

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine Methoden

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „Mini-“ bzw. „Maxi-Plasmid-Purification-Kit“ der Firma Qiagen. Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Qiaquick-Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Transformationen von Plasmid-DNA in die *E. coli* Stämme DH5 α und BL21(DE3) erfolgte mit der CaCl₂-Methode.

1.1.2 Klonierung von cDNAs

Die komplementären DNAs (cDNAs) für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) und „Marathon cDNA“ (Clontech) als Matrize amplifiziert. Diese cDNA-Mischung basiert auf poly(A⁺)-mRNAs, die aus humanen, fötalen Gehirnen isoliert werden. Für die Amplifikation wurden für das jeweilige Protein spezifische, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (engl.: Primer) verwendet, die an ihren 5'- bzw. 3'-Enden die Erkennungssequenzen für die während der Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen enthielten. Die cDNAs wurden in Vektoren kloniert, die die Expression und *in vitro* Translation der Proteine erlaubten. Deletionsfragmente wurde ausgehend von diesen Konstrukten in analoger Vorgehensweise kloniert. In der Tabelle 3.1 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgelistet.

Protein	As	Konstrukt	Plasmid	5´-/3´-Rs	Mutation	
SMN	1-294	pET21a-SMN	pET21a	BamHI/HindIII	WT	
		SMN-His	pET28a	BamHI/HindIII	WT	
		GST-SMN	pGEX5X-1	Eco/Xho	WT	
		zz-SMN	zzpET21a	BamHI/HindIII	WT	
		GST-SMN-EK	pGEX5X-1	Eco/Xho	E134K	
		GST-SMN-MuI	pGEX5X-1	Eco/Xho	siehe 4.8	
	1-30	GST-SMN-1/30	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-1/30	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	1-60	GST-SMN-1/60	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-1/60	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	1-90	GST-SMN-1/90	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-1/90	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	1-120	GST-SMN-1/120	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-1/120	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	1-159	zz-SMN-1/159	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	1-160	GST-SMN-1/160	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		GST-SMN-1/160-EK	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	E134K	
	30-60	zz-SMN-30/60	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	30-105	GST-SMN-30/105	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-30/105	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	36-160	GST-SMN-36/160	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-36/160	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	60-90	zz-SMN-60/90	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	55-294	GST-SMN-55/294	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-SMN-55/294	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	90-160	zz-SMN-90/160	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	83-173	GST-SMN-83/173-WT	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI		
		GST-SMN-83/173-K97E	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	K97E	
		GST-SMN-83/173-E104K	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	E104K	
		GST-SMN-83/173-D105K	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	D105K	
		GST-SMN-83/173-R133K	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	R133K	
		GST-SMN-83/173-E135K	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	E135K	
		GST-SMN-83/173-Q136K	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	Q136K	
		GST-SMN-83/173-N137A	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	N137A	
		GST-SMN-83/173-L142A	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	L142A	
		GST-SMN-83/173-S143Q	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	S143Q	
		90-294	GST-SMN-90/294	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT
			zz-SMN-90/294	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT
		159-294	GST-SMN-159/294	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT
	zz-SMN-159/294		zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
	120-160	zz-SMN-120/160	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	
SIP1	1-280	pET21a-SIP1	pET21a	BamHI/HindIII	WT	
		zz-SIP1	zzpET21a	BamHI/HindIII	WT	
unrip	1-351	pET21a-unrip	pET21a	EcoRI/XhoI	WT	
		HA-unrip	pHAcDNA3	EcoRI/XhoI	WT	
Gemin3	1-824	pET21a-Gemin3	pET21a	SaII/NotI	WT	
		GST-Gemin3	pGEX5X-1	SaII/NotI	WT	
GIP	1-1059	His-GIP	pET28a	EcoRI/XhoI	WT	
		GST-GIP	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT	
		zz-GIP	zzpET21a	EcoRI/XhoI	WT	

