maiolica, et al. (2006). "Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly." **J Biol Chem** 281(12): 8126-34.
- Carlier, M. F. (1991). "Actin: protein structure and filament dynamics." **J Biol Chem** 266(1): 1-4.
- Carlier, M. F. (1992). "Nucleotide hydrolysis regulates the dynamics of actin filaments and microtubules." **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 336(1276): 93-7.
- Carnegie, G. K., J. E. Sleeman, N. Morrice, C. J. Hastie, M. W. Pegg, et al. (2003). "Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs." **J Cell Sci** 116(Pt 10): 1905-13.
- Carrel, T. L., M. L. McWhorter, E. Workman, H. Zhang, E. C. Wolstencroft, et al. (2006). "Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis." **J Neurosci** 26(43): 11014-22.
- Carvalho, T., F. Almeida, A. Calapez, M. Lafarga, M. T. Berciano, et al. (1999). "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body." **J Cell Biol** 147(4): 715-28.
- Cashman, N. R., H. D. Durham, J. K. Blusztajn, K. Oda, T. Tabira, et al. (1992). "Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons." **Dev Dyn** 194(3): 209-21.
- Caudy, A. A., M. Myers, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2002). "Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery." **Genes Dev** 16(19): 2491-6.
- Cavins, J. A., I. Djerassi, A. J. Roy and E. Klein (1965). "Preservation of viable human granulocytes at low temperatures in dimethyl sulfoxide." **Cryobiology** 2(3): 129-33.
- Chan, A. Y., M. Bailly, N. Zebda, J. E. Segall and J. S. Condeelis (2000). "Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion." **J Cell Biol** 148(3): 531-42.
- Chan, A. Y., S. Raft, M. Bailly, J. B. Wyckoff, J. E. Segall, et al. (1998). "EGF stimulates an increase in actin nucleation and filament number at the leading edge of the lamellipod in mammary adenocarcinoma cells." **J Cell Sci** 111 ( Pt 2): 199-211.

- Chan, Y. B., I. Miguel-Aliaga, C. Franks, N. Thomas, B. Trulzsch, et al. (2003). "Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant." **Hum Mol Genet** 12(12): 1367-76.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, A. Shevchenko, M. Mann, et al. (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(6): 1181-94.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, J. Yong, A. Shevchenko, et al. (2000). "Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli." **J Cell Biol** 148(6): 1177-86.
- Chen, C. A. and H. Okayama (1988). "Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA." **Biotechniques** 6(7): 632-8.
- Cifuentes-Diaz, C., T. Frugier, F. D. Tiziano, E. Lacene, N. Roblot, et al. (2001). "Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy." **J Cell Biol** 152(5): 1107-14.
- Cifuentes-Diaz, C., S. Nicole, M. E. Velasco, C. Borra-Cebrian, C. Panozzo, et al. (2002). "Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model." **Hum Mol Genet** 11(12): 1439-47.
- Cioce, M. and A. I. Lamond (2005). "Cajal bodies: a long history of discovery." **Annu Rev Cell Dev Biol** 21: 105-31.
- Claus, P., A. F. Bruns and 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(Pt 3): 559-65.
- Claus, P., F. Doring, S. Gringel, F. Muller-Ostermeyer, J. Fuhlrott, et al. (2003). "Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein." **J Biol Chem** 278(1): 479-85.
- Cooper, J. A. (1987). "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin." **J Cell Biol** 105(4): 1473-8.
- Coover, D. D., T. T. Le, P. E. McAndrew, J. Strasswimmer, T. O. Crawford, et al. (1997). "The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy." **Hum Mol Genet** 6(8): 1205-14.
- Cramer, L. P. (2002). "Ena/Vasp: solving a cell motility paradox." **Curr Biol** 12(12): R417-9.
- Crawford, T. O. and C. A. Pardo (1996). "The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy." **Neurobiol Dis** 3(2): 97-110.
- Cusin, V., O. Clermont, B. Gerard, D. Chanterreau and J. Elion (2003). "Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling." **J Med Genet** 40(4): e39.
- Da Silva, J. S. and C. G. Dotti (2002). "Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis." **Nat Rev Neurosci** 3(9): 694-704.
- Da Silva, J. S., M. Medina, C. Zuliani, A. Di Nardo, W. Witke, et al. (2003). "RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability." **J Cell Biol** 162(7): 1267-79.

- Dan, C., A. Kelly, O. Bernard and A. Minden (2001). "Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin." **J Biol Chem** 276(34): 32115-21.
- Dan, C., N. Nath, M. Liberto and A. Minden (2002). "PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells." **Mol Cell Biol** 22(2): 567-77.
- Dancker, P., I. Low, W. Hasselbach and T. Wieland (1975). "Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin." **Biochim Biophys Acta** 400(2): 407-14.
- Daniels, R. H., P. S. Hall and G. M. Bokoch (1998). "Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells." **Embo J** 17(3): 754-64.
- Dent, E. W. and F. B. Gertler (2003). "Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance." **Neuron** 40(2): 209-27.
- DiDonato, C. J., X. N. Chen, D. Noya, J. R. Korenberg, J. H. Nadeau, et al. (1997). "Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene." **Genome Res** 7(4): 339-52.
- Didry, D., M. F. Carlier and D. Pantaloni (1998). "Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover." **J Biol Chem** 273(40): 25602-11.
- Dittmar, K. D., K. A. Hutchison, J. K. Owens-Grillo and W. B. Pratt (1996). "Reconstitution of the steroid receptor.hsp90 heterocomplex assembly system of rabbit reticulocyte lysate." **J Biol Chem** 271(22): 12833-9.
- Dubowitz, V. (1999). "Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype." **Eur J Paediatr Neurol** 3(2): 49-51.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." **Mol Cell Biol** 7(1): 379-87.
- Duhaiman, A. S. and J. R. Bamberg (1984). "Isolation of brain alpha-actinin. Its characterization and a comparison of its properties with those of muscle alpha-actinins." **Biochemistry** 23(8): 1600-8.
- Dundr, M., M. D. Hebert, T. S. Karpova, D. Stanek, H. Xu, et al. (2004). "In vivo kinetics of Cajal body components." **J Cell Biol** 164(6): 831-42.
- Dundr, M. and T. Misteli (2001). "Functional architecture in the cell nucleus." **Biochem J** 356(Pt 2): 297-310.
- Edwards, D. C., L. C. Sanders, G. M. Bokoch and G. N. Gill (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." **Nat Cell Biol** 1(5): 253-9.
- Ehrhardt, C., M. Schmolke, A. Matzke, A. Knoblauch, C. Will, et al. (2006). "Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent." **Signal Transduction** 6(3): 179-184.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." **Nature** 411(6836): 494-8.
- Endo, M., K. Ohashi, Y. Sasaki, Y. Goshima, R. Niwa, et al. (2003). "Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin." **J Neurosci** 23(7): 2527-37.

