

Molekulare Medizin

Wenn Muskeln die Nerven verlieren

UTZ FISCHER, MATTHIAS KROISS, ASHWIN CHARI
THEODOR-BOVERI-INSTITUT AM BIOZENTRUM, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

In Deutschland werden jährlich ca. 300 Kinder mit einer oft fatalen neuronalen Krankheit, der Spinalen Muskelatrophie (SMA), geboren. Klinisch fallen die Patienten mit einer schlaffen Lähmung der Extremitätenmuskulatur auf, in schweren Fällen lernen sie weder sitzen noch laufen. Lebensbedrohlich wird die autosomal rezessive Erkrankung durch die begleitende Lähmung der Atemmuskulatur, die schwere Atemwegsinfektionen zur Folge hat. Daran versterben die Patienten häufig bereits im Kleinkindalter.

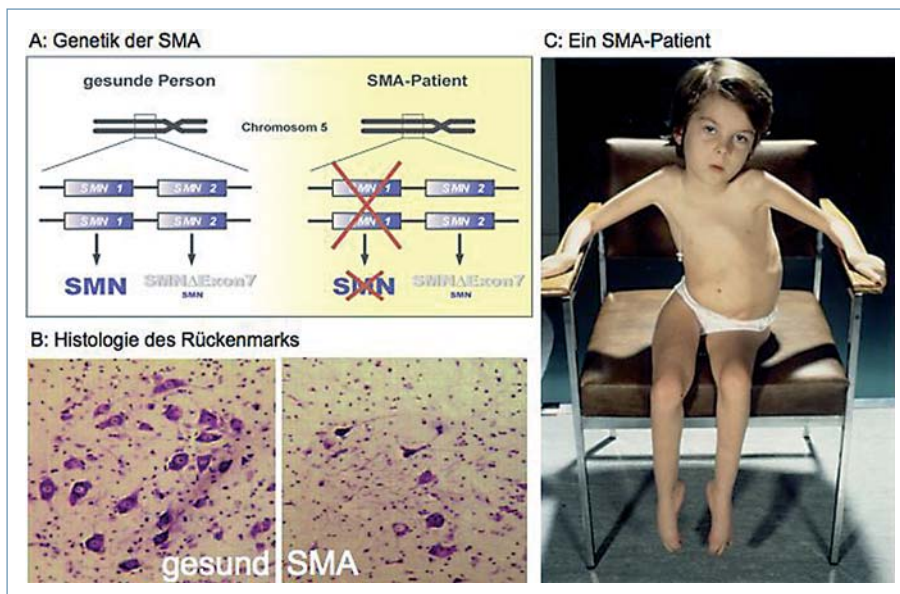
■ Pathologisches Korrelat der Krankheit ist die Degeneration der Motoneuronen, die für die Innervation der Muskulatur zuständig sind. Obwohl es durchaus unterschiedliche Schweregrade der Krankheit gibt, sind nahezu alle SMA-Fälle durch homozygote Deletionen oder Mutationen in einem einzigen Gen, dem Survival Motor Neuron (SMN)-Gen I, verursacht^[1] (Abb. 1). Im Gegensatz zu anderen Organismen wie z. B. Mäusen besitzt der Mensch eine nahezu identische zweite Kopie des SMN-Gens (SMNII-Gen). Die Transkripte

dieses Gens werden jedoch aufgrund einer stillen Punktmutation anders prozessiert als jene des SMNI-Gens: Ein Protein-kodierender Abschnitt der prä-mRNA, das Exon 7, wird übersprungen (Exon-Skipping)^[2]. Die Folge ist fatal: Von SMNII wird nur eine geringe Menge funktionsfähiges SMN-Protein hergestellt. Daher kann ein Defekt des SMNI-Gens nicht durch das SMNII-Gen kompensiert werden. Die Spinalen Muskelatrophie kann man daher auch als SMN-Mangelkrankheit bezeichnen.