p175	1-1509	pET21a-p175	pET21a	NotI	WT
	1-695	GST-p175-NterII	pGEX5X-1	BamHI	WT
		zz-p175-Cter-NterII	zzpET21a	BamHI	WT
	1307-1509	GST-p175-Cter	pGEX5X-1	EcoRI/NotI	WT
		zz-p175-Cter	zzpET21a	EcoRI/NotI	WT
SmB/B'	1-231	pBlue-SmB/B'	pBluescript II KS	EcoRI/HindIII	WT
SmD1	1-119	pBlue-SmD1	pBluescript II KS	EcoRI/SalI	WT
	68-119	pGEX5X-1-SmD1-Cter	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT
	1-68	pET21a-SmD1-Nter	pET21a	EcoRI/XhoI	WT
SmD2	1-118	pBlue-SmD2	pBluescript II KS	EcoRI/SalI	WT
SmD3	1-126	pBlue-SmD3	pBluescript II KS	EcoRI/SalI	WT
	72-126	pGEX5X-1-SmD3-Cter	pGEX5X-1	EcoRI/XhoI	WT
	1-72	pET21a-SmD3-Nter	pET21a	EcoRI/XhoI	WT
SmE	1-92	pBlue-SmE	pBluescript II KS	EcoRI/HindIII	WT
SmF	1-86	pBlue-SmF	pBluescript II KS	EcoRI/XhoI	WT
SmG	1-76	pBlue-SmG	pBluescript II KS	EcoRI/XhoI	WT

Tabelle 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plamidkonstrukte.

As steht für Aminosäure; Rs steht für Restriktionsschnittstelle; WT steht für Wildtyp; bei Punktmutationen sind die Position und die ausgetauschten Aminosäuren im Einbuchstabencode angegeben

1.1.3 *In vitro* Mutagenese

Die Herstellung von SMN-Konstrukten mit Mutationen in der Tudor-Domäne von SMN (z. B. SMN-E134K) erfolgte durch zwei PCR-Schritte. Der 5'-Primer der ersten PCR war zum 5'-Ende von SMN komplementär und trug zusätzlich die Sequenz für EcoRI. Die Sequenzen der verschiedenen 3'-Primer enthielt an den entsprechenden Positionen Punktmutationen, die zum gewünschten Aminosäureaustausch führen. Mit diesen Primer-Paaren und einer SMN-Wildtyp Sequenz als Matrize wurden DNA-Fragmente von ca. 400-450 bp amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden gereinigt und als 5'-Primer in der zweiten PCR verwendet. Der 3'-Primer der zweiten PCR war zum 3'-Ende von SMN komplementär und trug eine XhoI-Schnittstelle. Als Matrize wurde wieder die SMN-Wildtyp-Sequenz verwendet. Die resultierenden 900 bp DNA-Fragmente wurden über EcoRI/XhoI in pET21a kloniert und anschließend sequenziert. Konstrukte, die die gewünschten Mutationen enthielten, wurden in pGEX5X-1 und zzpET21a subkloniert. Fragmente, die für die ersten 160

Aminosäuren von SMN und Punktmutationen in der Tudor-Domäne kodierten, wurden in analoger Weise über PCR kloniert.

3.1.4 Klonierung von GIP1 und p175

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

3.1.5 *In vitro* Transkription von RNA

Zur *in vitro* Transkription von RNAs wurde der Transkriptionskit der Firma Promega verwendet. Als Matrize dienten linearisierte Plasmide, die 5'-wärts der zu transkribierenden Sequenz einen geeigneten Promoter für die entsprechende RNA-Polymerase aufwiesen (T7- oder SP6-Promoter). Die Plasmide für die Transkription der snRNAs U1, U1 Δ Sm und U5 und der DHFR-mRNA sind in Fischer *et al.* (1997) und (Jarmolowski und Mattaj, 1993) beschrieben. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

2 µl	linearisiertes Plasmid (1µg/µl)
3 µl	10x Transkriptionspuffer
5 µl	10x Ribonukleotidmix (5 mM ATP, CTP, GTP; 1 mM UTP)
1 µl	GpppG (25 mM)
2,5 µl	0,1 M DTE
8 µl	H ₂ O
1 µl	BSA (1µg/µl, Rnase-frei)
3 µl	α-[³² P]-UTP (3000 Ci/mmol)
2 µl	RNA-Polymerase (10 U/µl)

Die Reaktion wurde für 2h bei 37° C inkubiert. Zur Reinigung der *in vitro* transkribierten RNAs wurde der gesamte Reaktionsansatz mit 1 vol RNA-Probenpuffer (90% (v/v) Formamid, 0,025% (w/v) Xylencyanol, 0,025% Bromphenolblau) gemischt und durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 4% Polyacrylamidgel (4% Polyacrylamid [Acrylamid/N,N'-Methylen Bisacrylamid, 19:1 (w/w)], 8M Harnstoff in 0,5x TBE) getrennt. Die durch Autoradiographie sichtbar gemachte Hauptbande wurde ausgeschnitten, mit 400 µl AES-Puffer (300 mM Na⁺-Acetat (pH 5,2), 2 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS) versetzt und über Nacht bei 4° C in einem Überkopf-Rotor inkubiert. Anschließend wurde die extrahierte RNA gefällt, getrocknet und ihre spezifische Radioaktivität nach Lösen in ddH₂O durch Messung der Cherenkov-Strahlung ermittelt.