- Endo, T. and T. Masaki (1982). "Molecular properties and functions in vitro of chicken smooth-muscle alpha-actinin in comparison with those of striated-muscle alpha-actinins." **J Biochem (Tokyo)** 92(5): 1457-68.
- Espert, L., P. Eldin, C. Gongora, B. Bayard, F. Harper, et al. (2006). "The exonuclease ISG20 mainly localizes in the nucleolus and the Cajal (Coiled) bodies and is associated with nuclear SMN protein-containing complexes." **J Cell Biochem** 98(5): 1320-33.
- Estes, J. E., L. A. Selden and L. C. Gershman (1981). "Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin." **Biochemistry** 20(4): 708-12.
- Fan, L. and 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(14): 1605-14.
- Fanarraga, M. L., J. Avila and J. C. Zabala (1999). "Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation." **Eur J Neurosci** 11(2): 516-527.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." **Proc Natl Acad Sci U S A** 84(21): 7413-7.
- Feng, W., A. K. Gubitza, L. Wan, D. J. Battle, J. Dostie, et al. (2005). "Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex." **Hum Mol Genet** 14(12): 1605-11.
- Ferretti, L. and V. Sgaramella (1981). "Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases." **Nucleic Acids Res** 9(1): 85-93.
- Fierro-Monti, I., S. Mohammed, R. Matthiesen, R. Santoro, J. S. Burns, et al. (2006). "Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E." **J Proteome Res** 5(6): 1367-78.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." **Nature** 391(6669): 806-11.
- Fischer, U., Q. Liu and G. Dreyfuss (1997). "The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis." **Cell** 90(6): 1023-9.
- Flanagan, M. D. and S. Lin (1980). "Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin." **J Biol Chem** 255(3): 835-8.
- Frangiskakis, J. M., A. K. Ewart, C. A. Morris, C. B. Mervis, J. Bertrand, et al. (1996). "LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition." **Cell** 86(1): 59-69.
- Friesen, W. J. and 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(34): 26370-5.
- Friesen, W. J., S. Massenet, S. Paushkin, A. Wyce and G. Dreyfuss (2001a). "SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets." **Mol Cell** 7(5): 1111-7.

- Friesen, W. J., S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G. S. Pesiridis, et al. (2001b). "The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins." **Mol Cell Biol** 21(24): 8289-300.
- Friesen, W. J., A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, et al. (2002). "A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins." **J Biol Chem** 277(10): 8243-7.
- Frugier, T., F. D. Tiziano, C. Cifuentes-Diaz, P. Miniou, N. Roblot, et al. (2000). "Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy." **Hum Mol Genet** 9(5): 849-58.
- Gabanella, F., C. Carissimi, A. Usiello and L. Pellizzoni (2005). "The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation." **Hum Mol Genet** 14(23): 3629-42.
- Gall, J. G. (2000). "Cajal bodies: the first 100 years." **Annu Rev Cell Dev Biol** 16: 273-300.
- Gangwani, L., R. A. Flavell and R. J. Davis (2005). "ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (SMN) protein to Cajal bodies." **Mol Cell Biol** 25(7): 2744-56.
- Gangwani, L., M. Mikrut, S. Theroux, M. Sharma and R. J. Davis (2001). "Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein." **Nat Cell Biol** 3(4): 376-83.
- Ghosh, M., X. Song, G. Mouneimne, M. Sidani, D. S. Lawrence, et al. (2004). "Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility." **Science** 304(5671): 743-6.
- Gieselmann, R., D. J. Kwiatkowski, P. A. Janmey and W. Witke (1995). "Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms." **Eur J Biochem** 229(3): 621-8.
- Gieseemann, T., S. Rathke-Hartlieb, M. Rothkegel, J. W. Bartsch, S. Buchmeier, et al. (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(53): 37908-14.
- Girard, C., H. Neel, E. Bertrand and R. Bordonne (2006). "Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation." **Nucleic Acids Res** 34(10): 2925-32.
- Gohla, A., J. Birkenfeld and G. M. Bokoch (2005). "Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics." **Nat Cell Biol** 7(1): 21-9.
- Golembe, T. J., J. Yong and G. Dreyfuss (2005). "Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs." **Mol Cell Biol** 25(24): 10989-1004.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." **J Gen Virol** 36(1): 59-74.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." **Proc Natl Acad Sci U S A** 73(7): 2424-8.
- Gresch, O., F. B. Engel, D. Nestic, T. T. Tran, H. M. England, et al. (2004). "New non-viral method for gene transfer into primary cells." **Methods** 33(2): 151-63.
- Gringel, S., J. van Bergeijk, K. Haastert, C. Grothe and P. Claus (2004). "Nuclear fibroblast growth factor-2 interacts specifically with splicing factor SF3a66." **Biol Chem** 385(12): 1203-8.

- Grothe, C. and K. Unsicker (1992). "Basic fibroblast growth factor in the hypoglossal system: specific retrograde transport, trophic, and lesion-related responses." **J Neurosci Res** 32(3): 317-28.
- Grundhoff, A. T., E. Kremmer, O. Tureci, A. Glieden, C. Gindorf, et al. (1999). "Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C." **J Biol Chem** 274(27): 19136-44.
- Gubitz, A. K., Z. Mourelatos, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, et al. (2002). "Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins." **J Biol Chem** 277(7): 5631-6.
- Hahnen, E., J. Schonling, S. Rudnik-Schoneborn, H. Raschke, K. Zerres, et al. (1997). "Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA)." **Hum Mol Genet** 6(5): 821-5.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." **Science** 279(5350): 509-14.
- Hampton, C. M., D. W. Taylor and K. A. Taylor (2007). "Novel structures for alpha-actinin:F-actin interactions and their implications for actin-membrane attachment and tension sensing in the cytoskeleton." **J Mol Biol** 368(1): 92-104.
- Harada, Y., R. Sutomo, A. H. Sadewa, T. Akutsu, Y. Takeshima, et al. (2002). "Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity." **J Neurol** 249(9): 1211-9.
- Hebert, M. D., P. W. Szymczyk, K. B. Shpargel and A. G. Matera (2001). "Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein." **Genes Dev** 15(20): 2720-9.
- Helmken, C., Y. Hofmann, F. Schoenen, G. Oprea, H. Raschke, et al. (2003). "Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1." **Hum Genet** 114(1): 11-21.
- Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." **Science** 279(5350): 519-26.
- Hirtz, D., S. Iannaccone, J. Heemskerk, K. Gwinn-Hardy, R. Moxley, 3rd, et al. (2005). "Challenges and opportunities in clinical trials for spinal muscular atrophy." **Neurology** 65(9): 1352-7.
- Hoffmann, J. (1893). "Uber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiarer Basis." **Dt. Z. NervHeilk.** 3: 427-470.
- Hoffmann, J. (1897). "Weiterer Beitrag zur Lehre von der hereditaren progressiven spinalen Muskelatrophie im Kindesalter." **Dt. Z. NervHeilk.** 10: 292-320.
- Hoffmann, J. (1900a). "Dritter Beitrag zur Lehre von der hereditaren progressiven spinalen Muskelatrophie im Kindesalter." **Dt. Z. NervHeilk.** 18(217-224).
- Hoffmann, J. (1900b). "Ober die hereditare progressive spinale Muskelatrophie im Kindesalter." **Munch, med. Wschr** 47: 1649-1651.
- Honore, B., P. Madsen, A. H. Andersen and H. Leffers (1993). "Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II." **FEBS Lett** 330(2): 151-5.
- Hotulainen, P. and P. Lappalainen (2006). "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." **J Cell Biol** 173(3): 383-94.