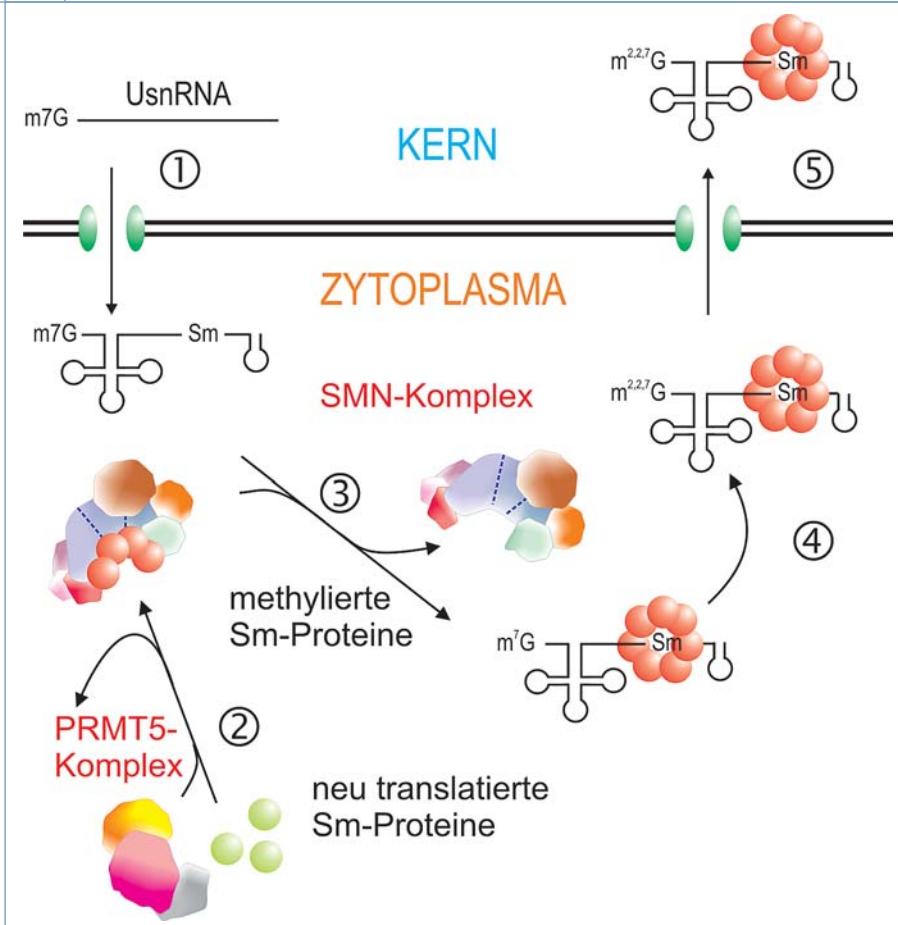
Die Aufgaben von SMN

Aufgrund der oben skizzierten genetischen Situation war es frühzeitig klar, dass ein molekulares Verständnis der SMA nur über die Analyse der zellulären Funktion von SMN führen würde. Da bei SMA-Patienten ausschließlich die Motoneuronen betroffen sind, lag die Vermutung nahe, dass SMN eine hochspezifische Aufgabe in diesen Zellen erfüllt. Der Verlust dieser Funktion führt dann zur Krankheit. Überraschenderweise fand man aber, dass das SMN-Protein ubiquitär exprimiert wird. Es gilt daher heute als gesichert, dass SMNI ein typisches „Haushaltsgen“ darstellt, das allgemeine zelluläre Funktionen ausübt. Obwohl auch Zelltyp-spezifische Funktionen beschrieben wurden, konnte man das SMN-Protein mit einer Reihe von ganz allgemeinen Vorgängen in Verbindung bringen. Die am besten auf molekularer Ebene verstandene Funktion besteht in der Zusammenlagerung von RNA-Proteinkomplexen des Spleißosoms (U snRNPs). In der Tat gibt es gute Gründe anzunehmen, dass diese Aktivität auch entscheidend zur Pathogenese der SMA beiträgt.

Das Spleißosom ist eine makromolekulare Maschine von unglaublicher Komplexität und Dynamik: Seine wichtigsten Bestandteile sind vier unterschiedliche U snRNPs, welche ihrerseits aus einer namensgebenden U snRNA-Komponente (U1, U2, U4/6 und U5) und mehreren Proteinen bestehen. Diese U snRNPs lagern sich an nicht-kodierende Bereiche (Introns) einer prä-mRNA an und wirken zusammen, um die kodierenden Bereiche (Exons) unter gleichzeitiger Entfernung der Introns zusammenzufügen. Dies ist einer der wichtigen Schritte bei der Realisierung des genetischen Codes. Allerdings müssen die einzelnen U snRNPs ihrerseits in der Zelle in einem komplizierten und mehrstufigen Prozess hergestellt werden (Abb. 2). Die transkribierten U snRNAs werden dazu aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo sieben Sm-Proteine an einen bestimmten Teil der U snRNA binden. Es entsteht eine außerordentlich kompakte und stabile ringförmige Struktur, die das strukturelle Grundgerüst aller U snRNPs bildet. Man bezeichnet sie als „Sm-core“-Domäne. Nach weiteren Reifungsschritten gelangt das Partikel dann in den