3.1.6 3'-Endmarkierung von U snRNA

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

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

Die Reaktion erfolgte für 2 h bei 4° C. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert, gewaschen, getrocknet und in 50 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen.

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

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

3.2.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Die Expression von HA-unrip, HA-SMN sowie HA in Säugerzellen erfolgte durch transiente Transfektion der jeweiligen Plasmid-Konstrukte in 293-Zellen. Dazu wurden jeweils 12 µg Plasmid-DNA in 210 µl ddH₂O gelöst und mit 70 µl Lipofectamin (Gibco BRL) gemischt. Diese Mischung wurde 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 293-Zellen von 30-50% Konfluenz in Serum-freien Medium gewaschen und die Lipofectamin-DNA-Mischung auf die Zellen pipettiert. Nach 8h Inkubation unter Standardbedingungen wurde FCS zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) zugegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht inkubiert und nach erneutem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) in 2 ml 0,5% Triton X-100 in PBS (pH 7,4) für 20 min auf Eis. Nach Zentrifugation der Extrakte für (10 min, 13000g, 4°C) wurden die Überstände in flüssigem N₂ weggefroren.

3.3 Immunologische und immunbiochemische Methoden

Sämtliche nicht näher beschriebenen Standard-Methoden (Western-Blotten etc.) wurden wie in Harlow und Lane (1988) beschrieben durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzung der wichtigsten Puffer (Transferpuffer, Blotpuffer). Die Peroxidase-Aktivität der verwendeten sekundären Antikörper wurde mit „Enhanced Chemical Luminescence“ (ECL) der Firma Amersham-Pharmacia nachgewiesen. Die Grundlagen und Details der Herstellung von monoklonalen Antikörpern (Puffer, Medien, Inkubationszeiten) und Antiseren sind ebenfalls in Harlow und Lane (1988) beschrieben.

3.3.1 Herstellung eines monoklonalen anti-SMN Antikörper

Zur Gewinnung von monoklonalen anti-SMN Antikörpern wurde im Abstand von zwei Wochen insgesamt vier Mal eine 1:1 Mischung aus gereinigtem, rekombinantem His-SMN (Konzentration:1 mg/ml) und komplettem Freundem Adjuvans in BALB/c Mäuse subkutan injiziert. Entnommene Milzzellen wurden mit PAIB₃AG81 Myeloma Zellen in einem Verhältnis von 1:2 vermischt und mittels PEG4000 fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden in 24 Kavitäten Platten (Costar, Gibco BRL) zunächst für 24 h in NM-Medium + 5 % BriClone (GibcoBRL) und dann über einen Zeitraum von 10 Tagen in selektivem HAT-Medium + 5 % BriClone (GibcoBRL) inkubiert. Dabei wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Überstände dieser Hybridoma-Mischkulturen wurden durch Western-Blotten gegen rekombinantes GST-SMN auf SMN-spezifische Antikörper getestet und die Mischkulturen dann durch Verdünnen in 96 Kavitäten-Platten (Gibco BRL) vereinzelt. Erneutes Testen der Kulturüberstände nach zwei Wochen mittels Western-Blotten gegen rekombinantes GST-SMN erlaubte die Identifizierung von zwei Hybridoma-Klonen (7B10 und 66C10), die spezifische anti-SMN Antikörper produzieren (siehe 4.1).

3.3.2 Herstellung von Antiseren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen SMN, SIP1, Gemin3/dp103, GIP1/Gemin4, unrip und sowie den N- und C-Terminus von p175 hergestellt. Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine bzw. Proteinfragmente als zz-Fusionen rekombinant in *E. coli* exprimiert (siehe 3.4.1) und die *E. coli* Extrakte mit je 1ml IgG-Sepharose (Amersham-Pharmacia) 1h bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurden gebundene Proteine mit 3x 1 ml 100 mM Glycin (pH 2,3) in 100 µl 2 M Tris/HCl (pH 8,8) eluiert. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte alle 14 Tage über einen Zeitraum von 2 Monaten. Dazu wurde jeweils eine 1:1 Mischung aus dem jeweiligen zz-Fusionsprotein (Konzentration 1 mg/ml) und kompletten Freundschens Adjuvans subkutan injiziert. Das gewonnene Blut wurde zur Gerinnung 2h bei 37°C inkubiert und anschließend 25 min bei 10000g abzentrifugiert. Die Überstände wurden entweder weiter affinitätsgereinigt oder direkt für Western Blots, Immunpräzipitationen, Immunfluoreszenzmikroskopie und Oozyten-Injektionsstudien verwendet. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -20°C.