- Hotulainen, P., E. Paunola, M. K. Vartiainen and P. Lappalainen (2005). "Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells." **Mol Biol Cell** 16(2): 649-64.
- Hsieh-Li, H. M., J. G. Chang, Y. J. Jong, M. H. Wu, N. M. Wang, et al. (2000). "A mouse model for spinal muscular atrophy." **Nat Genet** 24(1): 66-70.
- Hua, Y. and J. Zhou (2004). "Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules." **FEBS Lett** 572(1-3): 69-74.
- Huber, A. B., A. L. Kolodkin, D. D. Ginty and J. F. Cloutier (2003). "Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance." **Annu Rev Neurosci** 26: 509-63.
- Huber, K., C. Meisinger and C. Grothe (1997). "Expression of fibroblast growth factor-2 in hypoglossal motoneurons is stimulated by peripheral nerve injury." **J Comp Neurol** 382(2): 189-98.
- Huntriss, J. D., B. M. Twomey, D. A. Isenberg and D. S. Latchman (1994). "Enhanced transcription of the gene encoding the SmN autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus does not result in enhanced levels of the SmN protein." **Autoimmunity** 19(2): 81-7.
- Ichetovkin, I., W. Grant and J. Condeelis (2002). "Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex." **Curr Biol** 12(1): 79-84.
- Irwin, S. A., B. Patel, M. Idupulapati, J. B. Harris, R. A. Crisostomo, et al. (2001). "Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination." **Am J Med Genet** 98(2): 161-7.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, et al. (1996). "The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase." **Embo J** 15(8): 1885-93.
- Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, et al. (2000). "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases." **Mol Pharmacol** 57(5): 976-83.
- Iwahashi, H., Y. Eguchi, N. Yasuhara, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, et al. (1997). "Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy." **Nature** 390(6658): 413-7.
- Jablonka, S., K. Karle, B. Sandner, C. Andreassi, K. von Au, et al. (2006). "Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy." **Hum Mol Genet** 15(3): 511-8.
- Jablonka, S., W. Rossoll, B. Schrank and M. Sendtner (2000a). "The role of SMN in spinal muscular atrophy." **J Neurol** 247 Suppl 1: I37-42.
- Jablonka, S., B. Schrank, M. Kralewski, W. Rossoll and M. Sendtner (2000b). "Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III." **Hum Mol Genet** 9(3): 341-6.
- Jablonka, S., S. Wiese and M. Sendtner (2004). "Axonal defects in mouse models of motoneuron disease." **J Neurobiol** 58(2): 272-86.
- Jones, K. W., K. Gorzynski, C. M. Hales, U. Fischer, F. Badbanchi, et al. (2001). "Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin." **J Biol Chem** 276(42): 38645-51.

- Kang, F., R. O. Laine, M. R. Bubb, F. S. Southwick and D. L. Purich (1997). "Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin-based Listeria motility." **Biochemistry** 36(27): 8384-92.
- Kang, F., D. L. Purich and F. S. Southwick (1999). "Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration." **J Biol Chem** 274(52): 36963-72.
- Kato, S. and A. Hirano (1990). "Ubiquitin and phosphorylated neurofilament epitopes in ballooned neurons of the extraocular muscle nuclei in a case of Werdnig-Hoffmann disease." **Acta Neuropathol (Berl)** 80(3): 334-7.
- Kislauskis, E. H., X. Zhu and R. H. Singer (1997). "beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility." **J Cell Biol** 136(6): 1263-70.
- Klenchin, V. A., S. I. Sukharev, S. M. Serov, L. V. Chernomordik and A. Chizmadzhev Yu (1991). "Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis." **Biophys J** 60(4): 804-11.
- Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." **Humangenetik** 26(3): 231-43.
- Kobayashi, K., M. Takahashi, N. Matsushita, J. Miyazaki, M. Koike, et al. (2004). "Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase." **J Neurosci** 24(14): 3480-8.
- Kovar, D. R., E. S. Harris, R. Mahaffy, H. N. Higgs and T. D. Pollard (2006). "Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin." **Cell** 124(2): 423-35.
- Kramer, A. (1996). "The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing." **Annu Rev Biochem** 65: 367-409.
- Kramer, A., F. Ferrogliola, C. J. Huang, F. Mulhaupt, D. Nestic, et al. (2005). "Structure-function analysis of the U2 snRNP-associated splicing factor SF3a." **Biochem Soc Trans** 33(Pt 3): 439-42.
- Kramer, A., P. Gruter, K. Groning and B. Kastner (1999). "Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP." **J Cell Biol** 145(7): 1355-68.
- Krause, M., J. E. Bear, J. J. Loureiro and F. B. Gertler (2002). "The Ena/VASP enigma." **J Cell Sci** 115(Pt 24): 4721-6.
- Krebs, A., M. Rothkegel, M. Klar and B. M. Jockusch (2001). "Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton." **J Cell Sci** 114(Pt 20): 3663-72.
- Kugelberg, E. and L. Welander (1956). "Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy." **AMA Arch Neurol Psychiatry** 75(5): 500-9.
- Kuhn, T. B., P. J. Meberg, M. D. Brown, B. W. Bernstein, L. S. Minamide, et al. (2000). "Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases." **J Neurobiol** 44(2): 126-44.
- Kurihara, N., C. Menea, H. Maeda, D. J. Haile and S. V. Reddy (2001). "Osteoclast-stimulating factor interacts with the spinal muscular atrophy gene product to stimulate osteoclast formation." **J Biol Chem** 276(44): 41035-9.

- La Spada, A. R., E. M. Wilson, D. B. Lubahn, A. E. Harding and K. H. Fischbeck (1991). "Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy." **Nature** 352(6330): 77-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature** 227(5259): 680-5.
- Lambrechts, A., A. Braun, V. Jonckheere, A. Aszodi, L. M. Lanier, et al. (2000). "Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties." **Mol Cell Biol** 20(21): 8209-19.
- Lambrechts, A., J. van Damme, M. Goethals, J. Vandekerckhove and C. Ampe (1995). "Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositolphospholipid binding." **Eur J Biochem** 230(1): 281-6.
- Lambrechts, A., J. L. Verschelde, V. Jonckheere, M. Goethals, J. Vandekerckhove, et al. (1997). "The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences." **Embo J** 16(3): 484-94.
- Lariviere, R. C. and J. P. Julien (2004). "Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease." **J Neurobiol** 58(1): 131-48.
- Lassing, I. and U. Lindberg (1985). "Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin." **Nature** 314(6010): 472-4.
- Lee, M. K. and D. W. Cleveland (1994). "Neurofilament function and dysfunction: involvement in axonal growth and neuronal disease." **Curr Opin Cell Biol** 6(1): 34-40.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Bulet, et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." **Cell** 80(1): 155-65.
- Lefebvre, S., P. Bulet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, et al. (1997). "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy." **Nat Genet** 16(3): 265-9.
- Lefebvre, S., P. Bulet, L. Viollet, S. Bertrand, C. Huber, et al. (2002). "A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy." **Hum Mol Genet** 11(9): 1017-27.
- Lichtman, J. W. and J. A. Conchello (2005). "Fluorescence microscopy." **Nat Methods** 2(12): 910-9.
- Lin, D. C. and S. Lin (1979). "Actin polymerization induced by a motility-related high-affinity cytochalasin binding complex from human erythrocyte membrane." **Proc Natl Acad Sci U S A** 76(5): 2345-9.
- Lindenbaum, M. H., S. Carbonetto, F. Grosveld, D. Flavell and W. E. Mushynski (1988). "Transcriptional and post-transcriptional effects of nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC-12 cells." **J Biol Chem** 263(12): 5662-7.
- Lippa, C. F. and T. W. Smith (1988). "Chromatolytic neurons in Werdnig-Hoffmann disease contain phosphorylated neurofilaments." **Acta Neuropathol (Berl)** 77(1): 91-4.
- Liu, F. T., R. J. Patterson and J. L. Wang (2002). "Intracellular functions of galectins." **Biochim Biophys Acta** 1572(2-3): 263-73.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1996). "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein." **Embo J** 15(14): 3555-65.

- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang and 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(6): 1013-21.
- Liu, Q., F. Xie, S. L. Siedlak, A. Nunomura, K. Honda, et al. (2004). "Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases." **Cell Mol Life Sci** 61(24): 3057-75.
- Lorkovic, Z. J., R. Lehner, C. Forstner and A. Barta (2005). "Evolutionary conservation of minor U12-type spliceosome between plants and humans." **Rna** 11(7): 1095-107.
- Lorson, C. L. and E. J. Androphy (1998). "The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding." **Hum Mol Genet** 7(8): 1269-75.
- Lorson, C. L. and E. J. Androphy (2000). "An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN." **Hum Mol Genet** 9(2): 259-65.
- Lorson, C. L., E. Hahnen, E. J. Androphy and 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(11): 6307-11.
- Lorson, C. L., J. Strasswimmer, J. M. Yao, J. D. Baleja, E. Hahnen, et al. (1998). "SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity." **Nat Genet** 19(1): 63-6.
- Lovelock, J. E. and M. W. Bishop (1959). "Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide." **Nature** 183(4672): 1394-5.
- Ludvigsson, P., E. Olafsson and W. A. Hauser (1999). "Spinal muscular atrophy. Incidence in Iceland." **Neuroepidemiology** 18(5): 265-9.
- MacLeod, M. J., J. E. Taylor, P. W. Lunt, C. G. Mathew and S. A. Robb (1999). "Prenatal onset spinal muscular atrophy." **Eur J Paediatr Neurol** 3(2): 65-72.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, et al. (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." **Science** 285(5429): 895-8.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." **J Mol Biol** 53(1): 159-62.
- Massenet, S., L. Pellizzoni, S. Paushkin, I. W. Mattaj and G. Dreyfuss (2002). "The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway." **Mol Cell Biol** 22(18): 6533-41.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, et al. (1996). "Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho." **Embo J** 15(9): 2208-16.
- Matsumura, F. (2005). "Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes." **Trends Cell Biol** 15(7): 371-7.
- McGough, A., W. Chiu and M. Way (1998). "Determination of the gelsolin binding site on F-actin: implications for severing and capping." **Biophys J** 74(2 Pt 1): 764-72.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu and A. Weeds (1997). "Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function." **J Cell Biol** 138(4): 771-81.

- McWhorter, M. L., U. R. Monani, A. H. Burghes and 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(5): 919-31.
- Meadows, J. C. and C. D. Marsden (1969). "A distal form of chronic spinal muscular atrophy." **Neurology** 19(1): 53-8.
- Medeiros, N. A., D. T. Burnette and P. Forscher (2006). "Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones." **Nat Cell Biol** 8(3): 215-26.
- Meister, G., D. Buhler, B. Laggenbauer, M. Zobawa, F. Lottspeich, et al. (2000). "Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins." **Hum Mol Genet** 9(13): 1977-86.
- Meister, G., D. Buhler, R. Pillai, F. Lottspeich and U. Fischer (2001a). "A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs." **Nat Cell Biol** 3(11): 945-9.
- Meister, G., C. Eggert, D. Buhler, H. Brahm, C. Kambach, et al. (2001b). "Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln." **Curr Biol** 11(24): 1990-4.
- Meister, G., C. Eggert and U. Fischer (2002). "SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story." **Trends Cell Biol** 12(10): 472-8.
- Meryman, H. T. (1974). "Freezing injury and its prevention in living cells." **Annu Rev Biophys Bioeng** 3(0): 341-63.
- Meyers, J. A., D. Sanchez, L. P. Elwell and S. Falkow (1976). "Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid." **J Bacteriol** 127(3): 1529-37.
- Miguel-Aliaga, I., Y. B. Chan, K. E. Davies and M. van den Heuvel (2000). "Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in Drosophila." **FEBS Lett** 486(2): 99-102.
- Miguel-Aliaga, I., E. Culetto, D. S. Walker, H. A. Baylis, D. B. Sattelle, et al. (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(12): 2133-43.
- Miki, H., S. Suetsugu and T. Takenawa (1998). "WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac." **Embo J** 17(23): 6932-41.
- Miyashiro, K. Y., A. Beckel-Mitchener, T. P. Purk, K. G. Becker, T. Barret, et al. (2003). "RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice." **Neuron** 37(3): 417-31.
- Mizutani, A., M. Fukuda, K. Ibata, Y. Shiraishi and K. Mikoshiba (2000). "SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms." **J Biol Chem** 275(13): 9823-31.
- Monani, U. R., C. L. Lorson, D. W. Parsons, T. W. Prior, E. J. Androphy, et al. (1999). "A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2." **Hum Mol Genet** 8(7): 1177-83.

- Monani, U. R., M. Sendtner, D. D. Covert, D. W. Parsons, C. Andreassi, et al. (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(3): 333-9.
- Mori, T., I. Okano, K. Mizuno, M. Tohyama and A. Wanaka (1997). "Comparison of tissue distribution of two novel serine/threonine kinase genes containing the LIM motif (LIMK-1 and LIMK-2) in the developing rat." **Brain Res Mol Brain Res** 45(2): 247-54.
- Morrison, K. E. and A. E. Harding (1994). "Disorders of the motor neurone." **Baillieres Clin Neurol** 3(2): 431-45.
- Mouaikel, J., U. Narayanan, C. Verheggen, A. G. Matera, E. Bertrand, et al. (2003). "Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron." **EMBO Rep** 4(6): 616-22.
- Mouaikel, J., C. Verheggen, E. Bertrand, J. Tazi and R. Bordonne (2002). "Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus." **Mol Cell** 9(4): 891-901.
- Mourelatos, Z., L. Abel, J. Yong, N. Kataoka and G. Dreyfuss (2001). "SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins." **Embo J** 20(19): 5443-52.
- Mullins, R. D. and T. D. Pollard (1999). "Structure and function of the Arp2/3 complex." **Curr Opin Struct Biol** 9(2): 244-9.
- Munsat, T. L. (1991). "Workshop report: International SMA Collaboration." **Neurobiol Dis** 1(2): 81.
- Munsat, T. L. and K. E. Davies (1992). "International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany)." **Neuromuscul Disord** 2(5-6): 423-8.
- Murashov, A. K., V. Chintalgattu, R. R. Islamov, T. E. Lever, E. S. Pak, et al. (2007). "RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons." **Faseb J** 21(3): 656-70.
- Murayama, S., T. W. Bouldin and K. Suzuki (1991). "Immunocytochemical and ultrastructural studies of Werdnig-Hoffmann disease." **Acta Neuropathol (Berl)** 81(4): 408-17.
- Nakagawa, O., K. Fujisawa, T. Ishizaki, Y. Saito, K. Nakao, et al. (1996). "ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice." **FEBS Lett** 392(2): 189-93.
- Narayanan, U., T. Achsel, R. Luhrmann and A. G. Matera (2004). "Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein." **Mol Cell** 16(2): 223-34.
- Narayanan, U., J. K. Ospina, M. R. Frey, M. D. Hebert and 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(15): 1785-95.
- Navascues, J., M. T. Berciano, K. E. Tucker, M. Lafarga and A. G. Matera (2004). "Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neurogenesis." **Chromosoma** 112(8): 398-409.
- Nesic, D. and A. Kramer (2001). "Domains in human splicing factors SF3a60 and SF3a66 required for binding to SF3a120, assembly of the 17S U2 snRNP, and prespliceosome formation." **Mol Cell Biol** 21(19): 6406-17.
- Nishida, E., S. Maekawa and H. Sakai (1984). "Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin." **Biochemistry** 23(22): 5307-13.