▲ **Abb. 1:** Die Spinalen Muskelatrophie ist eine neuromuskuläre genetische Krankheit. **A,** Die homozygote Deletion oder Mutation der SMNII-Genkopie führt zur SMA. **B,** Die reduzierte Anzahl von Motoneuronen im Rückenmark (violette Färbung) ist ein pathologisches Merkmal der SMA. Gezeigt sind histologische Schnitte durch das Rückenmark des SMA-Mausmodells. **C,** Ein SMA-Patient. Die Fotos wurden freundlicherweise von Frau Prof. Rudnik-Schöneborn (C) und Herrn Prof. Sendtner (B) zur Verfügung gestellt.



▲ **Abb. 2:** Die Zusammenlagerung von spleißosomalen U snRNPs erfolgt durch die koordinierte Aktivität zweier Proteinkomplexe. Nach Transkription der U snRNA im Zellkern (1) erfolgt ihr Export in das Zytoplasma. Dort translatierte Sm-Proteine (grün) werden durch den PRMT5-Komplex symmetrisch an Arginin-Resten di-methyliert (2, rot). Anschließend werden sie auf den SMN-Komplex übertragen. Nur mit den am SMN-Komplex gebundenen Sm-Proteinen kann die U snRNA mit ihrer Sm-Stelle in Wechselwirkung treten (3). Es bildet sich ein stabiles Sm-core-Partikel aus, das aus der U snRNA und einem siebenteiligen Ring von Sm-Proteinen besteht. Nun wird die Cap-Struktur der U snRNA hypermethyliert (4) und das fertige Sm-core-Partikel in den Zellkern importiert (5).

Zellkern und erfüllt schließlich seine Funktion im Spleißosom.

Das Paradoxon

Obwohl die Zusammenlagerung von U snRNA und Sm-Proteinen im Reagenzglas spontan erfolgen kann, war für das Verständnis der SMA die Beobachtung entscheidend, dass dieser Vorgang in der lebenden Zelle die Mitwirkung des SMN-Proteins erfordert^[3]. So wurde zunächst eine transiente Wechselwirkung zwischen SMN und U snRNAs im Zytoplasma beobachtet. In weitergehenden Studien ließ sich dann zeigen, dass das SMN-Protein Teil einer makromolekularen Einheit, des SMN-Komplexes ist, der die Sm-Proteine in einer aktiven Weise auf die U snRNA lädt^[4]. Eine solche faktorvermittelte RNP-Zusammenlagerung war bis dahin nicht beschrieben worden. Interessanterweise bedürfen Sm-Proteine zuvor einer posttranslationalen Modifikation, um effizient an den SMN-Kom-

plex zu binden: Einige Arginin-Reste der Sm-Proteine werden durch den PRMT5-Komplex symmetrisch di-methyliert^[5, 6].

Seit diese Zusammenhänge erforscht wurden, fragen sich die Wissenschaftler, warum überhaupt so viele assistierende Faktoren an der Biogenese der U snRNPs beteiligt sind, wenn sich diese Partikel doch augenscheinlich *in vitro* spontan und ohne jede Hilfe bilden können. Eine mögliche Erklärung für dieses Paradoxon könnten die physikochemischen Eigenschaften der Sm-Proteine bieten. Die hoch abundanten Proteine dieser Familie besitzen nämlich ungewöhnlich viele basische Aminosäuren und stets zwei einander gegenüberliegende Protein-Protein-Interaktionsoberflächen. Man kann sich daher vorstellen, dass ein geeignetes „Kontrollsystem“ die Sm-Proteine daran hindern muss, in der Zelle zu aggregieren oder mit anderen, „falschen“ RNAs in Wechselwirkung zu treten. Das SMN/PRMT5-System hätte demnach die

Funktion eines Chaperons: Es ermöglicht einerseits die Zusammenlagerung eines funktionellen RNPs, andererseits schützt es aber auch die noch nicht zusammengelagerten Komponenten vor fehlerhaften Interaktionen.