3.3.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

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

Antikörper/Antiserum	Immunisiertes Antigen	zur Reinigung gekoppeltes Antigen
7B10	SMN-His	GST-SMN-1/160
anti-SIP1	zz-SIP1	SIP1-His
anti-unrip	zz-unrip	GST-unrip
anti-Gemin3	zz-Gemin3	GST-Gemin3
anti-GIP1	zz-GIP1	GST-GIP1
anti-p175Nter	zz-p175Nter	GST-p175Nter
anti-p175Cter	zz-p175Cter	GST-p175Cter
anti-Tudor	zz-SMN	Säule: GST-SMN-1/90 Säule: GST-SMN-36/160

Zur Reinigung wurden die Antiseren mehrfach über die jeweiligen Säulen geladen. Nach aufeinanderfolgenden Waschsritten mit PBS (pH 7,4), 100 mM Tris (pH 8,0) und 10 mM Tris (pH 8,0) wurden gebundene Antikörper mit 100 mM Glycin (pH 2,3) in 10 % (v/v) 2 M Tris/HCl (pH 8,8) eluiert und gegen PBS dialysiert. Die Reinigung der anti-Tudor/SMN-Antikörper erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde das anti-SMN Serum für Antikörper, die die N-terminalen 90 Aminosäuren erkennen, an einer GST-SMN-1/90 Säule depletiert. Im zweiten Schritt wurden dann für die Tudor-Domäne spezifische Antikörper über eine GST-SMN-36/160 Säule gereinigt. Die Lagerung aller Antikörper erfolgte bei -20°C , die der Affinitätsäulen bei 4°C in PBS (pH 7,4).

3.3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendeten COS-1-Zellen wurden auf sterile Deckgläschen in 24 Kavitäten Platten (Costar, Gibco BRL) ausgesät und bis 60% Konfluenz kultiviert. Die einzelnen Kavitäten wurden mit PBS (pH 7,4) gewaschen (alle Waschsritte: 500 μl /Kavität) und mit 3% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 10 min mit 0,2% Triton-X-100 in PBS (pH 7,4). Anschließend wurde zwei Mal mit 100 mM Glycin in PBS (pH 7,4), sowie ein Mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und die Zellen dann mit 3% Rinderserum-Albumin (BSA) in PBS (pH 7,4) für 45 min abgeblockt. Nach fünfmaligen Waschen mit TBP-Puffer (0,1% Tween 20, 0,2% BSA in PBS (pH 7,4)) wurden die Zellen entweder mit affinitätsgereinigtem, monoklonalem 7B10 Antikörper oder polyklonalem anti-SIP1 Antikörper (Verdünnung jeweils 1:1000 in TBP-Puffer) für 1h bei RT inkubiert. Nach fünf Waschsritten mit TBP-Puffer wurden die Zellen dann mit TRITC-konjugiertem anti-mouse-IgG (Verdünnung 1:200) und FITC-konjugiertem anti-rabbit-IgG (Verdünnung 1:200) für 1h im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen drei Mal mit TBP-Puffer, zwei Mal mit ddH₂O gewaschen und in einem Tropfen DABCO-Mowiol (1 ml Mowiol + 0,05 g

DABCO) eingedeckt. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) als auch unter dem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss) betrachtet und fotografiert.

3.3.5 Immunpräzipitationsexperimente

Um zu testen, ob mono- oder polyklonale Antikörper in der Lage sind, ihr Antigen in Lösung zu erkennen, wurden Radioimmunpräzipitationsassays (RIPAs) durchgeführt. Dazu wurden 1-2 µg der affinitätsgereinigten Antikörper an 20 µl ProteinA-Sepharose (Amersham-Pharmacia) für 1h bei RT gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer (300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 0,01% Nonidet P-40) wurde das Antigen in Form von *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Protein (siehe 3.4.3) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen und Wechseln des Reaktionsgefäßes wurde gebundenes Antigen mit 50 µl SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und die Eluate durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

Immunpräzipitationsexperimente wurden durchgeführt, um zu testen, ob Antikörper ihr Antigen in Zellextrakten unter physiologischen Bedingungen erkennen. Die Durchführung erfolgte analog zum RIPA außer, daß Zellextrakte anstelle von *in vitro* translatierten Proteinen verwendet wurden und der Nachweis der präzipitierten Proteine durch SDS-PAGE und anschließendes Western-Blotten mit spezifischen Antikörpern erfolgte.