- Novelli, G., L. Calza, P. Amicucci, L. Giardino, M. Pozza, et al. (1997). "Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues." **Biochem Mol Med** 61(1): 102-6.
- Nusser, N., E. Gosmanova, Y. Zheng and G. Tigyí (2002). "Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells." **J Biol Chem** 277(39): 35840-6.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." **J Biol Chem** 250(10): 4007-4021.
- Ogawa, C., K. Usui, M. Aoki, F. Ito, M. Itoh, et al. (2007). "Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex." **J Biol Chem** 282(15): 11122-34.
- Oh, J. E., K. Karlmark Raja, J. H. Shin, A. Pollak, M. Hengstschlager, et al. (2006). "Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line." **Amino Acids** 31(3): 289-98.
- Ohashi, K., K. Nagata, M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Narumiya, et al. (2000). "Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop." **J Biol Chem** 275(5): 3577-82.
- Otter, S., M. Grimmer, N. Neuenkirchen, A. Chari, A. Sickmann, et al. (2007). "A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex." **J Biol Chem** 282(8): 5825-33.
- Owen, N., C. L. Doe, J. Mellor and K. E. Davies (2000). "Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein." **Hum Mol Genet** 9(5): 675-84.
- Paavilainen, V. O., E. Bertling, S. Falck and P. Lappalainen (2004). "Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins." **Trends Cell Biol** 14(7): 386-94.
- Park, J. W., P. G. Voss, S. Grabski, J. L. Wang and R. J. Patterson (2001). "Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein." **Nucleic Acids Res** 29(17): 3595-602.
- Pearn, J. (1980). "Classification of spinal muscular atrophies." **Lancet** 1(8174): 919-22.
- Pearn, J. H. (1973). "The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England." **J Med Genet** 10(3): 260-5.
- Pearn, J. H., D. Gardner-Medwin and J. Wilson (1978). "A clinical study of chronic childhood spinal muscular atrophy. A review of 141 cases." **J Neurol Sci** 38(1): 23-37.
- Pearn, J. H. and J. Wilson (1973). "Acute Werdnig-Hoffmann disease: acute infantile spinal muscular atrophy." **Arch Dis Child** 48(6): 425-30.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, B. Charroux and G. Dreyfuss (2001a). "The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1." **Curr Biol** 11(14): 1079-88.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2002a). "Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component." **J Biol Chem** 277(9): 7540-5.
- Pellizzoni, L., B. Charroux and 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(20): 11167-72.

- Pellizzoni, L., B. Charroux, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2001b). "A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II." **J Cell Biol** 152(1): 75-85.
- Pellizzoni, L., N. Kataoka, B. Charroux and G. Dreyfuss (1998). "A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing." **Cell** 95(5): 615-24.
- Pellizzoni, L., J. Yong and G. Dreyfuss (2002b). "Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly." **Science** 298(5599): 1775-9.
- Pillai, R. S., M. Grimmier, G. Meister, C. L. Will, R. Luhrmann, et al. (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(18): 2321-33.
- Plessel, G., U. Fischer and R. Luhrmann (1994). "m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain." **Mol Cell Biol** 14(6): 4160-72.
- Podolski, J. L. and T. L. Steck (1988). "Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons." **J Biol Chem** 263(2): 638-45.
- Pollard, T. D. and C. C. Beltzner (2002). "Structure and function of the Arp2/3 complex." **Curr Opin Struct Biol** 12(6): 768-74.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." **Cell** 112(4): 453-65.
- Ponting, C. P. (1997). "Tudor domains in proteins that interact with RNA." **Trends Biochem Sci** 22(2): 51-2.
- Pu, W. T., G. B. Krapivinsky, L. Krapivinsky and D. E. Clapham (1999). "pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins." **Mol Cell Biol** 19(6): 4113-20.
- Rajendra, T. K., G. B. Gonsalvez, M. P. Walker, K. B. Shpargel, H. K. Salz, et al. (2007). "A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle." **J Cell Biol** 176(6): 831-41.
- Raker, V. A., K. Hartmuth, B. Kastner and R. Luhrmann (1999). "Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner." **Mol Cell Biol** 19(10): 6554-65.
- Raker, V. A., G. Plessel and 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(9): 2256-69.
- Ramón y Cajal, S. R. (1903). "Un sencillo método de coloracion selectiva del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados." **Trab. Lab. Inverst. Biol.** 2: 129-221.
- Reddy, R., R. Singh and S. Shimba (1992). "Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions." **Pharmacol Ther** 54(3): 249-67.
- Renvoise, B., K. Khoobarry, M. C. Gendron, C. Cibert, L. Viollet, et al. (2006). "Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells." **J Cell Sci** 119(Pt 4): 680-92.

- Riessland, M., L. Brichta, E. Hahnen and B. Wirth (2006). "The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells." **Hum Genet** 120(1): 101-10.
- Rochette, C. F., L. C. Surh, P. N. Ray, P. E. McAndrew, T. W. Prior, et al. (1997). "Molecular diagnosis of non-deletion SMA patients using quantitative PCR of SMN exon 7." **Neurogenetics** 1(2): 141-7.
- Rossoll, W., S. Jablonka, C. Andreassi, A. K. Kroning, K. Karle, et al. (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(4): 801-12.
- Rossoll, W., A. K. Kroning, U. M. Ohndorf, C. Steegborn, S. Jablonka, et al. (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(1): 93-105.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). DNA Quantification. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, Cold Harbour Laboratory Press. 3: E.5 - E.7.
- Sathish, K., B. Padma, V. Munugalavadla, V. Bhargavi, K. V. Radhika, et al. (2004). "Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline)." **Cell Signal** 16(5): 589-96.
- Schmalbruch, H. and G. Haase (2001). "Spinal muscular atrophy: present state." **Brain Pathol** 11(2): 231-47.
- Schwartz, M. (2004). "Rho signalling at a glance." **J Cell Sci** 117(Pt 23): 5457-8.
- Selenko, P., R. Sprangers, G. Stier, D. Buhler, U. Fischer, et al. (2001). "SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins." **Nat Struct Biol** 8(1): 27-31.
- Setola, V., M. Terao, D. Locatelli, S. Bassanini, E. Garattini, et al. (2007). "Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis." **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(6): 1959-64.
- Sharma, A., A. Lambrechts, T. Hao le, T. T. Le, C. A. Sewry, et al. (2005). "A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells." **Exp Cell Res** 309(1): 185-97.
- Shestakova, E. A., R. H. Singer and J. Condeelis (2001). "The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility." **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(13): 7045-50.
- Shpargel, K. B. and A. G. Matera (2005). "Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins." **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(48): 17372-7.
- Singh, S. S., A. Chauhan, N. Murakami, J. Styles, M. Elzinga, et al. (1996). "Phosphoinositide-dependent in vitro phosphorylation of profilin by protein kinase C. Phospholipid specificity and localization of the phosphorylation site." **Recept Signal Transduct** 6(2): 77-86.
- Siripala, A. D. and M. D. Welch (2007). "SnapShot: actin regulators II." **Cell** 128(5): 1014.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." **Anal Biochem** 150(1): 76-85.