Auswirkungen für SMA-Patienten

Jedoch: Was hat dies mit der bei SMA-Patienten beobachteten Degeneration von Motoneuronen zu tun? Gibt es tatsächlich eine Verbindung zwischen der Funktion von SMN in der Zusammenlagerung von U snRNPs und der SMA? Man müsste dem Gesagten zufolge postulieren, dass in Zellen von Patienten (und hier besonders in den betroffenen Motoneuronen) die Zusammenlagerung der U snRNPs vermindert abläuft. Dies ließ sich in der Tat experimentell nachweisen. Aber ist dieser biochemische Defekt auch direkt für den Untergang der Motoneurone verantwortlich oder spielen hier noch andere Mechanismen eine Rolle? Obwohl diese Frage noch nicht abschließend beantwortet ist, deuten einige im Zebrafisch-Modell erhaltene experimentelle Befunde darauf hin. Durch Antisense-Strategien ließ sich in diesem Tiersystem die SMN-Expression herunterregulieren, wodurch man eine Situation wie bei SMA-Patienten simulieren konnte. Erwartungsgemäß zeigten so veränderte Fische einen Phänotyp, der sehr an die Situation bei der SMA erinnert: Die Beweglichkeit der Fische war stark eingeschränkt und Motoneurone wiesen massiv verkürzte und verzweigte Axone auf. Interessanterweise ließ sich dieser Phänotyp durch die Bereitstellung von vollständig zusammengebauten U snRNPs effizient unterdrücken. In der Tat scheint also die unzureichende Bereitstellung von U snRNPs die Motoneurone in den Untergang zu treiben^[7].

Schlussfolgerung

Da nun U snRNPs essenzielle Bestandteile des Spleißosoms sind, könnte es – so eine gängige Arbeitshypothese – im Körper von SMA-Patienten zu einer generellen Schwächung des Spleißprozesses kommen^[8]. Prä-mRNAs, die aufgrund ihrer Beschaffenheit auch unter normalen zellulären Bedingungen nur ineffizient gespleißt werden, ließen sich unter SMN-Mangelbedingungen möglicherweise gar nicht mehr prozessieren. Bislang wurden solche Prä-mRNAs noch nicht identifiziert. Jedoch könnte genau ein solches Szenario erklären, weshalb sich ein genereller zellulärer Defekt nur in einem Zelltyp auswirkt: in den Motoneuronen. ■

Literatur

- [1] Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., Melki, J. (1995): Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155–165.
- [2] Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., Wirth, B. (1999): A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 6307–6311.
- [3] Fischer, U., Liu, Q., Dreyfuss, G. (1997): The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90: 1023–1029.
- [4] Meister, G., Bühler, D., Pillai, R., Lottspeich, F., Fischer, U. (2001): A multiprotein complex mediates the ATP-dependent

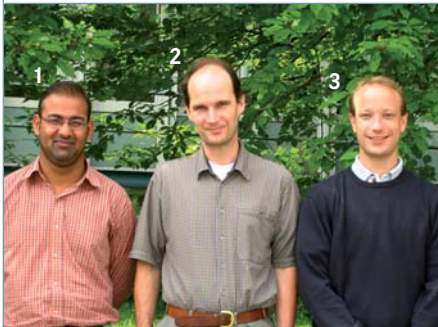
assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell Biol.* 3: 945–949.

- [5] Paushkin, S., Gubitz, A. K., Massenet, S., Dreyfuss, G. (2002): The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 305–312.
- [6] Meister, G., Eggert, C., Fischer, U. (2002): SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* 12: 472–478.
- [7] Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Lagerbauer, B., Fischer, U. (2005): Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* 19: 2320–2330.
- [8] Eggert, C., Chari, A., Lagerbauer, B., Fischer, U. (2006): Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol. Med.* 12: 113–121.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Utz Fischer
Theodor-Boveri-Institut am Biozentrum
Universität Würzburg
Am Hubland
D-97074 Würzburg
Tel.: 0931-888 4029
Fax: 0931-888 4028
utz.fischer@biozentrum.uni-wuerzburg.de
www.biochem.biozentrum.uni-wuerzburg.de

AUTOREN



Utz Fischer²

1983–1988 Biochemiestudium an der Freien Universität Berlin, 1989–1992 Promotion an der Philipps-Universität Marburg, 1992–1997 Postdoctoral Fellow am IMT in Marburg und am Howard Hughes Medical Institute, PA, USA, 1997–2003 Leiter einer Unabhängigen Arbeitsgruppe am MPI für Biochemie, Martinsried. Seit 2003 Professor für Biochemie am Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum) der Universität Würzburg

Ashwin Chari¹

1999–2004: Studium der Biochemie, Molekularbiologie und Biophysik an der ETH Zürich. Seit 2004 Doktorand am Lehrstuhl für Biochemie, Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum), Universität Würzburg.

Matthias Kroiß³

1998–2004 Medizinstudium an der Universität Würzburg, 2004–2006 Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg. Seit 2005 Doktorand am Lehrstuhl für Biochemie, Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum), Universität Würzburg.