3.3.6 Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätschromatographie zur Reinigung von SMN-Komplexen folgte dem Prinzip der Immunpräzipitation. Allerdings wurde in diesem Fall affinitätsgereinigter, monoklonaler Antikörper 7B10 mittels Dimethylpimelimidate (DMP, Sigma) kovalent an ProteinA-Sepharose (Amersham-Pharmacia) gekoppelt (2 mg Antikörper/1 ml Sepharose). Die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben

durchgeführt. Für die Reinigung von SMN-Komplexen wurden vorgereinigte Zellextrakte mehrfach über die 7B10-Säule geladen und die Säule anschließend mehrfach mit IP-Puffer gewaschen. Gebundene Komplexe wurden mit 100 mM Glycine (pH 2,3) eluiert und sofort mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Nach zweifachem Waschen in TCA-Waschpuffer wurden die präzipitierten Proteine in 50 µl SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. Für eine Kontrollsäule wurde monoklonaler anti-Flag-Antikörper M2 (Sigma) ebenfalls mittels DMP kovalent an ProteinA-Sepharose gekoppelt (2 mg Antikörper/1 ml Sepharose).

3.4 Biochemische Methoden

Alle Protein-biochemischen Standardmethoden (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)), Coomassie- bzw. Silberfärbung von Proteingelen, TCA-Präzipitation, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation etc.) wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzung der wichtigsten Puffer (SDS-PAGE-Probenpuffer, SDS-PAGE-Laufpuffer).

3.4.1 Proteinexpression

Für die Expression von rekombinanten Proteinen oder Proteinfragmenten wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte entweder in die *E. coli* Stämme DH5 α (bei pGEX5X-1-Konstrukten) oder BL21(DE3) (bei pET-Konstrukten) transformiert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die 1,5 l Kulturen mit 0,2 mM IPTG (pGEX5X-1-Konstrukte) oder 1 mM IPTG (zzpET21a/ppet21a/pET28a-Konstrukte) induziert und für 5h bei 25°C inkubiert. Das Ernten der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation. Zum Zellaufschluß wurden die Pellets zunächst in Lyse-Puffer (500 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂) resuspendiert und dann durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach erneutem Zentrifugieren (25000 g, 1h, 4°C) wurden

die Überstände entweder direkt in flüssigem Stickstoff (bei zz-Fusionsproteinen) schockgefrostet oder weiter aufgearbeitet (GST-, His-Fusionsproteine, siehe unten).

3.4.2 Affinitätsreinigung von GST-, His-, zz-Fusionsproteinen

Zur Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden die jeweiligen *E. coli* Extrakte mit Glutathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia) für 1h bei 4°C inkubiert. Die Waschschritte erfolgten mit Waschpuffer (300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM MgCl₂) und die Elution mit 10 mM Glutathion in 200 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM MgCl₂. Die eluierten Proteine wurden gegen 200 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ dialysiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Für die Reinigung von His-Fusionsproteinen wurden die jeweiligen *E. coli* Extrakte mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen) für 4h bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen mit 300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ wurden gebundene Proteine mit 150 mM Imidazol in 300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ eluiert, gegen 200 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ dialysiert und in N₂ weggefroren. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. durch Western-Blotten.

3.4.3 Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation

Zur gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation von SMN, SIP1, Gemin3/dp103, Gemin4/GIP1, unrip, p175 und der Sm-Proteine wurde das „TNT-T7 coupled Transcription/Translation Assay“ der Firma Promega verwendet. Die zur Translation verwendeten Konstrukte enthielten alle einen T7 Promoter und leiteten sich von pET21a, pET28a oder pBluescriptII KS(-) ab. Zur radioaktiven Markierung wurde [³⁵S]-Methionin verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1 µl	Plasmid-DNA (0,1-1 µg/µl)
1 µl	[³⁵ S]-Methionin (10 µCi/µl)
0,5 µl	Rnasin (Promega)
7,5 µl	TNT-T7 Quick Reticulocyte Lysate (Promega)