- Soosairajah, J., S. Maiti, O. Wiggan, P. Sarmiere, N. Moussi, et al. (2005). "Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin." **Embo J** 24(3): 473-86.
- Sotelo-Silveira, J. R., A. Calliari, A. Kun, J. C. Benech, C. Sanguinetti, et al. (2000). "Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve." **J Neurosci Res** 62(1): 65-74.
- Spudich, J. A. and S. Watt (1971). "The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin." **J Biol Chem** 246(15): 4866-71.
- Sreedhar, A. S., E. Kalmar, P. Csermely and Y. F. Shen (2004). "Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance." **FEBS Lett** 562(1-3): 11-5.
- Stanek, D. and K. M. Neugebauer (2006). "The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze." **Chromosoma** 115(5): 343-54.
- Steinmetz, M. O., D. Stoffler, A. Hoenger, A. Bremer and U. Aebi (1997). "Actin: from cell biology to atomic detail." **J Struct Biol** 119(3): 295-320.
- Strasser, A., A. Dickmanns, R. Luhrmann and R. Ficner (2005). "Structural basis for m3G-cap-mediated nuclear import of spliceosomal UsnRNPs by snurportin1." **Embo J** 24(13): 2235-43.
- Strasswimmer, J., C. L. Lorson, D. E. Breiding, J. J. Chen, T. Le, et al. (1999). "Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein." **Hum Mol Genet** 8(7): 1219-26.
- Sukharev, S. I., V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik and A. Chizmadzhev Yu (1992). "Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores." **Biophys J** 63(5): 1320-7.
- Sumi, T., K. Matsumoto, A. Shibuya and T. Nakamura (2001). "Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha." **J Biol Chem** 276(25): 23092-6.
- Sumi, T., K. Matsumoto, Y. Takai and T. Nakamura (1999). "Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2." **J Cell Biol** 147(7): 1519-32.
- Sun, H. Q., M. Yamamoto, M. Mejillano and H. L. Yin (1999). "Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein." **J Biol Chem** 274(47): 33179-82.
- Takenawa, T. and H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." **J Cell Sci** 114(Pt 10): 1801-9.
- Talbot, K. (1997). "What's new in the molecular genetics of spinal muscular atrophy?" **Eur J Paediatr Neurol** 1(5-6): 149-55.
- Talbot, K., C. P. Ponting, A. M. Theodosiou, N. R. Rodrigues, R. Surtees, et al. (1997). "Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism?" **Hum Mol Genet** 6(3): 497-500.
- Thieme, A., B. Mitulla, F. Schulze and A. W. Spiegler (1993). "Epidemiological data on Werdnig-Hoffmann disease in Germany (West-Thuringen)." **Hum Genet** 91(3): 295-7.
- Thieme, A., B. Mitulla, F. Schulze and A. W. Spiegler (1994). "Chronic childhood spinal muscular atrophy in Germany (West-Thuringen)--an epidemiological study." **Hum Genet** 93(3): 344-6.

- Toshima, J., K. Ohashi, I. Okano, K. Nunoue, M. Kishioka, et al. (1995). "Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells." **J Biol Chem** 270(52): 31331-7.
- Toshima, J., J. Y. Toshima, T. Amano, N. Yang, S. Narumiya, et al. (2001). "Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation." **Mol Biol Cell** 12(4): 1131-45.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." **Proc Natl Acad Sci U S A** 76(9): 4350-4.
- Tu, Y., S. Wu, X. Shi, K. Chen and C. Wu (2003). "Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation." **Cell** 113(1): 37-47.
- Twiss, J. L. and J. van Minnen (2006). "New insights into neuronal regeneration: the role of axonal protein synthesis in pathfinding and axonal extension." **J Neurotrauma** 23(3-4): 295-308.
- Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, et al. (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." **Nature** 389(6654): 990-4.
- Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey (1997). "Rho GTPases and signaling networks." **Genes Dev** 11(18): 2295-322.
- van Bergeijk, J. (2004). Anreicherung und Kultivierung embryonaler Motoneurone zur Untersuchung der Lokalisation des survival of motoneuron (SMN) Proteins und seiner Interaktionspartner. Med. Hochschule Hannover, Institut für Neuroanatomie, Gottfried Wilhelm Leibnitz Universität Hannover: 1-78.
- van Bergeijk, J., K. Haastert, C. Grothe and P. Claus (2006). "Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein." **Chem Biol Drug Des** 67(3): 244-7.
- van Bergeijk, J., K. Rydel-Konecke, C. Grothe and P. Claus (2007). "The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus." **Faseb J** 21: 1492-1502.
- van der Vleuten, A. J., C. M. van Ravenswaaij-Arts, C. J. Frijns, A. P. Smits, G. Hageman, et al. (1998). "Localisation of the gene for a dominant congenital spinal muscular atrophy predominantly affecting the lower limbs to chromosome 12q23-q24." **Eur J Hum Genet** 6(4): 376-82.
- van Kesteren, R. E., C. Carter, H. M. Dissel, J. van Minnen, Y. Gouwenberg, et al. (2006). "Local synthesis of actin-binding protein beta-thymosin regulates neurite outgrowth." **J Neurosci** 26(1): 152-7.
- Vaudry, D., P. J. Stork, P. Lazarovici and L. E. Eiden (2002). "Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections." **Science** 296(5573): 1648-9.
- Vemuri, B. and S. S. Singh (2001). "Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin." **Cell Signal** 13(6): 433-9.
- Venema, J. and D. Tollervey (1999). "Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." **Annu Rev Genet** 33: 261-311.

- Vitte, J. M., B. Davoult, N. Roblot, M. Mayer, V. Joshi, et al. (2004). "Deletion of murine smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload." **Am J Pathol** 165(5): 1731-41.
- Voss, M. D., A. Hille, S. Barth, A. Spurk, F. Hennrich, et al. (2001). "Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter." **J Virol** 75(23): 11781-90.
- Vyas, S., C. Bechade, B. Riveau, J. Downward and A. Triller (2002). "Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death." **Hum Mol Genet** 11(22): 2751-64.
- Wall, M. A., M. Socolich and R. Ranganathan (2000). "The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed." **Nat Struct Biol** 7(12): 1133-8.
- Wang, C. H., B. D. Papendick, P. Bruinsma and J. K. Day (1998). "Identification of a novel missense mutation of the SMN(T) gene in two siblings with spinal muscular atrophy." **Neurogenetics** 1(4): 273-6.
- Wang, W., G. Mouneimne, M. Sidani, J. Wyckoff, X. Chen, et al. (2006). "The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors." **J Cell Biol** 173(3): 395-404.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki and S. Narumiya (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." **Nat Cell Biol** 1(3): 136-43.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, et al. (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." **Embo J** 16(11): 3044-56.
- Wear, M. A., A. Yamashita, K. Kim, Y. Maeda and J. A. Cooper (2003). "How capping protein binds the barbed end of the actin filament." **Curr Biol** 13(17): 1531-7.
- Werdnig, G. (1891). "Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie aber auf neurotischer Grundlage." **Arch. Psychiatr. Nervenkrankh.** 22: 437-480.
- Wiechelman, K. J., R. D. Braun and J. D. Fitzpatrick (1988). "Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation." **Anal Biochem** 175(1): 231-7.
- Will, C. L. and R. Luhrmann (2005). "Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome." **Biol Chem** 386(8): 713-24.
- Williams, B. Y., S. L. Hamilton and H. K. Sarkar (2000). "The survival motor neuron protein interacts with the transactivator FUSE binding protein from human fetal brain." **FEBS Lett** 470(2): 207-10.
- Willis, D., K. W. Li, J. Q. Zheng, J. H. Chang, A. Smit, et al. (2005). "Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons." **J Neurosci** 25(4): 778-91.
- Wirth, B. (2000). "An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)." **Hum Mutat** 15(3): 228-37.
- Wirth, B., L. Brichta and E. Hahnen (2006). "Spinal muscular atrophy: from gene to therapy." **Semin Pediatr Neurol** 13(2): 121-31.