Die Reaktion wurde für 2h bei 30°C inkubiert und in N₂ weggefroren. Ein Aliquot der Reaktion wurde durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

3.4.4 *In vitro* Bindungsexperimente

Für Bindungsexperimente wurden eine Komponente jeweils rekombinant als GST- oder zz-Fusion exprimiert und immobilisiert, während die anderen Komponenten in Form von *in vitro* translatierten Proteinen zugegeben wurden. Im Falle von zz-Fusionen wurden *E. coli* Extrakte, die 1-2 µg des jeweiligen zz-fusionierten Proteins bzw. Proteinfragments enthielten, mit 30 µl IgG-Sepharose (Amersham-Pharmacia) für 1h bei RT in einem Überkopfschüttler inkubiert. Im Falle von GST-Fusionen wurden 1-2 µg des jeweiligen, gereinigten Polypeptides mit 30 µl Glutathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia) ebenfalls für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Bindungspuffer (300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂) und Zugabe der *in vitro* translatierten Proteine (5 µl) wurde die Reaktion für 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit Bindungspuffer und Wechseln des Reaktionsgefäßes wurden gebundene Proteine mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie.

3.4.5 Präparation von HeLa-Zellextrakten

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

3.4.5.1 *Präparation von nukleären HeLa-Zellextrakten*

5×10^{10} HeLa Zellen (Celltech) wurden in PBS (pH 7,4) gewaschen und pelletiert. Nach Resuspension im fünffachen Pelletvolumen mit Roeder A Puffer (10 mM KCl, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.9), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) wurden die Zellen für 10 min gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im zweifachen Pelletvolumen Roeder A Puffer erfolgte der Zellaufschluß durch 10 Pistillstöße in einem Glashomogenisator (Douncer). Die Kerne wurden vom Zytoplasma durch Zentrifugation in einem Ausschwingrotor bei 1000 g für 10 min ($4^\circ C$) getrennt. Nach Resuspension des Pellets (Kerne) in Roeder C Puffer (420 mM KCl, 10 mM Hepes/KOH (pH 7.9), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin, 0,5 mM PMSF; 3ml/ 10^9 Zellen) wurden die Kerne durch 15 Pistillstöße im Douncer aufgeschlossen. Diese Suspension wurde dann für 30 min auf Eis gerührt und zentrifugiert (25000 g, 30 min, $4^\circ C$). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde 2,5 h gegen Roeder D Puffer (100 mM KCl, 20 mM Hepes/KOH (pH 7.9), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 20 % (v/v) Glycerin, 0,5 mM PMSF) dialysiert und in N_2 weggefroren.

3.4.5.2 *Präparation von zytosolischen HeLa-Zellextrakten*

Der zytosolische Überstand aus 3.4.5.1 wurde mit n-Heptan überschichtet, zentrifugiert (25000 g, 1h, $4^\circ C$) und die wäßrige Phase mit 15 % $(NH_4)_2SO_4$ präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (25000 g, 1h, $4^\circ C$) wurde der Überstand 6 h gegen 75 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM $MgCl_2$, 5% Glycerin dialysiert und in N_2 weggefroren.

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

3.4.6 Reinigung von zytosolischen SMN-Komplexen

Die biochemische Reinigung und Charakterisierung von zytosolischen SMN-Komplexen wurde bei 4°C mit dem Sprint System der Firma PE Biosystems durchgeführt. Alle Säulenmaterialien wurden als fertig gepackte Säulen von Amersham-Pharmacia bezogen.

3.4.6.1 Analytische Reinigung von CSCI

Zytosolische HeLa-Zelleextrakte wurden wie in 3.4.5 beschrieben hergestellt. Für die analytische Reinigung von SMN-Komplexen wurden zunächst 20 ml dieses Extraktes über eine HiTrap Q XL-Säule (Säulenvolumen: 1ml, Flußrate: 1 ml/min) geladen, die mit Ladepuffer (75 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerin) equilibriert worden war. Es wurde dann mit 10 ml des gleichen Puffers gewaschen und gebundene Proteine mit einem Salzgradienten von 75 mM bis 1 M NaCl (Gradientenvolumen: 20 ml) eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1ml. Aliquots (200 µl) der Totalen, des Durchfluß und jeder Fraktion wurden mit 20% TCA präzipitiert und in 30 µl SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. Die Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blotten mit anti-SMN und anti-SIP1 Antikörpern ergab, daß beide Proteine bei 380-420 mM von der Säule ko-eluierten. Diese Komplexe wurden mit Q-Eluat bzw. CSCI (für Cytosolic SMN Complex I) bezeichnet.

3.4.6.2 Präparative Reinigung von CSCI

Für die präparative Reinigung von CSCI wurden 500 ml zytosolischer HeLa-Zelleextrakt (ca. 1×10^{11} Zellen) über eine HiPrep Q XL Säule (Säulenvolumen: 20 ml, Flußrate: 4 ml/min) fraktioniert. Die Säule war mit Ladepuffer equilibriert worden und wurde nach Beladen mit 250 ml Puffer WPA (300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerin) gewaschen. Die Elution von CSCI erfolgte mit 80 ml 400 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerin. Die eluierten Komplexe wurden sofort in flüssigem N₂ schockgefrostet.

3.4.6.3 Analytische Reinigung von CSCII

Zur analytischen Reinigung des CSCII-Komplexes wurde der Durchlauf der HiTrap Q XL-Säule (3.4.6.1) über eine HiTrap SP XL (Säulenvolumen: 1 ml, Flußrate: 1 ml/min) geladen und in exakt gleicher Weise wie in 3.4.6.1 beschrieben fraktioniert und analysiert. Es zeigte sich, daß SMN und SIP1 bei 340-380 mM NaCl ko-eluierten. Diese Komplexe wurden als SP-Eluat bzw. CSCII bezeichnet.

3.4.6.4 Präparative Reinigung von CSCII

Für die präparative Isolierung von CSCII wurden die 500 ml Durchlauf der Reinigung von CSCI (3.4.6.2) ebenfalls über eine HiTrap SP XL geladen, die mit Ladepuffer equilibriert worden war. Nach Waschen mit 20 ml Puffer WPB (250 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerin) erfolgte die Elution von CSCII mit 4 ml 370 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerin. Die eluierten Protein wurden in N₂ weggefroren.

3.4.6.5 Gelfiltration von zytosolischen SMN-Komplexen

Für die Analyse von nicht fraktioniertem, zytosolischem HeLa-Zellextrakt sowie der vorgereinigten zytosolischen SMN-Komplexe CSCI und CSCII mittels Gelfiltration wurde eine Superose 6 HR 10/30 Säule (Säulenvolumen: 24 ml, Flußrate: 0,3 ml/min) verwendet. Es wurden jeweils 300 µl Extrakt bzw. vorgereinigte SMN-Komplexe auf die Säulen geladen. Die Equilibrierungs- bzw. Elutionsschritte erfolgten entweder mit Ladepuffer (zytosolischer Extrakt) oder mit Puffer WPA (vorgereinigte SMN-Komplexe). Es wurden insgesamt 40 Fraktionen (je 1 ml) gesammelt. Nach TCA-Präzipitation der kompletten Fraktionen wurden die Protein Pellets in 50 µl SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert und durch SDS-PAGE und anschließendes Western-Blotten mit SMN- und SIP1-spezifischen Antikörpern analysiert.

Zur Bestimmung der molekularen Größen der einzelnen Komplexe wurde ein Mischung von Proteinen bekannter Größe (High Molecular Weight Standard, Amersham-Pharmacia) unter identischen Bedingungen fraktioniert.

3.4.7 Dichtegradientenzentrifugation

Die analytische Fraktionierung von nukleoplasmatischen SMN-Komplexen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Der verwendete Gradient reichte von 15-45 % Saccharose (w/v) in 150 KCl, 50 Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, hatte ein Volumen von 10 ml. Die Präparation der HeLa-Zellkernextrakte erfolgte wie in 3.4.6 beschrieben, außer daß gegen Roeder D Puffer ohne Glycerin dialysiert wurde. 300 µl dieser Extrakte wurden auf die Gradienten geladen. Die Zentrifugation erfolgte für 21 h bei 4°C und 41000 rpm in einem SW41 Ti Rotor (Beckman). Nach Beendigung des Laufes wurden 400 µl Aliquots abgenommen, TCA präzipitiert und in SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließendes Western Blotten.

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

3.4.8 Das *Xenopus laevis* Oozyten-System

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

3.4.8.1 Präparation der Oozyten

Zur Entnahme der Oozyten wurden Frösche durch Unterkühlung auf Eis für 45 min narkotisiert. Dann wurden nacheinander die Bauchhaut und die darunter liegende

Muskelschicht durch zwei ca. 0,5–1 cm lange Schnitte durchtrennt und der Bauchraum geöffnet. Das freiliegende Ovar konnte mit einer Pinzette aus dem Bauchraum gezogen werden und wurde an gewünschter Stelle mit einer Schere abgeschnitten. Die Operationswunde wurde mit 2-3 Stichen vernäht.

Für Injektionsstudien ist es notwendig, daß das die Oozyten umgebende Bindegewebe entfernt wird. Dazu wurde das Ovar in einer Kollagenase-Lösung (2 mg Kollagenase/ml Barth-Puffer ohne Ca^{2+}) für 6h leicht geschwenkt. Anschließend wurde ein Mal mit Barth-Puffer (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 15 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1,4 mM NaHCO_3 , 0,3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,41 mM CaCl_2 , 0,82 mM MgSO_4) gewaschen.

3.4.8.2 *Mikroinjektion in Xenopus laevis Oozyten*

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

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

3.4.8.3 *Präparation von Oozytenextrakten*

Für die Immunpräzipitation von RNA-Protein-Komplexen wurden die injizierten Oozyten in 300 µl PBS (pH 7,4) durch Pipettieren homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugieren pelletiert und der klare Überstand in ein

neues Reaktionsgefäß überführt. Die Immunpräzipitation wurde dann wie in 3.3.5 beschrieben durchgeführt.

3.4.8.4 Präparation von *Xenopus laevis* Eiextrakten

Die *Xenopus laevis* Eiextrakte wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Erich Nigg (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Diese Extrakte wurden nach einem Protokoll von Murray (1991) hergestellt.

3.4.9 *In vitro* Rekonstitution der U snRNP Zusammenlagerung

Für die *in vitro* Rekonstitution der Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne wurde U1 snRNA *in vitro* transkribiert und mit α -[³²P]-UTP markiert (siehe 3.1.5). Die gereinigte RNA wurde in ddH₂O zu einer spezifischen Radioaktivität von 20000 cpm/ μ l resuspendiert. Folgende Rekonstitutionsansätze wurden für 20 min bei 20° C inkubiert:

1 μ l U1 snRNA (20000 cpm/ μ l)
2 μ l *Xenopus laevis* Eiextrakt
1 μ l *E. coli* tRNA (1 μ g/ μ l)
ad 10 μ l RK-Puffer

Der RK-Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

200 mM NaCl
25 mM Tris (pH 7,5),
5 mM MgCl₂

Um die Proteinkomposition der gebildeten RNA-Protein Komplexe zu analysieren („Supershift-Analyse“), wurden die Rekonstitutionsansätze wie üblich inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l der jeweiligen Antikörper (1 μ g/ μ l) zugegeben und für weitere 10 min bei 20° C inkubiert. Um den Einfluß von Proteinfaktoren auf die Bildung der Sm-core-Domäne zu testen, wurden die Reaktionsansätze mit den jeweiligen Antikörpern (1 μ g/ μ l) für 10 min bei 20° C prä-inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe der RNA gestartet.

Um die Ausbildung der Sm-core-Domäne zu analysieren, wurden 5 µl der Rekonstitutionsansätze mit 5 µl Probenpuffer (16% (v/v) Glycerin, 10 mg/ml Heparin, 0,025% (w/v) Xylencyanol, 0,025% (w/v) Bromphenolblau) vermischt. Anschließend wurden die Ansätze in nativen Polyacrylamidgelen (5% Polyacrylamid [acrylamid/N,N'-methylen bisacrylamid, 80:1 (w/w)], 4% Glycerin in 0,5x TBE) getrennt. Die Gele wurden bei 25 mA für 5 h gefahren und die aufgetrennten Komplexe durch Autoradiographie nachgewiesen.

3.4.10 Identifikation von Proteinen mittels MALDI-TOF

Zur Identifikation von Proteinen wurden die entsprechenden Banden aus Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gelen ausgeschnitten und direkt im Gel mit Trypsin oder LysC nach Eckerskorn und Lottspeich (1989) verdaut. Die massenspektroskopische Analyse der Peptidfragmente erfolgte mittels eines „Bruker Reflex III MALDI – time of flight“ Massen-Spektrometer (Bruker-Franzen, Bremen) und wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Die ermittelten Peptidmassen wurden dann für Datenbankanalysen mit dem Programm MSFIT (<http://prospector.ucsf.edu>) verwendet.