- Witke, W., A. V. Podtelejnikov, A. Di Nardo, J. D. Sutherland, C. B. Gurniak, et al. (1998). "In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly." **Embo J** 17(4): 967-76.
- Wolstencroft, E. C., V. Mattis, A. A. Bajer, P. J. Young and C. L. Lorson (2005). "A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels." **Hum Mol Genet** 14(9): 1199-210.
- Wong, T. K. and E. Neumann (1982). "Electric field mediated gene transfer." **Biochem Biophys Res Commun** 107(2): 584-7.
- Wu, K. Y., U. Hengst, L. J. Cox, E. Z. Macosko, A. Jeromin, et al. (2005). "Local translation of RhoA regulates growth cone collapse." **Nature** 436(7053): 1020-4.
- Xu, Z., L. C. Cork, J. W. Griffin and D. W. Cleveland (1993). "Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease." **Cell** 73(1): 23-33.
- Yamashita, T., K. L. Tucker and Y. A. Barde (1999). "Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth." **Neuron** 24(3): 585-93.
- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, et al. (1998). "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." **Nature** 393(6687): 809-12.
- Yarmola, E. G. and M. R. Bubb (2006). "Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions." **Trends Biochem Sci** 31(4): 197-205.
- Yong, J., T. J. Golembe, D. J. Battle, L. Pellizzoni and G. Dreyfuss (2004). "snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly." **Mol Cell Biol** 24(7): 2747-56.
- Yong, J., L. Pellizzoni and G. Dreyfuss (2002). "Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex." **Embo J** 21(5): 1188-96.
- Young, P. J., P. M. Day, J. Zhou, E. J. Androphy, G. E. Morris, et al. (2002a). "A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy." **J Biol Chem** 277(4): 2852-9.
- Young, P. J., J. W. Francis, D. Lince, K. Coon, E. J. Androphy, et al. (2003). "The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein." **Brain Res Mol Brain Res** 119(1): 37-49.
- Young, P. J., K. T. Jensen, L. R. Burger, D. J. Pintel and C. L. Lorson (2002b). "Minute virus of mice NS1 interacts with the SMN protein, and they colocalize in novel nuclear bodies induced by parvovirus infection." **J Virol** 76(8): 3892-904.
- Young, P. J., K. T. Jensen, L. R. Burger, D. J. Pintel and C. L. Lorson (2002c). "Minute virus of mice small nonstructural protein NS2 interacts and colocalizes with the Smn protein." **J Virol** 76(12): 6364-9.
- Young, P. J., T. T. Le, M. Dunckley, T. M. Nguyen, A. H. Burghes, et al. (2001). "Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN." **Exp Cell Res** 265(2): 252-61.
- Young, P. J., N. T. Man, C. L. Lorson, T. T. Le, E. J. Androphy, et al. (2000). "The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding." **Hum Mol Genet** 9(19): 2869-77.

- Zebda, N., O. Bernard, M. Bailly, S. Welti, D. S. Lawrence, et al. (2000). "Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension." **J Cell Biol** 151(5): 1119-28.
- Zerres, K. and S. Rudnik-Schoneborn (1995). "Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications." **Arch Neurol** 52(5): 518-23.
- Zerres, K., B. Wirth and S. Rudnik-Schoneborn (1997). "Spinal muscular atrophy--clinical and genetic correlations." **Neuromuscul Disord** 7(3): 202-7.
- Zhang, H., L. Xing, W. Rossoll, H. Wichterle, R. H. Singer, et al. (2006a). "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(33): 8622-32.
- Zhang, H., L. Xing, R. H. Singer and G. J. Bassell (2007). "QNQKE targeting motif for the SMN-Gemin multiprotein complex in neurons." **J Neurosci Res**.
- Zhang, H. L., F. Pan, D. Hong, S. M. Shenoy, R. H. Singer, et al. (2003). "Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization." **J Neurosci** 23(16): 6627-37.
- Zhang, Z., A. K. Ottens, S. F. Lerner, F. H. Kobeissy, M. L. Williams, et al. (2006b). "Direct Rho-associated kinase inhibition induces cofilin dephosphorylation and neurite outgrowth in PC-12 cells." **Cell Mol Biol Lett** 11(1): 12-29.
- Zheng, J. Q., T. K. Kelly, B. Chang, S. Ryazantsev, A. K. Rajasekaran, et al. (2001). "A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons." **J Neurosci** 21(23): 9291-303.
- Zigmond, S. H. (2004). "Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end." **Curr Top Dev Biol** 63: 145-88.
- Zou, J., F. Barahmand-pour, M. L. Blackburn, Y. Matsui, H. A. Chansky, et al. (2004). "Survival motor neuron (SMN) protein interacts with transcription corepressor mSin3A." **J Biol Chem** 279(15): 14922-8.

## 7 Schriftenverzeichnis

### a) Originalarbeiten

1. **van Bergeijk J.**, Rydel-Könecke K., Grothe C., Claus P. (2007): The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C-terminus. *FASEB J*, 21:1492-1502.
2. **van Bergeijk J.**, Haastert K., Grothe C., Claus P. (2006): Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron (SMN) protein. *Chem Biol Drug Des* (formerly: J. Peptide Res.), 67: 244-247.
3. Gringel S., **van Bergeijk J.**, Haastert K., Grothe C., Claus P. (2004): Nuclear Fibroblast Growth Factor - 2 Interacts Specifically with the Splicing Factor SF3a66. *Biol Chem* 385: 1203–1208)
4. Bruns A.-F., **van Bergeijk J.**, Jungnickel J., Grothe C., Claus P. (2007): The nuclear growth factor FGF-2 directly influences the number of nuclear bodies (in Revision)
5. Berski S., **van Bergeijk J.**, Schwarzer D., Grothe C., Gerady-Schahn R., Kirschning A., Dräger G. (2007): Synthesis and Biological Evaluation of a new Polysialic Acid Hydrogel as Scaffold Material for Tissue engineering (eingereicht)

### b) Publierte Abstracta von Vorträgen und Postern

1. Claus P., Bruns A.F., **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. Kriegstein. *Neuroforum* 2005, 1 Suppl.: 398B.
2. **van Bergeijk J.**, Haastert K., Grothe C., Claus P. (2004): Neurite growth and the survival of motoneuron (SMN) protein in PC12 cells. 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. *Verh. der Anat. Ges., Ann. Anat. Suppl.* 187: 241 (Poster).
3. Claus P., Haastert K., **van Bergeijk J.**, Rydel-Könecke K., Grothe C. (2004): Functional domain mapping of the protein responsible for spinal muscular atrophy. 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. *Verh. der Anat. Ges., Ann. Anat. Suppl.* 187: 205.

### c) Vorträge und Poster ohne publizierte Abstracta:

1. **van Bergeijk J.**, Grothe C., Claus P. (2007): The survival of motoneuron (SMN) protein modulates actin dynamics by affecting the ROCK-pathway, 24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 28.09.2007 (Vortrag).
2. Claus P., Grothe C., **van Bergeijk J.** (2007): The spinal muscular atrophy protein and the actin cytoskeleton, 24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 26.09. - 28.09.2007 (Poster).
3. Bruns A.F., **van Bergeijk J.**, Jungnickel J., Grothe C., Claus P. (2007): Nuclear bodies; distinct nuclear structures are regulated by an intracellular growth factor. 102nd Annual Meeting of the German Anatomical Society, Giessen, 30.03. - 02.04.2007.
4. **van Bergeijk J.**, Grothe C., Claus P. (2006): Axonal functions of the survival of motoneuron (SMN) protein: importance for the neurodegenerative disease spinal muscular atrophy,

36. Annual meeting of the Society for Neuroscience, Atlanta, U.S.A., 14.10. – 18.10.2006 (Poster).
5. **van Bergeijk J.**, Grothe C., Claus P. (2006): The spinal muscular gene product regulates neurite outgrowth, 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 27.09.2006 (Vortrag).
6. **van Bergeijk J.**, Bruns A.F., Grothe C., Claus P. (2006): Axonal functions of the survival of motoneuron (SMN) protein. 101st Annual Meeting of the German Anatomical Society, Freiburg, 10.04.2006
7. **van Bergeijk J.**, Bruns A.F., Grothe C., Claus P. (2005): Role of the survival of motoneuron (SMN) protein in neurite outgrowth. 45. Annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, U.S.A., 10.12. – 14.12.2005
8. Claus P., **van Bergeijk J.**, Bruns A.F., Haastert K., Grothe C. (2005): Functional Domain mapping of the survival of motoneuron (SMN) protein, 35. Annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, U.S.A., 12.11. – 16.11.2005
9. Claus P., Bruns A.-F., **van Bergeijk 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, Würzburg, 30.09.2005
10. **van Bergeijk, J.**, Grothe C., Claus P. (2005): Spinal muscular atrophy: The role of the C-terminus of the survival of motoneurons (SMN) protein, 22. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 28.09. – 30.09.2005 (Poster).

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen bedanken, die auf unterschiedliche Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Frau Prof. Dr. Grothe danke ich für die freundliche Aufnahme in Ihre Abteilung und die stetige Unterstützung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Claus, der mir bei der Gestaltung des Themas so viel Hilfe wie nötig und so viel Freiraum wie möglich gewährte. Ohne seinen Eifer, die Ideen und Anregungen sowie seinen Humor wäre dieses Arbeit kaum zu schaffen gewesen. Für seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bin ich ihm von ganzem Herzen dankbar.

Mein Dank gilt auch meinem Co-Doktoranden Alexander-Francisco Bruns, der die Versuche sowie Ergebnisse gerne diskutierte und mit Witz die Stunden im Labor erhellte.

Dankbar bin ich auch meinen Kolleginnen Hella Brinkmann und Kerstin Kuhleemann, ohne deren Hilfe die Hürden des Laboralltags nicht zu bewältigen gewesen wären. Sie haben am Gelingen dieser Arbeit großen Anteil gehabt.

Ich möchte mich auch bei Maike Wesemann bedanken, die mir stets bei Fragen zur Zellkultur geholfen und die Präparation von DRGs aus neonatalen Ratten gezeigt hat, auch wenn die es leider nicht in diese Arbeit geschafft haben. Bedanken möchte ich mich auch bei Julia Jungnickel und Kirsten Haastert, die mir bei wissenschaftlichen Fragestellungen unterschiedlichster Art gerne mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danken möchte ich auch Natascha Heidrich sowie den ehemaligen Doktorandinnen Esther Lipokatic-Takacs und Katrin Schlarmann für die Erfindung des Maikäfer-Manns. Ihr Humor hat mir die Arbeit erleichtert. Den anderen Mitarbeitern Silke Fischer, Birgit Steuber, Hildegard Streich, Karl Klisch, Judith Deimel, Sukhada Chaturvedi, André Dos Santos Nobre, Yohannes Haile, Viktoria Gudi, Peer Seef, Marco Timmer und Günter Braun bin ich für die kollegiale Atmosphäre der Abteilung dankbar.

Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit danke ich der Röchling Stiftung.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder für die stetige Unterstützung in meinem Leben danken. Ohne den Trost, den sie mir spendeten und die Hoffnung, die sie mir gaben würde ich jetzt nicht die Danksagung dieser Arbeit schreiben.

Zuletzt möchte ich mich beim liebsten Menschen dieser Welt bedanken. Sie hat am Gelingen dieser Arbeit maßgeblichen Anteil gehabt und nach erfolglosen Versuchsreihen zu Hause immer wieder die Scherben aufgesammelt. Ohne Dich, mein Schatz, wäre das Leben grau.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Jeroen Alexander Sebastian van Bergeijk  
Geburtsdatum: 09. März 1976  
Geburtsort: Lindlar  
Familienstand: ledig  
Wohnsitz: Lutherstraße 81, D-30171 Hannover

### Schulausbildung:

1983 - 1987 Kath. Grundschule Corneliusstrasse, Wuppertal  
1987 - 1993 Städt. Realschule Blücherstraße, Wuppertal  
1993 - 1997 Kath. Sophie - Barat Gymnasium, Hamburg  
(1993 – 1995 gymnasiale Aufbaustufe)  
12.06.1997 Zuerkennung der Allgemeinen Hochschulreife

### Zivildienst:

07/1997 - 08/1998 Jugendherberge Kappeln an der Schlei

### Studium:

Fachrichtung: Diplom Biochemie  
10/1998 - 09/2000 Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main  
12.09.2000 Zuerkennung des Vordiploms  
10/2000 - 06/2001 University of Edinburgh, Großbritannien  
Faculty of Science and Engineering  
10/2001 - 10/2004 Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
04/2004 - 10/2004 Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover  
Diplomarbeit: „Anreicherung und Kultivierung embryonaler Motoneurone zur Untersuchung der Lokalisation des survival of motoneuron (SMN) Proteins und seiner Interaktionspartner“  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Claus und Prof. Dr. rer. nat. Claudia Grothe  
02.11.2004 Abschluss mit dem Hochschulgrad Diplom-Biochemiker an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

### Dissertation:

01/2005 – 11/2007 Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover  
Thema: „Das survival of motoneuron (SMN) Protein und axonales Wachstum – Bedeutung für die molekulare Pathologie der Spinalen Muskelatrophie“  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Claus  
21.11.2007 Abschluss mit dem Hochschulgrad Dr. rer. nat. an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover