

4 Ergebnisse

Experimentelle Befunde deuteten darauf hin, daß SMN *in vivo* in mindestens einen makromolekularen Komplex im Zytosol inkorporiert ist (Liu *et al.*, 1997). In der Annahme, daß SMN seine Funktion während der U snRNP Biogenese in Form dieser Komplexe ausübt, wurde versucht, solche SMN-Komplexe durch eine Kombination aus biochemischer Fraktionierung und Immunaффinitätschromatographie zu isolieren und ihre Komponenten zu bestimmen. Eine detaillierte Kenntnis der Protein-Zusammensetzung der SMN-Komplexe sollte erste wichtige Hinweise darauf geben, an welchen Schritten der U snRNP Zusammenlagerung SMN beteiligt ist.

4.1 Charakterisierung eines monoklonalen SMN-spezifischen Antikörpers

Für die Reinigung von SMN-Komplexen durch Immunaффinitätschromatographie wurde zunächst ein monoklonaler anti-SMN Antikörper hergestellt (siehe 3.3.1). Dies erfolgte durch Injektion von rekombinantem His-SMN in BALB/c Mäuse und anschließender Fusion isolierter Milzzellen mit PAIB₃AG81 Myelomazellen. Antikörper produzierende Hybridoma-Zellen konnten nach Vereinzelung durch Western-Blotten der Zellüberstände gegen rekombinantes GST-SMN identifiziert werden. Ein Zellklon mit der Nummer 7B10 wurde im Detail charakterisiert (Abb. 4.1). Die folgenden Experimente zeigten, daß der 7B10 Antikörper monospezifisch für SMN ist und für eine Immunaффinitätschromatographie verwendet werden konnte:

In Western-Blots erkannte der 7B10 Antikörper sowohl rekombinantes His-SMN als auch SMN in HeLa-Totalextrakten (Abb. 4.1 A, Spuren 1 und 2). Um das Epitop des 7B10 Antikörpers zu bestimmen, wurden gereinigte, rekombinant exprimierte GST-SMN-Fragmente einer Western-Blot-Analyse unterzogen. 7B10 erkannte alle SMN-Fragmente, die die ersten 30 Aminosäuren von SMN enthielten (Abb. 4.1 B, Spuren 5, 6 und 7). Dagegen reagierte das

GST-Fragment SMN-30/105, dem diese Aminosäuren fehlten, nicht mit dem Antikörper (Spur 8). Diese Ergebnisse zeigten, daß das Epitop des 7B10 Antikörper innerhalb der ersten 30 Aminosäuren liegt.

Als nächstes wurde überprüft, ob der 7B10 Antikörper freies SMN in Lösung binden kann und daher für eine Immunaффinitätschromatographie verwendet werden konnte (Abb. 4.1 C). Der 7B10 Antikörper oder ein Kontrollantikörper gegen das Flag-Peptid (Sigma) wurden an ProteinG-Sepharose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem SMN inkubiert. Nach mehreren Waschschriften wurden die gebundenen Proteine mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie detektiert. Nur der 7B10 Antikörper, nicht aber der anti-Flag Antikörper immunpräzipitierte effizient SMN (Spuren 3 und 2). Wurde eine analoge Immunpräzipitation mit HeLa-Totalextrakten durchgeführt, konnte SMN quantitativ nur in den Präzipitaten des 7B10 Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.1 D, Spur 3), nicht aber in der Kontrolle (Spur 2).

Schließlich konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden, daß der 7B10 Antikörper SMN vor allem im Zytoplasma und in nukleären Gems von COS-1 Zellen detektierte (Abb. 4.2 B, Bild 2). Ein monospezifisches Antiserum gegen das SMN interagierende Protein SIP1 (Abb. 4.2 A, Spur 1) zeigte eine ähnliche Verteilung für SIP1 (Abb. 4.2 B, Bild 1 und 3). Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen, da eine solche Verteilung von SMN und SIP1 bereits beschrieben war (Liu *et al.*, 1997). Zusammengefaßt zeigten diese Befunde, daß der 7B10 Antikörper SMN effizient in zellulären Extrakten erkennt und daher für die Affinitätsreinigung von SMN-Komplexen geeignet sein sollte.

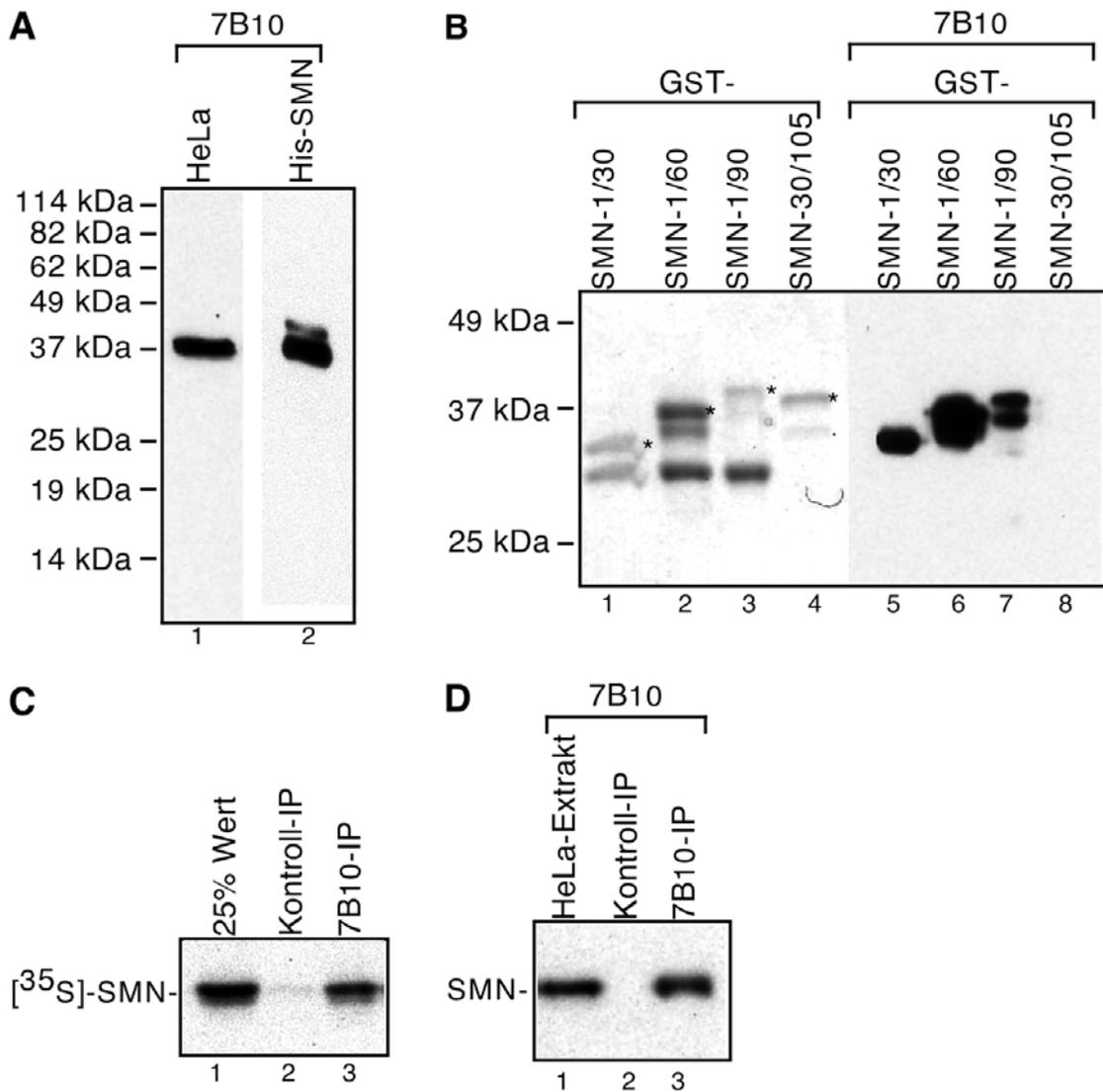


Abb. 4.1: Charakterisierung des monoklonalen SMN-spezifischen Antikörper 7B10.

A. Der 7B10 Antikörper erkennt spezifisch humanes SMN. 0,1 µg rekombinantes His-SMN (Spur 1) oder 10 µg HeLa-Totalextrakt (Spur 1) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. SMN wurde durch Western-Blot-Analyse mit dem 7B10 Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung nachgewiesen. B. Das Epitop des 7B10 Antikörpers liegt innerhalb der ersten 30 Aminosäuren von SMN. Je 0,1-0,3 µg verschiedene GST-SMN-Deletionsfragmente (Spuren 5-8) wurden einer Western-Blot-Analyse mit 7B10 unterzogen. Parallel dazu wurden die Proteinkonstrukte durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Spuren 1-4, mit Sternchen markiert). C. Der 7B10 Antikörper erkennt SMN in Lösung. [³⁵S]-markiertes SMN wurde entweder durch den 7B10 Antikörper (Spur 3) oder einen anti-Flag Antikörper (Spur 2) immunpräzipitiert. Präzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie nachgewiesen. In Spur 1 sind 25% der eingesetzten SMN-Menge geladen. D. Der 7B10 Antikörper kann SMN aus HeLa-Totalextrakten immunpräzipitieren. Es wurde wie in C vorgegangen. Der Nachweis präzipitierter Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit 7B10. In Spur 1 ist SMN im Ausgangsmaterial detektiert.

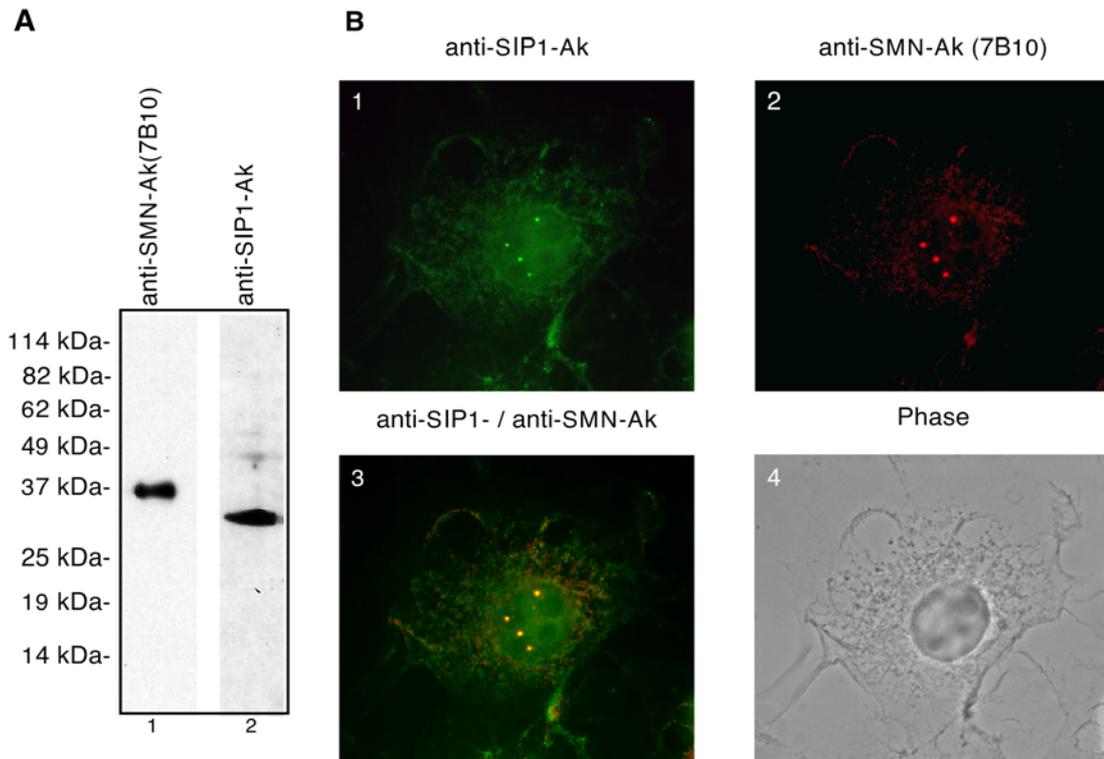


Abb. 4.2 Der 7B10 Antikörper detektiert SMN im Zytoplasma und Gems.
 A. Der 7B10 Antikörper und ein anti-SIP1 Serum erkannten bei einer 1:1000 Verdünnung im Western-Blot in 10 µg HeLa-Extrakt spezifisch SMN (Spur 1) und SIP1 (Spur 2). Gleichmaßen verdünnt wurden sie für die Immunfluoreszenz-mikroskopie verwendet. B. (1) Der anti-SIP1 Antikörper detektierte SIP1 im Zytoplasma und in Gems von COS1-Zellen. Als Sekundärantikörper wurde anti-rabbit IgG TRITC verwendet. (2) Eine ähnliche Verteilung wurde für SMN mit Hilfe des 7B10 Antikörpers beobachtet. Anti-mouse IgG FITC diente als Sekundärantikörper. (3) Die Kombination der beiden Bilder zeigte, daß SMN und SIP1 im Zytoplasma und in Gems ko-lokalisieren. (4) Phasenkontrastaufnahme.

4.2 Biochemische Trennung von zytosolischen SMN-Komplexen

4.2.1 SMN ist *in vivo* in mehrere makromolekulare Komplexe integriert

Für die Reinigung von SMN-Komplexen war es zunächst von prinzipiellem Interesse zu wissen, ob SMN in zytoplasmatischen und nukleären HeLa-Zellextrakten in Form von einem oder mehreren Komplexen vorliegt, die sich biochemisch trennen lassen.

Um putative nukleäre SMN-Komplexe zu identifizieren, wurde HeLa-Zellkernextrakt auf einem 15%-45% Sucrose-Gradient aufgetrennt und jede Fraktion des Gradienten durch Western-Blotten mit dem 7B10 Antikörper getestet (Abb. 4.3 A). Zwei SMN enthaltende Komplexe mit Sedimentationswerten von 18S und 20S konnten identifiziert werden. Wurde die gleiche Analyse mit einem SIP1-spezifischen Serum durchgeführt, konnte eine exakte Ko-Sedimentation von SIP1 mit SMN beobachtet werden (Abb. 4.3 A). Diese Experimente zeigten, daß unter den gegebenen Extraktbedingungen mindestens zwei makromolekulare SMN-Komplexe in nukleären HeLa-Zellextrakten vorhanden sind, die beide das SMN interagierende Protein SIP1 enthalten.

Wurden ähnliche Zentrifugationsexperimente mit zytosolischen HeLa-Zellextrakten durchgeführt, war SMN über den gesamten Gradient verteilt (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die zytosolischen SMN-Komplexe weniger stabil sind und während der 20-stündigen Zentrifugation dissoziieren. Eine Möglichkeit, diese technischen Probleme zu umgehen, war es, die zytosolischen SMN-Komplexe durch Gelfiltrationsexperimente zu analysieren (Abb. 4.3 B). Dazu wurde zytosolischer Extrakt auf eine Superose 6 HR Säule geladen, die die Auftrennung von Proteinkomplexen in der Größenordnung von 5×10^4 bis 5×10^6 Da erlaubt. Jede Fraktion des Säulenlaufes wurde durch SDS-PAGE und anschließendes Western-Blotten mit SMN- und SIP1-spezifischen Antikörpern getestet. Es zeigte sich, daß beide Proteine in einem breiten Größenbereich eluierten, wobei Elutions-maxima bei den molekularen Größen ≤ 670 kDa und ≈ 300 kDa beobachtet wurden (obere und untere Spur). Zusätzliche detektierte Proteinbanden (mit Sternchen markiert) entsprechen nicht SMN und SIP1, sondern resultierten von nicht-spezifischen Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper. Dies war eindeutig, da es nicht gelang, Proteine dieser Größe mit den jeweiligen Antikörpern zu immunpräzipitieren (Daten nicht gezeigt). Zusammengefaßt zeigten diese Experimente erstmals, daß aufgrund

biochemischer Kriterien mindestens zwei SMN-Komplexe in zytosolischen und nukleären HeLa-Extrakten unterschieden werden können.

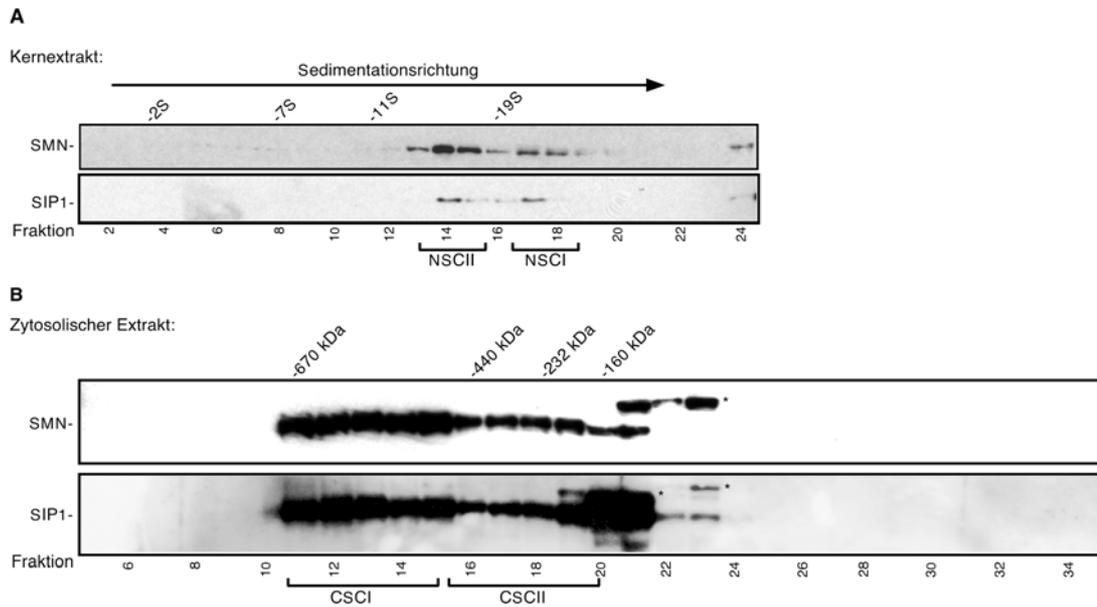


Abb. 4.3 Zwei SMN-Komplexe können in nukleären und zytosolischen HeLa-Zellextrakten nachgewiesen werden.

A. Nukleäre SMN-Komplexe (NSCI und NSCII) sedimentieren bei 18S und 20S. 300 μ l HeLa-Zellkernextrakt wurden durch 15%-45% Sucrosegradienten aufgetrennt und gesammelte Fraktionen durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit dem 7B10 Antikörper und einem SIP1-spezifischen Antiserum untersucht. Die Zuordnung der S-Werte erfolgte über einen Referenzgradienten. B. Zytosolisches SMN ist in zwei Komplexe von ≤ 670 kDa und ≈ 300 kDa integriert. Die Trennung von 300 μ l zytosolischen HeLa-Zellextrakt erfolgte über eine Superose 6 HR Matrix. Die gesammelten Fraktionen wurden wie in A analysiert. Sternchen markieren Proteinbanden, die von unspezifischen Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper resultierten.

4.2.2 Zytosolische SMN-Komplexe können biochemisch getrennt werden

Wie Studien in *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt haben, erfolgt die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne von U snRNPs zu großen Teilen im Zytoplasma. Im folgenden wurde daher versucht, die zytoplasmatischen SMN-Komplexe zu isolieren und ihre putative Rolle während der Zusammenlagerung von U snRNPs zu beschreiben.

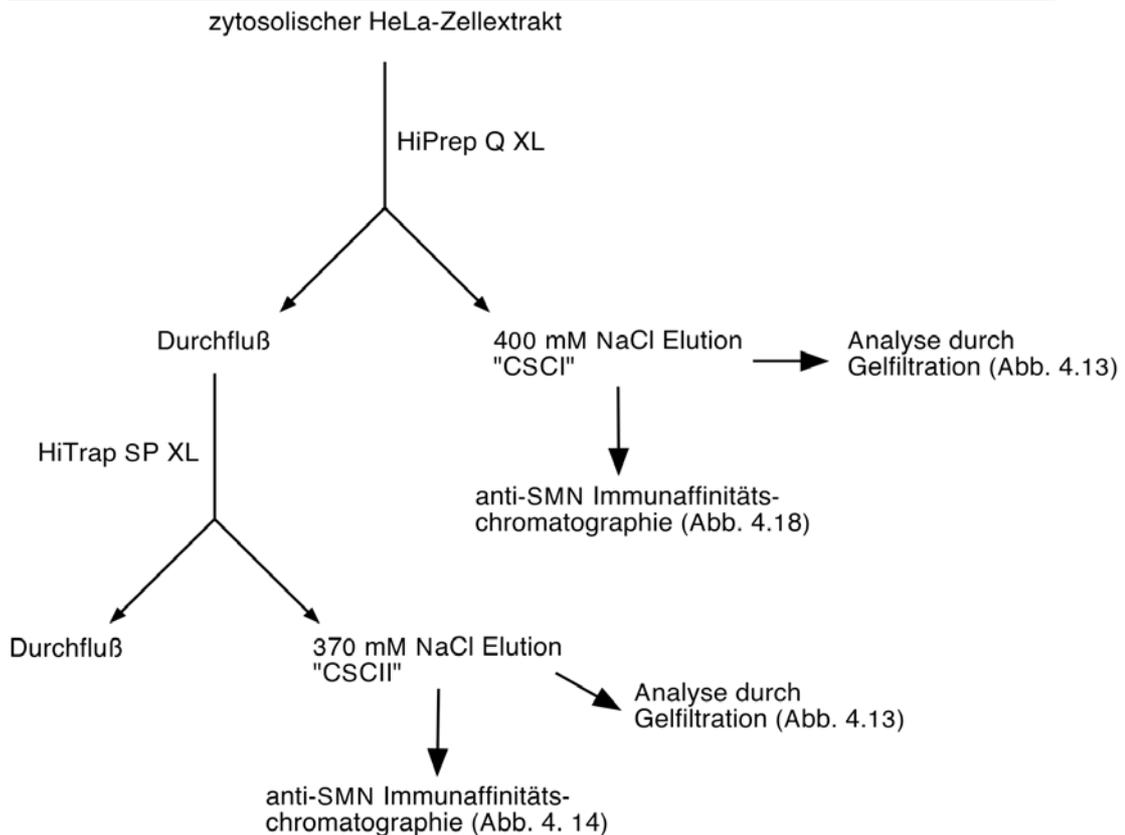


Abb. 5.4: Schema für die Reinigung zytosolischer SMN-Komplexe.

Dazu wurde ein Reinigungsschema entwickelt, das schematisch in Abb. 4.4 gezeigt ist. Alle Schritte der Reinigung wurden durch Western-Blotten gegen SMN und SIP1 verfolgt (siehe auch 3.4.6). Zuerst wurde zytosolischer Extrakt mittels einer HiPrep Q XL Anionenaustauscher Säule aufgetrennt. Die Elution von gebundenen, putativen SMN-Komplexen (Cytosolic SMN Complex I, CSCI) erfolgte mit 400 mM NaCl (Abb. 4.5 A, Spur 3). Allerdings wurde nicht der gesamte zytoplasmatische Anteil von SMN an die Säule gebunden. Ca. 30% der SMN-Menge konnte im Durchfluß detektiert werden und auch nach wiederholtem Laden des Extrakts über die HiPrep Q XL Matrix nicht an der Säule depletiert werden (vergleiche Spuren 1 und 2). Dies bedeutete, daß alle SMN-Komplexe mit einer negativen Ladung durch die HiPrep Q XL Säule in diesem ersten Fraktionierungsschritt isoliert worden waren. Im Gegensatz dazu band der SMN-Anteil, der sich noch im Durchfluß befand, komplett an eine HiTrap SP XL Kationenaustauscher Säule (vergleiche Spuren 4 und 5). Diese

SMN-Komplexe wurden mit 370 mM NaCl eluiert und als CSCII bezeichnet (Spur 6).

Um die Frage zu beantworten, ob CSCI und CSCII den Komplexen des zytosolischen Extrakts entsprachen, wurden die apparenten molekularen Größen von CSCI und CSCII durch Gelfiltration mit einer Superose 6 HR Säule bestimmt. Bemerkenswerterweise ko-migrierte CSCI exakt mit dem großen ≤ 670 kDa SMN-Komplex des zytosolischen Extrakts (vergleiche Abb. 4.5 B und 4.11 B, obere Bahnen), wohingegen CSCII dem kleineren ≈ 300 kDa SMN-Komplex entsprach (vergleiche Abb. 4.5 C und 4.11 B, obere Bahn). SIP1 ko-eluierte jeweils exakt mit SMN (Abb. 4.5 B und C, untere Bahn). Diese Ergebnisse zeigten, daß die beiden nachweisbaren, zytosolischen Komplexe während des Reinigungsprozesses strukturell intakt bleiben und durch das oben beschriebene, biochemische Reinigungsprotokoll getrennt werden können.

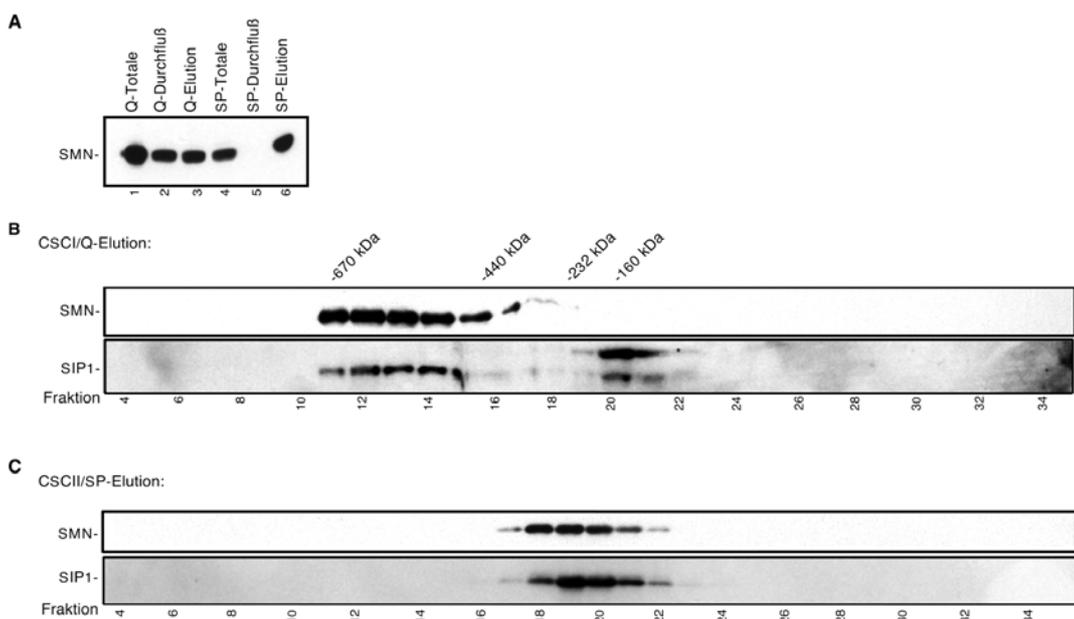


Abb. 5.5: Analyse der zytosolischen SMN-Komplexe.

A. Zytosolische SMN-Komplexe können durch Ionenaustauscherchromatographie voneinander getrennt werden. Die Spuren 1-3 zeigen den SMN-Anteil im Ausgangsmaterial, im Durchfluß und im Eluat einer HiPrep Q XL-Säule. In den Spuren 4-6 ist die SMN-Menge der entsprechenden Schritte einer HiTrap SP XL-Säule gezeigt. Für die Analyse wurden Aliquots jeden Reinigungsschritts durch SDS-PAGE getrennt und SMN durch Western-Blot-Analyse mit dem 7B10 Antikörper nachgewiesen. B. SMN und SIP1 des Q-Eluats sind Teil eines makromolekularen Komplexes von ≤ 670 kDa. Die Analyse der Eluate erfolgte durch Gelfiltration mit einer Superose 6 HR Matrix. Die Detektion von SMN und SIP1 erfolgte durch Western-Blot-Analyse. Sternchen zeigen unspezifische Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper. C. Der von einer HiTrap SP XL Säule eluierte SMN-Komplex hat ein Molekulargewicht von ≈ 300 kDa. Die Analyse der Fraktionen erfolgte wie ein B.

4.3 Die Protein-Zusammensetzung von zytosolischen SMN-Komplexen

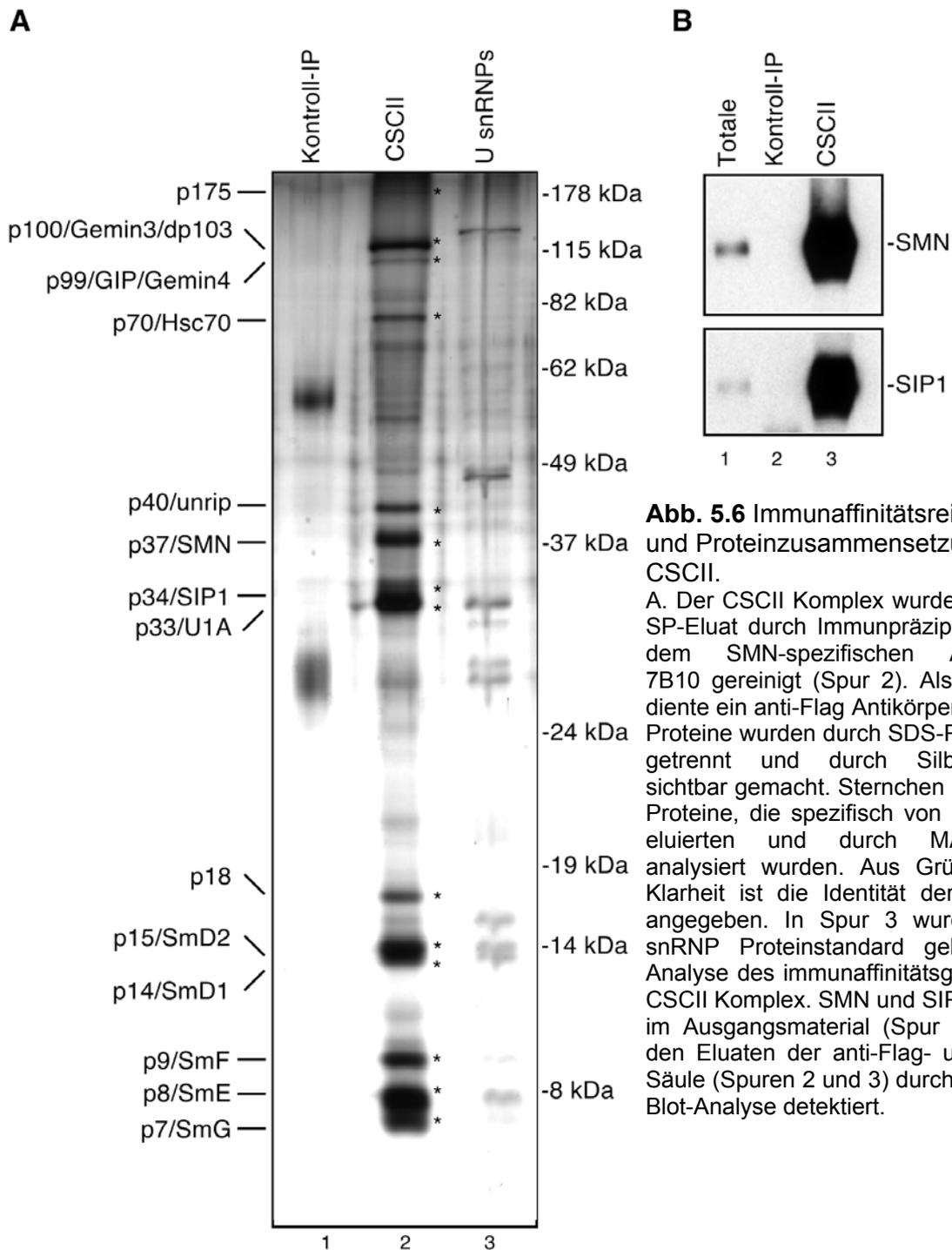
Mit den obigen Ergebnissen waren die Voraussetzungen geschaffen, um durch eine anti-SMN-Immunaффinitätschromatographie die Protein-Zusammensetzung der beiden zytosolischen SMN-Komplexe zu bestimmen. Dazu wurden der anti-SMN Antikörper 7B10 kovalent an eine ProteinG Matrix gekoppelt (siehe 3.3.6). Zytosolische Fraktionen, die CSCI und CSCII enthielten, wurden dann an diesen Säulen gereinigt und gebundene Proteine mit 100 mM Glycin (pH 2,3) eluiert. Als Kontrolle diente eine Säule, an die ein monoklonaler anti-Flag Antikörper immobilisiert war. Die eluierten Proteine wurden präzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

In Abb. 4.6 A ist die Protein-Zusammensetzung von CSCII gezeigt. CSCII besteht aus 14 prominenten Proteinen, die entsprechend ihrem apparenten Molekulargewicht mit p7, p8, p9, p14, p15, p18, p33, p34, p37, p40, p70, p99, p100 und p175 bezeichnet wurden (Spur 2). Keines dieser Proteine band an die Kontrollsäule (Spur 1), was nahelegte, daß alle Proteine, die von der 7B10 Säule eluiert wurden, entweder direkt oder indirekt mit SMN assoziiert sind. Die Protein-Zusammensetzung von CSCI konnte nicht bestimmt werden. Ein hoher Hintergrund sowohl in der Kontrolle als auch in der 7B10-Elution ließ die Identifizierung von spezifisch mit SMN-assoziierten Proteinen in diesem Fall nicht zu (Daten nicht gezeigt).

4.3.1 Identifizierung von Komponenten des CSCII Komplexes

In einem ersten Versuch, die Proteinkomponenten von CSCII näher zu charakterisieren, wurde eine Western-Blot-Analyse mit anti-SMN und anti-SIP1 Antikörpern durchgeführt (Abb. 4.6 B). Erwartungsgemäß konnten p34 und p38 als SIP1 und SMN identifiziert werden, während keines der beiden Proteine in der Kontroll-Elution zu detektieren war. (Spuren 1 und 2, obere und untere

Bahn). Dies zeigte, daß durch die Immunaффinitätschromatographie in der Tat SMN-Komplexe gereinigt wurden.



Die Reinigung präparativer Mengen von CSCII erlaubte die Identifizierung der anderen Komplexkomponenten. Dazu wurden die Protein-Banden aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten und im Gel mit Trypsin (p100 und p99) oder LysC (p175, p70, p40, p33, p18, p15, p14, p9, p8, p7) verdaut. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Friedrich Lottspeich (Max Planck Institut für Biochemie) wurden die Sequenzen der Peptidfragmente durch Massenspektroskopie (MALDI-TOF) bestimmt (Tabelle 4.1). Durch diese Vorgehensweise konnte p33 als das U1 snRNP spezifische Protein U1A identifiziert werden. Von diesem war bereits bekannt, daß es *in vivo* mit SMN assoziiert ist (Liu *et al.*, 1997).

P100 war identisch mit dem Protein Gemin3/dp103. Dieses Protein war kurz zuvor als neuer SMN interagierender Faktor beschrieben worden und gehört zur Klasse der sogenannten „DEAD-box“ ATP abhängigen RNA-Helikasen (Campbell *et al.*, 2000; Charroux *et al.*, 1999; Grundhoff *et al.*, 1999). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind durch insgesamt sieben Sequenzmotive charakterisiert, von denen eins die Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Alanin und Aspartat (DEAD) enthält (Abb. 4.7 C) (de la Cruz *et al.*, 1999). Gemin3/dp103 bindet an den C-Terminus von SMN und ko-lokalisiert mit SMN im Zytoplasma und in Gems (Charroux *et al.*, 1999).

Tabelle 4.1 Peptidsequenzen von neuen SMN interagierenden Proteinen.

Protein	Peptide	EST accesion No.	Protein accesion No.
p175	¹⁰¹ VVTEHALHQHTISTLHWSPRVK ¹²²	AK022748	BAB14222
	²⁷² RRGGGIDPTVK ²⁸²	(Nt 1-2223)	(As 1-741)
	⁴⁵¹ VGLYDTYSNKPPQISSTYHK ⁴⁷⁰	AL117665	CAB56035
	⁶¹⁶ TVIESPESPVTITEPYRTLSTGHTAK ⁶⁴¹	(Nt 871-	(As 291-
	⁷¹⁰ WLTSMQDHSRPPQ GK ⁷²⁴	4527)	1508)
	⁸⁴⁵ ARSLPLSTSLDHRSK ⁸⁶⁰		
GIP1/ Gemin4	¹⁰²⁴ DLYLSWGTVLERDGHYAVAAK ¹⁰⁴⁴		
	¹¹⁴¹ SSSYHTWNTGTEGPFVERVTAVWK ¹¹⁶⁵		
	¹³⁶¹ HASLQNSQRTVAEVQETLAEMIRQHQK ¹³⁹⁰		
	⁴² VGRPIVEALR ⁵¹	R55454	A1080150
	⁷⁷ VLQPHPVTPSDTETR ⁹¹	(Nt1870-	(As 510-
	¹⁸⁸ KYLPALDEFPHPPKR ²⁰²	3200)	1058)
³⁴⁵ RSSQGTSYDSYRL ³⁴⁸	AF 303940	AAF35283	
⁴⁴⁵ RALFREPDVLRLLLETVIDVSTADRAIPESQIRQ ⁴⁷	(Nt 1-3200)	(As 1-1058)	

	574	KFLAQILTAFPALRF ⁵⁸⁹		
	653	KEFVLPFLRLDVEEVDLSLRI ⁶⁷³		
	831	MLSLLVVDVGNPEEVRL ⁸⁴⁸		
	1035	KSIAEGIGPEERR ¹⁰³⁵		
Gemin3/ dp103	238	QMLAVSATYPEFLANALTK ²⁵⁶	AF171063	AAF14544
	282	VVNSYPLAHK ²⁹¹		
	307	IPFNQALVFSNLHSR ³²¹		
Hsc70	615	HYTGPGDQTVBPQNGFVR ⁶³²		
	57	NQVAMNPTNTVFDK ⁷¹	Y00371	CAA68445
	89	HWPFMVVNDAGRPK ¹⁰²		
	138	TVTNAVVTVPAYFNDSQRQATK ¹⁵⁹		
	258	RAVRRLRTACERAK ²⁷¹		
	329	SQIHDIIVLVGGSTRIPK ³⁴⁵		
	362	SINDPEAVAYGAAVQAAILSGDK ³⁸⁴		
unrip	424	QTQTFTTYSNDNQPGLVLIQVYEGERAMTK ⁴⁵¹		
	105	TVDFQTQDSNYLLTGGQKDK ¹²²	AJ010025	CAB38041
	123	LLRIYDLNKPEAEPK ¹³⁷		
	219	SFEAPATINSASLHPEK ²³⁵		
	236	EFLVAGGEDFK ²⁴⁶		
	299	TYGLWKCVPEEDSGELAKPK ³¹⁹		

Weder durch MALDI-TOF, noch durch direktes Sequenzieren konnten

Tabelle 4.1: Peptidsequenzen neuer SMN-assoziiierter Proteine.

Gezeigt sind die Peptide der proteolytischen Verdaus von p175, Gemin3/dp103, GIP1/Gemin4, Hsc70 und unrip sowie die Zugangsnummern der EST-Klone, die durch Datenbankanalysen gefunden wurden.

Peptidsequenzen für p18 bestimmt werden, so daß die Identität dieses Proteins unbekannt blieb. Die Peptide der proteolytischen Verdaus von p40 und p70 konnten dagegen den Proteinen „unr interagierendes Protein“ (unrip) und Hsc70 zugeordnet werden (Tabelle 4.1). Unrip ist durch das Vorhandensein von WD40 Motiven charakterisiert und in die m⁷G-Cap unabhängige Translation von viralen mRNAs involviert (Hunt *et al.*, 1998). Es ist ebenfalls als ein Bindungspartner eines Serin-Threonine Kinase Rezeptor assoziierten Proteins (STRAP) beschrieben worden (Datta *et al.*, 1998). Bei Hsc70 handelt es sich um das „Heat shock cognate protein 70“, welches eine gut charakterisierte Komponente der zellulären Proteinfaltungsmaschinerie ist (Johnson und Craig, 1997). Durch eine NCBI-Datenbankanalyse konnten den Peptidsequenzen von p175 und p99 hypothetische Protein-Fragmente von 130 kDa und 50 kDa und

entsprechende partielle cDNA-Klone zugeordnet werden (Tabelle 4.1, Zugangsnummern: AL117665, R55454).

4.3.2 Charakterisierung der cDNAs von p175 und p100

Bei p175 und p99 handelte es sich um bis dahin noch nicht beschriebene Proteine. Als Grundlage für eine eingehende Charakterisierung dieser beiden Proteine wurden daher zunächst die kompletten cDNAs durch 5'-RACE bestimmt (siehe 3.1.4).

Im Falle von p175 konnte ein 0,6 kb großes DNA Fragment aus einer humanen, fötalen cDNA-Bibliothek durch PCR amplifiziert werden, das mit dem 5'-Ende des partiellen cDNA Klons aus der NCBI-Datenbank überlappte. Diese Sequenz-Informationen erlaubten die Identifizierung von zwei anderen, überlappenden cDNA-Klonen in der Datenbank, anhand derer ein offener Leserahmen konstruiert wurde, der für ein Protein von ca. 175 kDa kodierte (Abb. 4.7 A). Verschiedene Experimente zeigten, daß diese Sequenz in der Tat die korrekte und komplette p175 cDNA ist:

Erstens konnten Peptide des proteolytischen Verdaus dem extremen N-Terminus von p175 zugeordnet werden, der aus der cDNA abgeleitet wurde. Zweitens wird bei der *in vitro* Translation der cDNA ein Protein von ca. 175 kDa gebildet. Drittens wurde in der Zwischenzeit ein neuer partieller cDNA Klon in die Datenbank eingegeben (Zugangsnummer: AK022748), der den kompletten 5'-Terminus umfaßt und mit dem ursprünglichen cDNA Klon (Zugangsnummer: AK117665) überlappt.

Das komplette 5'-Ende der p99 cDNA wurde ebenfalls über 5'-RACE charakterisiert. Mit Primern, die zum 3'-Ende der bekannten Sequenz von p99 komplementär waren, wurde analog zur p175 cDNA ein DNA-Fragment amplifiziert und sequenziert. Ausgehend von diesen Informationen konnte mit neuen Primern eine komplette cDNA amplifiziert werden, die für ein Protein von 1058 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 120 kDa kodierte (Abb. 4.7 B). In SDS-PAGE-Gelen läuft das Protein allerdings

unterhalb von 100 kDa und zeigt damit ein aberrantes Laufverhalten. Die gleiche Beobachtung wurde von Charroux et al., (2000) gemacht, die p99 ebenfalls als ein SMN-assoziiertes Protein identifizierten und es Gemin4 nannten (Charroux *et al.*, 2000).

```

1      MGQEPRTLPPSPNWYCARCSDAVPGGLFGFAARTSVFLVRVPGGAGESPG 50
51     TPPFRVIGELVGHTEVSGFTFSHPGQYNLCATSSDDGTVKIWDVETKT 100
101    VVTEHALHQHTISTLHWSRVKDLIVSGDEKGVVFCYWFNRNDSQHLFIE 150
151    PRTIFCLTCSPHHEDLVAIGYKDGIVVIIDISKKGEVIHRLRGHDDEIHS 200
201    IAWCPLPGEDCLSINQEETSEEAEITNGNAVAQAPVTKGCYLATGSKDQT 250
251    IRIWSCSRGRGMILKLPFLKRRGGIDPTVKERLWTLHWPSNQPTQLV 300
301    SSCFGGELLQWDLTQSWRRKYTLFSASSEGNHSRIVFNLCPLOTEDDKQ 350
351    LLLSTSMDRDVKCWDIATLECSWTLPSLGGFAYSALAFSSVDIGSLAIGVG 400
401    DGMIRVWNTLSIKNNYDVKNFWQGVKSKVTALCWHPTKEGCLAFGTDDGK 450
451    VGLYDTYSNKPPQISSSTYHKKTVYTLAWGPPVPPMSLGGEGDRPSLALYS 500
501    CGGEGIVLQHNPKLSGEAFDINKLIRDTNSIKYKLPVHTEISWKADGKI 550
551    MALGNEDGSIEIFQIPNLKLICTIQQHHKLVNTISWHHEHGSQPELSYLM 600
601    ASGSNNAVIYVHNLKTVIESSPESPVTITEPYRTLSGHTAKITSVAWSPH 650
651    HDGRLVSASYDGTAVQWDALREEPLCNFRGHQGRLLCVAVSPLDPDCIYS 700
701    GADDFCVHKWLTSMQDHSRPPQGGKKSIELEKKRLSQPKAKPKKKKPTLR 750
751    TPVKLESIDGNEEESMKENSGPVENGVSQEGEEQAREPELPCGLAPAVS 800
801    REPVICTPVSSGFEEKSVTINNKVILLKKEPPKEKPETLIKKRKARSLLP 850
851    LSTSLDHRKEELHQDCLVLATAKHSRELNEDVSADVEERFHLGLFTDRA 900
901    TLYRMIDIEGKGHLENGHELPHQLMLWKGDLDKGVLQTAERGETDNLV 950
951    AMAPAAGYHVWLWAVEAFKQLCFQDQYVKAASHLLSIHKVYEAVELLKS 1000
1001   NHFYREAIATAKARLRPEDPVLKDLYLSWGTVLERDGHYAVAACCYLGAT 1050
1051   CAYDAAKVLAKKGDAAASLRTAELAAIVGEDELSASLALRCAQELLLANN 1100
1101   WVGAEFALQLHESLQGRQVFLCLELLSRHLEEKQLSEGKSSSSYHTWNT 1150
1151   TEGEPFVERVTAVWKSIFSLDTPQYQEAQKLNKYPATNNTPAKQL 1200
1201   LLHICHDLTLAVLSQQMASWDEAVQALLRAVVRYSYDSGSFTIMQEVYSAF 1250
1251   LPDGCDDLRLDKLGDHQPATPAFKSLEAFFLYGRLYEFWWSLSRPCPNSS 1300
1301   VWVRAGHRTLSVEPSQQLDTASTEETDPETSQPEPNRPELDRRLTEEGE 1350
1351   RMLSTFKELFSEKHASLQNSQRTVAEVQETLAEMIRQHQSOLCKSTANG 1400
1401   PDKNEPEVEAEQPLCSSQSQCKEEKNEPLSLPELTKRLTEANQRMKAFPE 1450
1451   SIKAWPFPDVLECCLVLLLIRSHFPGLAQEMQQQAQELLQKYGNTKTYR 1500
1501   RHCQTFCM*

```

B

```

1      MDLGPLNICEEMTILHGGFLLAEQLFHPKALAEELTKSDWERVGRPIVEAL 50
51     REISSAAAHSQPFAWKKALIIIWAKVLQPHPVTPSDTETRWQEDLFFSV 100
101    GNMIPTINHTILFELLKSLEASGLFIQLLMALPTTICHAELERFLEHVTV 150
151    D TSAEDVAFFLDIWWVEMKHKGHPQDPLLSQFSAMAHKYL PALDEFPHP 200
201    KRLRSDPDACPTMPLLAMLLRGLTQIQSRILGPRKCCALANLADMLTVF 250
251    ALTEDDPQEVSATVYLDKLATVISVWNSDTQNPYHQALAEKVKEAERDV 300
301    SLTSLAKLPSETIFVGCFLHLLREWGEELQAVLRSSQGTSYDSYRLCD 350
351    SLTFSQONATLYLNRTSLSKEDRQVSELAECVRDFLRKTSTVLKNRALE 400
401    DITASIAMAVIQKMDRHMEVCYIFASEKKWAFSDEWVACLGSNRALFRE 450
451    PDLVLRLLLETVIDVSTADRAIPESQIRQVIHLILECYADLSLPGKNKVL 500
501    GILRSWGRKGLSEKLLAYVEGFQEDLNTTFNQLTQSASEQGLAKAVASVA 550
551    RLVIVHPEVTVKKMCSLAVVNLGTHKFLAQILTAFPALRFVEVQGNSSA 600
601    TFMVSLKETVWMKFSTPKKEKQFLELLNCLMSPVKPQIPVAALLEPDE 650
651    VLKEFVLPFLRLDVEEVDLSLRIFIQTLEANACREYWLQTCSPFPLLF 700
701    LCQLLDRFSKYWQLPKEKRCLSLDRKDLAIHILELLCEIVSANAETFSPD 750
751    VWIKSLSWLHRKLEQLDWTVGLRLLKSFEGHFKCEVPATLFEICKLSEDE 800
801    WTSQALHPGYGAGTGLLAWMECCVSSGISERMLSLLVVDVGNPEEVLFS 850
851    KGFLVALVQVMPWCSPQEWQRHLQTRRLLEKQLLHVPYSLEYIQFVPLL 900
901    NLKPFAQELQLSVLFRLTFQFLC SHSCRNLWPLEGWNHVVKLLCGSLTRL 950
951    LDSVRAIQAAAGPWVQGPEDLTQEAALFVYTVQVFCHALHIMAMLHPEVCEP 1000
1001   LYVLALETLCYETLSKTNPSVSSLLQRAHEQRFLKSIAEGIGPEERRQT 1050
1051   LLQKMSSF*

```


Glutathion-S-Transferase-Fusionen (GST) exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt (Abb. 4.8). SIP1 konnte rekombinant in *E. coli* exprimiert werden, wenn es in einem Komplex mit GST-SMN-1/160 ko-exprimiert wurde. Die gekoppelten GST-Fusionsproteine bzw. GST alleine wurden dann mit *in*

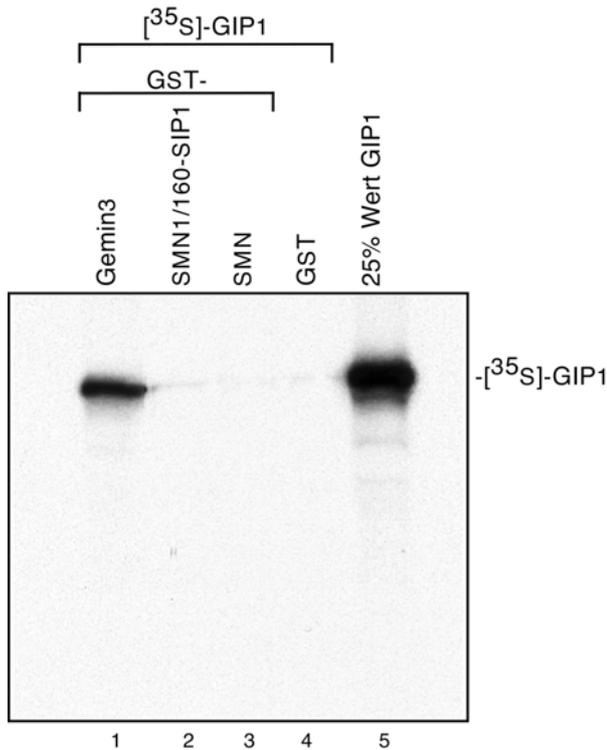


Abb. 4.8: P99/GIP1 bindet an Gemin3/dp103.

Ca. 1 µg GST-Gemin3/dp103 (Spur 1), GST-SMN1/160-SIP1 (Spur 2) sowie GST-SMN (Spur 3) und GST alleine (Spur 4) wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem p99/GIP1 inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. In Spur 5 sind 25% der eingesetzten GIP1-Menge geladen.

in vitro translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem p99 inkubiert.

P99 band nur an GST-Gemin3/dp103 (Spur 1), aber nicht an SMN (Spur 3), an den SMN-SIP1 Komplex (Spur 2) oder an GST alleine (Spur 4). Das Protein wurde dementsprechend mit GIP1 (für Gemin3 interagierendes Protein) bezeichnet. Da bekannt war, daß Gemin3/dp103 direkt an SMN bindet (Charroux *et al.*, 1999), ist GIP1 in den zytosolischen SMN-Komplex sehr wahrscheinlich über seine Interaktion mit Gemin3 inkorporiert. Analoge Experimente mit p175, Hsc70 und unrip zeigten keine spezifische Bindung der Proteine an SMN, SIP1 oder Gemin3/dp103. Dies könnte daran liegen, daß diese Proteine in rekombinanter Form nicht funktionell exprimiert werden

konnten. Hsc70 als Chaperon zeigte dagegen bereits eine Bindung an GST alleine (Daten nicht gezeigt). Es war ebenso denkbar, daß diese Proteine indirekt durch komplexe, von mehreren Proteinen vermittelten Wechselwirkungen in den CSCII Komplex integriert sind und deswegen in den beschriebenen Experimenten keine Interaktionen eingingen.

Es stellte sich also die Frage, ob p175, Hsc70 und unrip tatsächlich spezifisch von der 7B10 Säule eluieren und *in vivo* mit SMN assoziiert sind. Deswegen wurde untersucht, ob mit Antikörpern, die für diese Proteine spezifisch sind, SMN aus HeLa-Zellextrakten ko-immunpräzipitiert werden kann (Abb. 4.9). Das anti-Hsc70 Antiserum für die entsprechenden Experimente wurde von der Gruppe von Dr. Franz-Ulrich Hartl (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Ein Antiserum gegen p175 wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem N-terminalen Deletionskonstrukt von p175 erhalten (siehe 3.3.3). Der Nachweis von ko-präzipitiertem SMN erfolgte durch Western-Blotten mit dem anti-SMN Antikörper 7B10.

Die Hsc70- und p175-spezifischen Antikörper ko-immunpräzipitierten in der Tat SMN (Abb. 4.9 A und B, Spur 3), wohingegen kein SMN nachgewiesen werden konnte, wenn ein Nullserum für die Immunpräzipitation verwendet wurde (Spur 2). Um eine Interaktion zwischen SMN und unrip nachzuweisen, wurden HA-unrip und HA alleine in 293 Zellen durch transiente Transfektion exprimiert und mit einem anti-HA Antikörper immunpräzipitiert. Beim HA-Tag handelt es sich um ein Epitop des Hemagglutinin Proteins des Influenza Virus, das von einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper erkannt wird. Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE getrennt und durch Western-Blotten mit dem 7B10 Antikörper (Abb. 4.9 C, Spuren 1 bis 6) und dem anti-HA Antikörper (Spuren 7 bis 9) analysiert. SMN konnte effizient aus HA-unrip transfizierten Zellen ko-immunpräzipitiert werden (siehe Spuren 3 und 9), aber nicht aus Zellen, die nur mit dem HA-Vektor transfiziert worden waren (Spur 6). Zusammengefaßt zeigten diese Ergebnisse, daß unrip, Hsc70 und p175

spezifisch mit SMN *in vivo* assoziiert sind und deswegen auch Komponenten von CSCII sind.

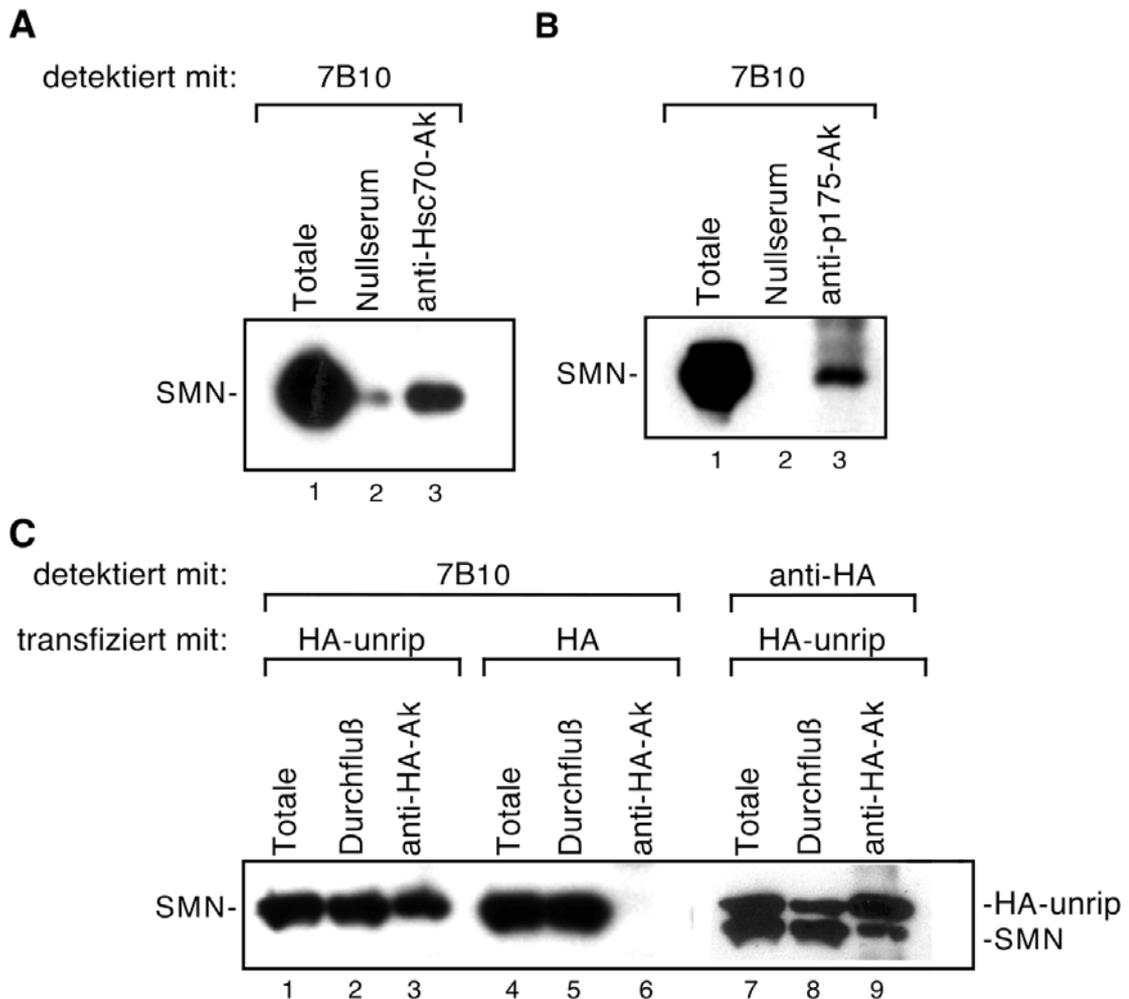


Abb. 4.9: SMN ist *in vivo* spezifisch mit Hsc70, p175 und unrip assoziiert.

A. Immunpräzipitationen aus HeLa-Totalextrakten wurden entweder mit Hsc70-spezifischen Antikörpern (Spur 3) oder einem Nullserum (Spur 2) durchgeführt. In Spur 1 sind 20% der eingesetzten Extraktmenge geladen. Ko-präzipitiertes SMN wurde durch Western-Blot-Analyse mit dem 7B10 Antikörper nachgewiesen. B. Gleiches Experiment wie in A, außer daß p175-spezifische Antikörper verwendet wurden (Spur 3). C. NIH 293 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die entweder für HA-unrip (Spuren 1-3, 7-9) oder den HA-Tag (Spuren 4-6) kodierten. Anschließend wurden Total-Zellextrakte präpariert und Immunpräzipitationen mit HA-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis von SMN im Ausgangsextrakt (Spuren 1 und 4), im Durchfluß (Spuren 2 und 5) und den Präzipitaten (Spuren 3 und 6) erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit dem 7B10 Antikörper. Auf dem gleichen Blot wurde HA-unrip mit einem HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Spuren 7-9).

4.5 CSCII enthält nur die Sm-Proteine der Sm-subcore Domäne

Es gab erste experimentelle Hinweise, daß SMN über seine Interaktion mit SIP1 direkt an der zytoplasmatischen Zusammenlagerung von U snRNPs beteiligt ist (Liu *et al.*, 1997). Daher bestand ein besonderes Interesse an der Frage, ob Sm-Proteine auch Komponenten von CSCII sind. Interessanterweise ko-migrierten p15, p14, p9, p8 und p7 von CSCII mit Sm-Proteinen von gereinigten U snRNPs in SDS-PAGE-Gelen (Abb. 4.5 A, Spuren 2 und 3). Um zu überprüfen, ob diese CSCII Komponenten tatsächlich Sm-Proteinen entsprechen, wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und durch MALDI analysiert. In der Tat sind p15, p14, p9, p8 und p7 jeweils mit SmD2, SmD1, SmE, SmF und SmG identisch. Überraschenderweise wurden keine Peptidfragmente isoliert, die den Sm-Proteinen SmB/B' oder SmD3 zugeordnet werden könnten. Sowohl SmB/B' und SmD3 sind Bestandteile der vollständig ausgebildeten Sm-core-Domäne von reifen U snRNPs. Um auszuschließen, daß diese beiden Sm-Proteine in sub-stöchiometrischen Mengen in CSCII vorhanden sind, wurde der gereinigte Komplex durch Western-Blotten mit dem anti-SmB/B' Antikörper Y12 analysiert (Abb. 4.10 A; Lerner *et al.*, 1981). Es konnte jedoch kein SmB/B' in CSCII oder den Kontrollreinigungen detektiert werden (vergleiche Spuren 2 und 3, untere Bahn) wohingegen der Antikörper SmB/B' im Ausgangsmaterial (Spur 1, untere Bahn) erkannte. Die gleichen Ergebnisse wurden für SmD3 erhalten (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutete, daß CSCII nur eine distinkte Subpopulation von Sm-Proteinen enthält, die interessanterweise alle Komponenten sowohl der Sm-subcore Domäne als auch des „6S-Komplexes“ sind (siehe 1.5.4).

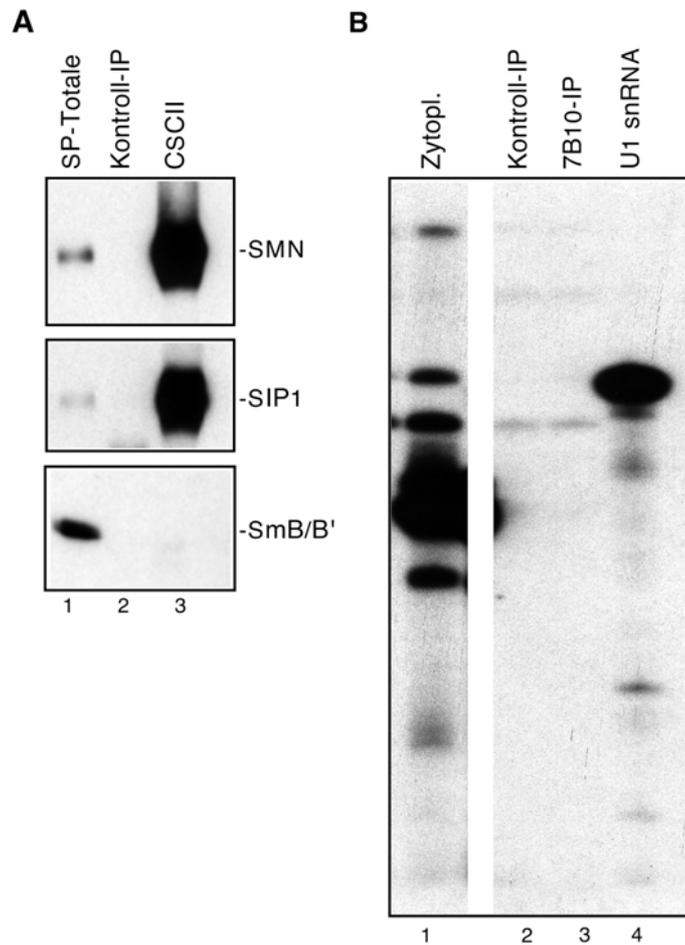


Abb. 4.10: Zytosolische SMN-Komplexe sind nicht stabil mit SmB/B' oder U snRNAs assoziiert.

A. CSCII enthält nicht SmB/B'. Der CSCII Komplex wurde wie in 5.3 beschrieben aus dem SP-Eluat gereinigt und SMN, SIP1 und SmB/B' durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Für die Detektion von SmB/B' wurde der Sm-Protein-spezifische Antikörper Y12 verwendet. Gezeigt sind das Ausgangsmaterial (Spur 1) und die Immunpräzipitationen mit dem anti-Flag Kontrollantikörper (Spur 2) und dem anti-SMN Antikörper 7B10 (Spur 3). B. Zytosolische SMN-Komplexe sind nicht mit U snRNAs assoziiert. Für die Immunpräzipitation zytosolischer SMN-Komplexe wurden der 7B10 Antikörper (Spur 3) oder der anti-Flag Antikörper (Spur 2) eingesetzt. Anschließend wurden RNAs mit Phenol extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und mit $[^{32}\text{P}]$ -pCp und T4 RNA-Ligase am 3'-Ende markiert. Analog wurden RNAs aus dem verwendeten Extrakt extrahiert und markiert (Spur 1). Als Größenstandard diente *in vitro* transkribierte, $[^{32}\text{P}]$ -pCp markierte U1 snRNA (Spur 4). Die RNAs wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.6 Zytosolische SMN-Komplexe sind nicht stabil mit U snRNAs assoziiert

Der „6S-Komplex“ und die Sm-subcore Domäne unterscheiden sich bei gleicher Sm-Protein-Zusammensetzung dadurch, daß nur die Sm-subcore Domäne U snRNA enthält (siehe 1.5.4). Es war daher eine interessante Frage zu klären, ob CSCII möglicherweise mit U snRNAs assoziiert ist. Dazu wurde der Komplex mit anti-SMN-(7B10) oder anti-Flag Antikörpern als Kontrolle aus nicht fraktionierten, zyttoplasmatischen HeLa-Zellextrakten immunpräzipitiert (Abb. 4.10 B). Gebundene RNAs wurden mit Phenol extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und mit [³²P]-pCp durch T4 RNA Ligase am 3'-Ende markiert. Eine *in vitro* transkribierte und [³²P]-markierte U1 snRNA diente als Marker (Spur 4). Wie in Abb. 4.10 B gezeigt, konnte keine RNA, die durch pCp markiert werden kann, von einer der beiden Affinitätsmatrices eluiert werden (Spuren 2 und 3). Dies zeigte, daß CSCII (und CSCI) nicht stabil mit U snRNAs assoziiert vorliegt.

4.7 Die Interaktion von SMN mit SIP1, mit Sm-Proteinen und sich selbst erfolgt durch verschiedene Domänen

Die Reinigung des zytosolischen SMN-Komplexes CSCII hatte zur Identifizierung mehrerer neuer SMN-assoziiierter Proteine geführt. Das Vorhandensein einer distinkten Population an Sm-Proteinen und SIP1 ließ zudem eine Rolle des CSCII-Komplexes während der U snRNP Zusammenlagerung wahrscheinlich erscheinen. Im Rahmen einer eingehenden Charakterisierung von SMN und des CSCII-Komplexes stellte sich nun die Frage, mit welchen Proteinen des Komplexes SMN direkt interagiert und welche Bedeutung diesen Wechselwirkungen für die Funktion von SMN *in vivo* zukommt. Dabei wurde besonderes Gewicht auf die Analyse der Interaktionen von SMN mit dem U snRNP Zusammenlagerungsfaktor SIP1, mit Sm-Proteinen und mit sich selbst gelegt. Für die Identifizierung der jeweiligen

Interaktionsdomänen wurden *in vitro* Bindungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden SMN oder N- und C-terminale Deletionsfragmente von SMN, die an zwei IgG bindende Domänen des Proteins A von *Staphylococcus aureus* (zz-Tag) fusioniert waren, in *E. coli* exprimiert und 0,5-1 µg dieser Proteinfragmente an IgG-Sepharose immobilisiert. Anschließend wurden diese Proteine mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem SMN, SIP1 sowie SmB/B' inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen wurden gebundene Proteine durch SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in der Autoradiographie sichtbar gemacht.

Sowohl SMN, als auch SIP1 und SmB/B' banden effizient an volle Länge SMN (Abb. 4.10, Spuren 1, 4 und 7). Für eine Interaktion von SMN mit sich selbst waren die ersten 159 Aminosäuren ausreichend (Spur 2). Zusätzlich wurde eine signifikante, wenn auch schwächere Bindung an ein SMN-Fragment beobachtet, das die Aminosäuren 90 bis 294 umfaßt (Spur 3). Diese Experimente ließen die Vermutung zu, daß SMN mehrere Oligomerisierungsdomänen unterschiedlicher Effizienz besitzt, die sowohl in N- und C-terminalen Bereichen von SMN liegen. Für eine effiziente Bindung von SMN an SIP1 waren die ersten 159 Aminosäuren von SMN ausreichend, wohingegen die Aminosäuren 90-294 keine signifikante Bindung im Vergleich zur Kontrolle erlaubten (vergleiche Spuren 5, 6 und 10). SmB/B' band an alle getesteten SMN-Konstrukte gleich stark. Die gleiche Beobachtung wurde für SmD1 und SmD3 gemacht. SmE und SmD2 hingegen interagierten nur schwach mit SMN (Daten nicht gezeigt). Diese Daten legten nahe, daß die Bindung von Sm-Proteinen an SMN entweder durch die Aminosäuren 90-159 erfolgt oder SMN über mehrere Sm-Protein Bindungsdomänen im N- und C-Terminus verfügt (vergleiche Spuren 7-10).

Um sicherzustellen, daß die beobachteten Ergebnisse nicht auf eine fehlerhafte Faltung der verwendeten zz-SMN-Fragmente zurückzuführen sind, wurden die gleichen Experimente mit den entsprechenden GST-SMN-Fragmenten durchgeführt.

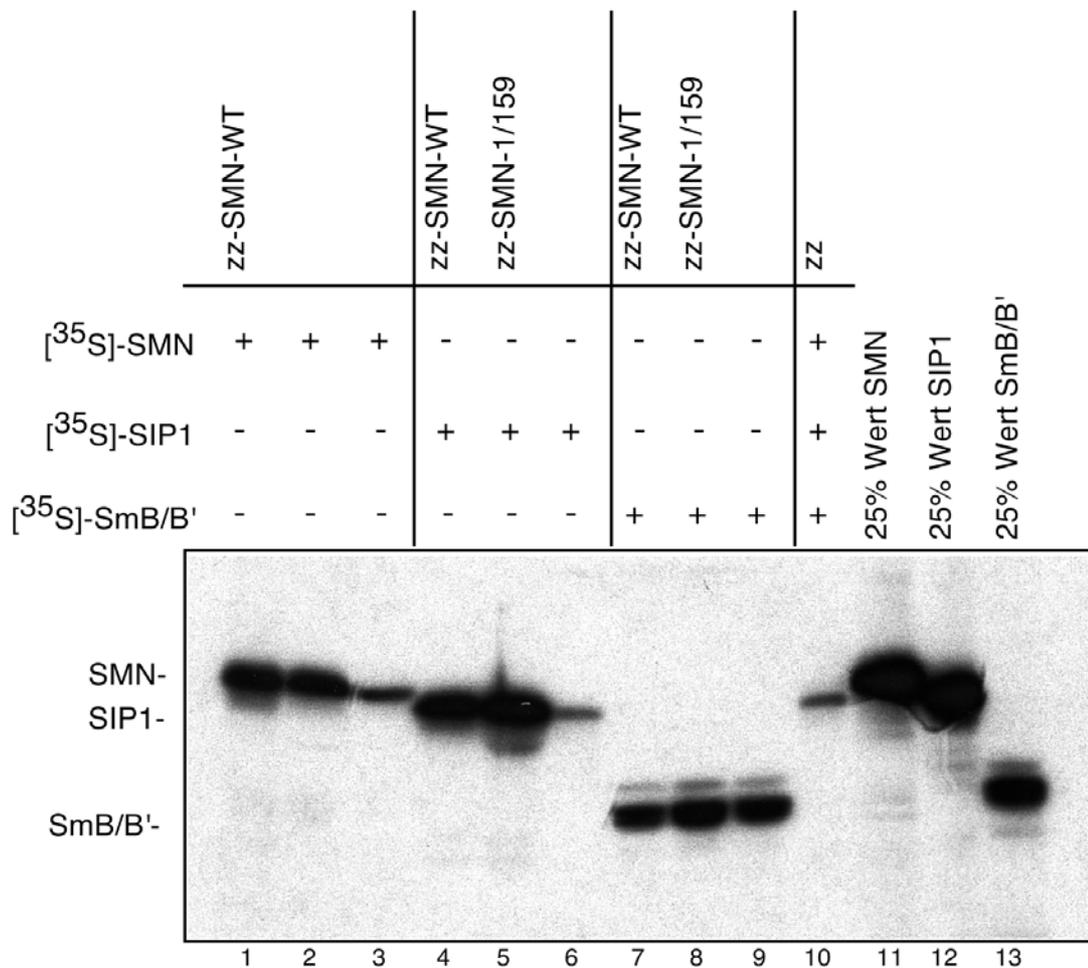


Abb. 4.11: SMN interagiert über unterschiedliche Bereiche mit SIP1, SmB/B' und sich selbst.

Je 0,5-1 µg zz-SMN-WT (Spuren 1, 4, 7), zz-SMN-1/159 (Spuren 2, 5, 8), zz-SMN-90/294 (Spuren 3, 6, 9) und zz-Peptid (Spur 10) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit [³⁵S]-SMN, SIP1 und SmB/B' inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie detektiert. In den Spuren 11-13 sind je 25% der eingesetzten Protein-Mengen geladen.

Es ergaben sich identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Nachdem damit deutlich geworden war, daß SMN möglicherweise über verschiedene Bereiche die Wechselwirkung mit SIP1, Sm-Proteinen und sich selbst eingeht, wurden diese Domänen im Detail charakterisiert. Die Interaktion mit Gemin3/dp103 wurde nicht näher untersucht, da bereits gezeigt worden war, daß es über seine Bindung an den C-Terminus von SMN sehr wahrscheinlich die Integration von GIP1 in den SMN-Komplex vermittelt.

4.7.1 SMN besitzt eine N-terminale Oligomerisierungsdomäne

Zunächst sollte die Oligomerisierungsdomäne(n) von SMN weiter eingengt werden. Dazu wurde eine Reihe zz-getaggtter N-terminaler Deletionskonstrukte von SMN an IgG-Sepharose immobilisiert (Abb. 4.12) und mit [³⁵S]-markiertem SMN inkubiert. [³⁵S]-SMN interagiert spezifisch mit volle-Länge SMN. Dagegen band SMN nicht an die Proteinfragmente SMN-1/30 und SMN-1/60 (Spur 3 und 4), aber an alle N-terminalen Konstrukte, die die ersten 90 Aminosäuren enthielten (Spuren 5, 6, und 7). Da ebenfalls eine Interaktion mit Deletionsfragmenten beobachtet wurde, denen die ersten 30, 36 oder 55 Aminosäuren fehlten (Spuren 9, 8 und 2), zeigte dies, daß SMN eine N-terminale Oligomerisierungsdomäne enthält, die mindestens die Aminosäuren 55 bis 90 umfaßt. Dieser Bereich von SMN war für eine effiziente Oligomerisierung ausreichend, da *in vitro* translatiertes SMN effizient mit SMN-60/90 interagiert (Abb. 4.12 B, Spur 1). Neben dieser N-terminalen Oligomerisierungsdomäne konnte in der Zwischenzeit eine weitere Oligomerisierungsdomäne im C-Terminus von SMN nachgewiesen werden, die im Exon 6 lokalisiert ist (Lorson *et al.*, 1998a).

4.7.2 SMN enthält zwei N-terminale Bindungsstellen für SIP1

Für die Charakterisierung der SIP1-Bindungsdomäne wurden die gleichen SMN-Proteinfragmente benutzt und mit [³⁵S]-SIP1 inkubiert (Abb. 4.12 A, mittlere Reihe). Es zeigte sich, daß SIP1 im Vergleich zur Kontrolle effizient mit SMN wechselwirkte (Spur 1 und 11), aber nicht mit einem Deletionsfragment von SMN, dem die ersten 55 Aminosäuren fehlten (Spur 2). Dies bedeutet, daß die SIP1-Bindungsstelle innerhalb dieses N-terminalen Bereichs von SMN liegt. Eine genauere Analyse zeigte, daß sowohl die Aminosäuren 1-30 als auch 30-60 alleine ausreichend für die effiziente Bindung von SIP1 waren (Abb. 4.12 A, Spuren 3 bis 8 und Abb. 4.12 B, vergleiche Spuren 2 und 4).

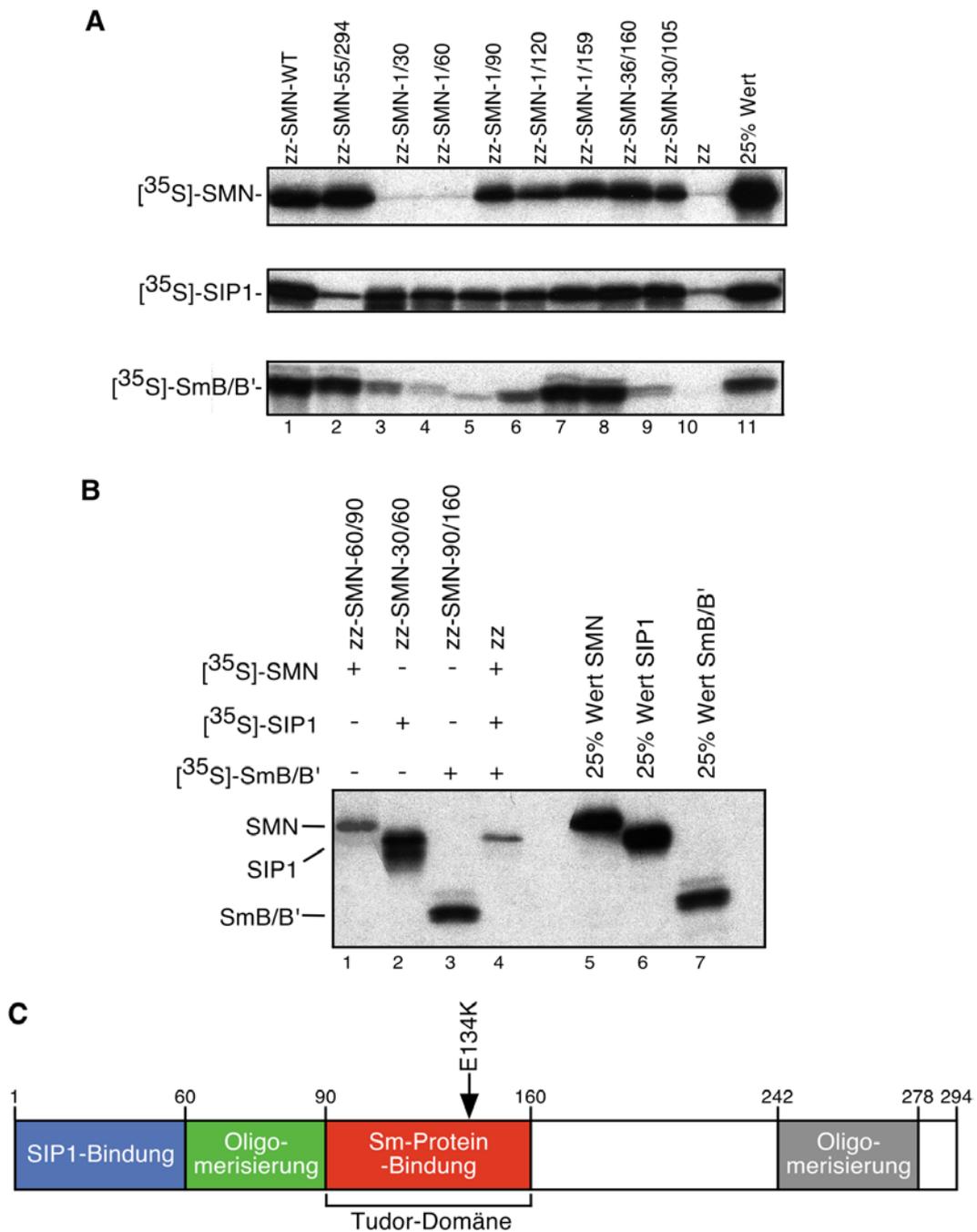


Abb. 4.12: Identifizierung der Oligomerisierungs-, SIP1- und Sm-Protein Bindungsdomäne von SMN.

A. Eingrenzung der verschiedenen Interaktionsdomänen von SMN. Je 0,5-1 µg verschiedener zz-SMN Deletionsfragmente oder zz alleine wurden an IgG-Sepharose gekoppelt (Spuren 1-10) und die Bindung von [³⁵S]-SMN, SIP1 und SmB/B' getestet. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen. In Spur 11 sind 25% der eingesetzten Protein-Mengen geladen. B. Die identifizierten Domänen sind alleine ausreichend für die Interaktion von SMN mit SIP1, SmB/B' und sich selbst. Zz-SMN-60/90 (Spur 1), zz-SMN-30/60 (Spur 2), zz-SMN-90/160 (Spur 3) und das zz-Peptid (Spur 4) wurden immobilisiert und mit [³⁵S]-SMN, SIP1 und SmB/B' inkubiert. Interaktionen wurden wie in A nachgewiesen. In den Spuren 5-7 sind 25% der eingesetzten Proteine gezeigt. C. Schematische Darstellung der Interaktionsdomänen von SMN.

Damit besitzt SMN höchstwahrscheinlich zwei unabhängige N-terminale Bindungsstellen für SIP1. Diese Daten sind konsistent mit Studien, die zeigen, daß der N-Terminus von SMN für die *in vivo* Interaktion mit SIP1 wichtig ist (Pellizzoni *et al.*, 1998).

4.7.3 Sm-Proteine binden an die Tudor-Domäne von SMN

Um die Bindungsstelle für Sm-Proteine an SMN zu identifizieren, wurde die Interaktion von *in vitro* translatierten Sm-Proteinen mit verschiedenen SMN-Fragmenten untersucht. Dabei wurde die Bindung von SmB/B' stellvertretend für die anderen Sm-Proteine analysiert. SmB/B' band gleichermaßen effizient an volle Länge SMN und die ersten 159 Aminosäuren von SMN (Abb. 4.12 A, untere Reihe, Spuren 1 und 8). Dagegen konnte keine Bindung von SmB/B' an das C-terminale Fragment SMN-159/294 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine schwache Wechselwirkung wurde für die SMN-Fragmente detektiert, die nur die ersten 105 Aminosäuren enthielten (Spuren 3, 4, 5 und 9). SMN-Fragmente, die die Aminosäuren 90-160 umfaßten, interagierten dagegen stark mit SmB/B' (Spuren 2, 7 und 8). Interessanterweise enthält dieser Bereich von SMN eine sogenannte Tudor-Domäne. Tudor-Domänen, die ursprünglich in dem *Drosophila melanogaster* Protein Tudor beschrieben wurden, sind evolutionär konservierte Sequenzmotive unbekannter Funktion, die in vielen eukaryontischen Proteinen gefunden werden (Ponting, 1997). In der Tat war die Tudor-Domäne alleine (Aminosäuren 90-160) ausreichend, um eine Bindung von SMN an SmB/B' zu vermitteln (Abb. 4.12 B, Spur 3), während der N-terminale Teil der Tudor-Domäne (bis Aminosäure 120) nur schwach mit SmB/B' wechselwirkte (Abb. 4.12 A, untere Reihe, Spur 6). Identische Ergebnisse ergaben sich, wenn die Sm-Proteine SmD1 und D3 analysiert wurden (Daten nicht gezeigt). Damit ist die Tudor-Domäne von SMN alleine notwendig und hinreichend für die Bindung der Sm-Proteine.

In Abbildung 4.12 C sind die verschiedenen, ermittelten Domänen von SMN zur besseren Übersicht schematisch dargestellt.

4.8 SMN mit einer SMA verursachenden Punktmutation in der Tudor Domäne bindet nicht an Sm-Proteine

Die Interaktion zwischen der Tudor-Domäne von SMN und spleißosomalen Sm-Proteinen war von besonderem Interesse, da angenommen werden konnte, daß diese Wechselwirkung für die putative Funktion von SMN bei der Zusammenlagerung von U snRNPs relevant ist (siehe auch 4.9). Um zunächst auszuschließen, daß die Bindung der *in vitro* translatierten Sm-Proteine an die Tudor-Domäne indirekt über Faktoren des Retikulozyten-Lysat erfolgte (siehe 3.7.3), wurde getestet, ob rekombinantes GST-SMN direkt an native Sm-Proteine bindet (isoliert aus HeLa-Zellen). Sm-Proteine wurden nach Sumpter *et al.* (1992) aus affinitätsgereinigten U snRNPs als eine „Total Protein“-Mischung (TP) hergestellt, die neben den Sm-Proteinen noch U1 und U2 snRNP spezifische Proteine enthielten. Die Sm-Proteine liegen in diesen TP-Fractionen als heterooligomere Komplexe (E.F.G), (D1.D2) und (B/B'.D3) vor. Wie in Abb. 4.13 A gezeigt, band SMN-36/160 effizient an die Sm-Proteine SmD1 und SmD2, moderat an SmB/B' und SmD3 und nur schwach an SmE, F und G (Spur1). Im Gegensatz dazu interagierten die Sm-Proteine nur marginal mit SMN-30/105 bzw. GST alleine (Spuren 2 und 3). Von den U snRNP spezifischen Proteinen besaß das U1A Protein eine Affinität für SMN-36/160 (Spuren 1 bis 3). Diese Ergebnisse zeigten, daß Sm-Proteine direkt an die Tudor-Domäne von SMN binden. Die vergleichbare Affinität von SmB/B' und D3, von SmD1 und D2 sowie von SmE, F und G für SMN (Abb. 4.13 A) deutet darauf hin, daß die Sm-Proteine in Form der erwähnten heterooligomeren Sm-Protein-Komplexe mit der Tudor-Domäne interagieren.

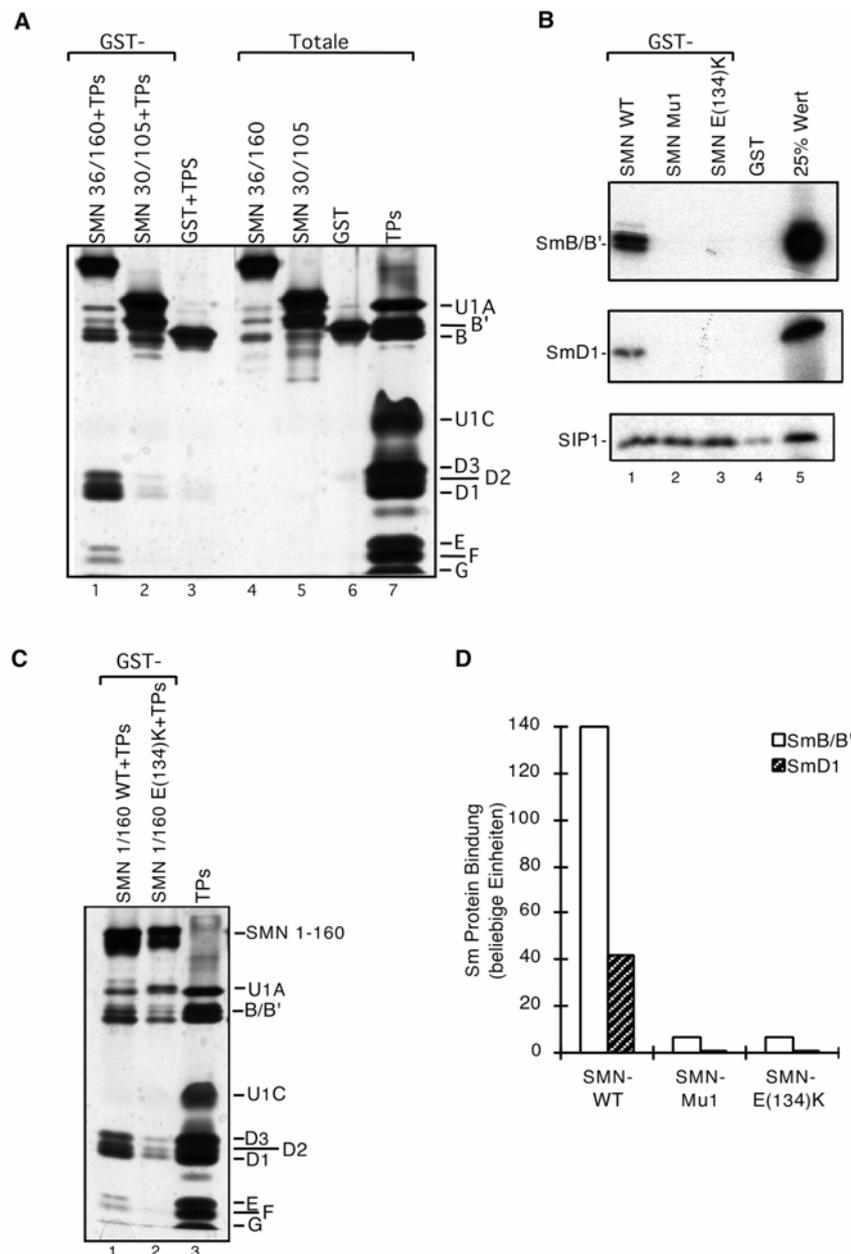


Abb. 4.13: Eine SMA verursachende Punktmutation in der Tudor-Domäne von SMN verhindert die direkte Bindung der Sm-Proteine.

A. Sm-Proteine binden direkt an die Tudor-Domäne von SMN. Sm- und U1 snRNP-spezifische Proteine (TPs) wurden mit verschiedenen GST-SMN Fragmenten (Spuren 1 und 2) und GST alleine (Spur 3) inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit 10 mM Glutathion in PBS (pH 8,4) eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber Färbung sichtbar gemacht. In den Spuren 4-7 sind 100% der eingesetzten Proteine gezeigt. B. Aminosäureaustausche innerhalb der Tudor-Domäne blockieren die Sm-Protein Bindung. Die Bindung von [³⁵S]-SmB/B', SmD3 und SIP1 an GST (Spur 4) bzw. GST-SMN-Fragmente, die die Wildtyp-Sequenz (Spur 1) oder Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 129-135 (Mu1, Spur 2) bzw. 134 (E(134)K, Spur 3) enthielten, wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen. In Spur 5 sind 25% der eingesetzten Protein-Mengen gezeigt. C. Die direkte Bindung von Sm-Proteinen an die Tudor-Domäne von SMN wird durch die SMA verursachende Mutation E134K beeinträchtigt. GST-SMN-1/160 (Spur 1) und GST-SMN-1/160-E134K (Spur 2) wurden mit TPs inkubiert. Gebundene Proteine wurden wie in A nachgewiesen. D. Quantifizierung der in B untersuchten Interaktionen.

Als nächstes wurde untersucht, welche Aminosäuren innerhalb der Tudor-Domäne für die Interaktion zwischen SMN und den Sm-Proteinen wichtig sind. Die Sequenz GYGNREE innerhalb der Tudor-Domäne (Position 129-135) ist zwischen SMN-Proteinen verschiedener Organismen hochkonserviert und könnte daher funktionell relevant sein. Deswegen wurde diese Region gegen die Sequenz VFVDRQQ (Mu1) ausgetauscht und getestet, ob diese Substitutionen die Bindung der Sm-Proteine an die Tudor-Domäne von SMN beeinflussen. [³⁵S]-markiertes SmB/B' und SmD3 wechselwirkten effizient mit GST-SMN (Abb. 4.13 B, Spur 1). Dagegen war die Bindung der beiden Sm-Proteine an GST-SMN-Mu1 mindestens um den Faktor 30 reduziert (Abb. 4.13 D). Dies zeigte, daß Aminosäuren in diesem Bereich entscheidend für die Bindung von SMN an Sm-Proteine sind.

In der Literatur ist ein Typ I SMA-Patient beschrieben, der eine mutierte Form von SMN exprimiert, das an der Position 134 einen Glutamat zu Lysin Austausch aufweist [SMN(E134K)], wodurch eine negativ geladene Aminosäure gegen eine positiv geladene ausgetauscht wird (Clermont *et al.*, 1995). Die Beobachtung, daß diese Mutation genau in dem Bereich der Tudor-Domäne liegt, der für die Interaktion mit den Sm-Proteinen verantwortlich ist, ließ vermuten, daß die E134K Mutation die Bindung der Sm-Proteine an SMN beeinflusst. Tatsächlich band GST-SMN(E134K) nur äußerst schwach an die *in vitro* translatierten Sm-Proteine SmB/B' und SmD3 (Abb. 4.13 B, Spur 3 und D). Erwartungsgemäß wurde die gleiche Beobachtung gemacht, wenn die direkte Bindung von Sm-Proteinen an SMN untersucht wurde: Die Affinität von GST-SMN-1/160 für Sm-Proteine war mindestens um den Faktor 5 reduziert, wenn das SMN-Fragment die E134K Substitution enthielt (Abb. 4.13 C, Spuren 1 und 2).

Aufgrund der Ladungsveränderung, die durch die Mu1- und E134K-Mutationen in der Tudor-Domäne hervorgerufen werden, lag die Vermutung nahe, daß dadurch die generelle Struktur von SMN zerstört wird und SMN prinzipiell keine Interaktionen mehr eingehen kann. Da aber weder die Assoziation von

SMN mit SIP1 (Abb. 4.13 B, Spur 2 und 3) noch die Oligomerisierung von SMN selbst durch die Mutationen beeinträchtigt waren (Daten nicht gezeigt), führen die Mu1- und E134K-Mutationen nicht zu einer umfassenden Veränderung der SMN-Struktur, sondern bewirken nur einen spezifischen Verlust der Sm-Protein Bindung. Diese Schlußfolgerung wird auch durch die NMR-Strukturanalyse der Tudor-Domäne von SMN gestützt (siehe 4.10).

Zusammengefaßt zeigten diese Experimente erstmals, daß die Tudor-Domäne von SMN eine Protein-Protein Interaktionsdomäne ist, die die direkte und spezifische Bindung von SMN an spleißosomale Sm-Proteine vermittelt. Darüber hinaus identifizierte die Analyse einer SMA verursachenden Punktmutation in der Tudor Domäne die reduzierte Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen als einen möglichen biochemischen Defekt der SMA.

4.9 Antikörper gegen die Tudor-Domäne von SMN inhibieren die U snRNP Zusammenlagerung *in vivo*

Es stellte sich nun die wichtige Frage, ob die Interaktion von SMN mit Sm-Proteinen für die Bildung der Sm-core-Domäne von U snRNPs *in vivo* von funktioneller Relevanz ist. In diesem Fall sollte die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne durch Antikörper, die die Bindung der Sm-Proteine an die Tudor-Domäne verhindern, blockiert werden können. Mit dem *Xenopus laevis* Oozyten-System hat man die Möglichkeit, diesen Prozeß *in vivo* zu analysieren. Wird eine *in vitro* transkribierte, [³²P]-markierte U snRNA ins Zytoplasma der Oozyten injiziert, assoziiert diese mit endogenen Sm-Proteinen unter Ausbildung der Sm-core-Domäne. Diese Assoziation kann durch eine Ko-Immunpräzipitation der markierten U snRNA mit dem Sm-Protein-spezifischen Antikörper Y12 nachgewiesen werden (siehe Schema Abb. 4.15 C; Fischer *et al.*, 1997).

Es wurde daher versucht, Antikörper, die spezifisch die Tudor-Domäne von SMN erkennen (anti-Tu1-Ak), durch Affinitätsreinigung aus einem Kaninchen-

Serum, das durch die Immunisierung mit volle Länge zz-SMN hergestellt worden war, zu isolieren (siehe 3.3.3) Anschließend wurden die gereinigten Antikörper auf ihre Spezifität hin überprüft (Abb. 4.14):

Die anti-Tu1-Antikörper erkannten in Western-Blots sowohl GST-SMN-Konstrukte, die das volle Länge Protein enthielten (Abb. 4.14 A, Spur 1) als auch Deletionsfragmente, die die Aminosäuren 90-160 entweder komplett oder nur zum Teil enthielten (GST-SMN-1/120, GST-SMN-1/160 und GST-SMN-36/160; Spuren 5, 6, und 7). Dagegen wurden keine SMN-Fragmente detektiert, die die ersten 90 Aminosäuren oder den C-Terminus von SMN enthielten (GST-SMN-1/60, GST-SMN-1/90 und GST-SMN-159/294; Spuren 3, 4 und 2). Somit erkannten die gereinigten Antikörper ausschließlich die Tudor-Domäne und keine anderen Bereiche von SMN.

Ein wichtiger Aspekt für die geplanten Injektionsstudien war, daß die anti-Tu1-Antikörper das SMN von *Xenopus laevis* erkennen und nicht mit anderen Tudor-Proteinen kreuzreagieren. Wie in Abb. 4.14 B gezeigt ist, war dies der Fall: Die anti-Tu1-Antikörper erkannten SMN in Oozyten-Totalextrakten (Spur 1) und in zytoplasmatischen Oozytenextrakten (Spur 2), aber nicht in Kernextrakten (Spur 3). Ähnliche Ergebnisse sind für einen monoklonalen anti-SMN-Antikörper beschrieben worden (Fischer *et al.*, 1997). In gereinigten HeLa U snRNPs (Spur 4) und HeLa-Totalextrakten (Daten nicht gezeigt) detektierten die anti-Tu1-Antikörper ebenfalls ausschließlich SMN.

Schließlich wurde untersucht, ob die anti-Tu1-Antikörper die Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen blockieren (Abb. 4.14 C). Um dies zu testen, wurden 0,5-1 µg rekombinantes GST-SMN an Gluthation-Sepharose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem SmB/B', SMN und SIP1 sowie einem fünffachen molaren Überschuß an anti-Tu1-Antikörpern inkubiert. Die anti-Tu1-Antikörper blockierten die Interaktion zwischen SMN und SmB/B' komplett (Spur 2). Dieser Effekt war hochspezifisch, weil die gleichen Antikörper weder die Oligomerisierung von SMN (Spur 2), noch die Bindung von SIP1 an SMN

inhibierten (Spur 4). In Kontrolllexperimenten banden SMN, SIP1 und SmB/B' effizient an GST-SMN (Spuren 1 und 3).

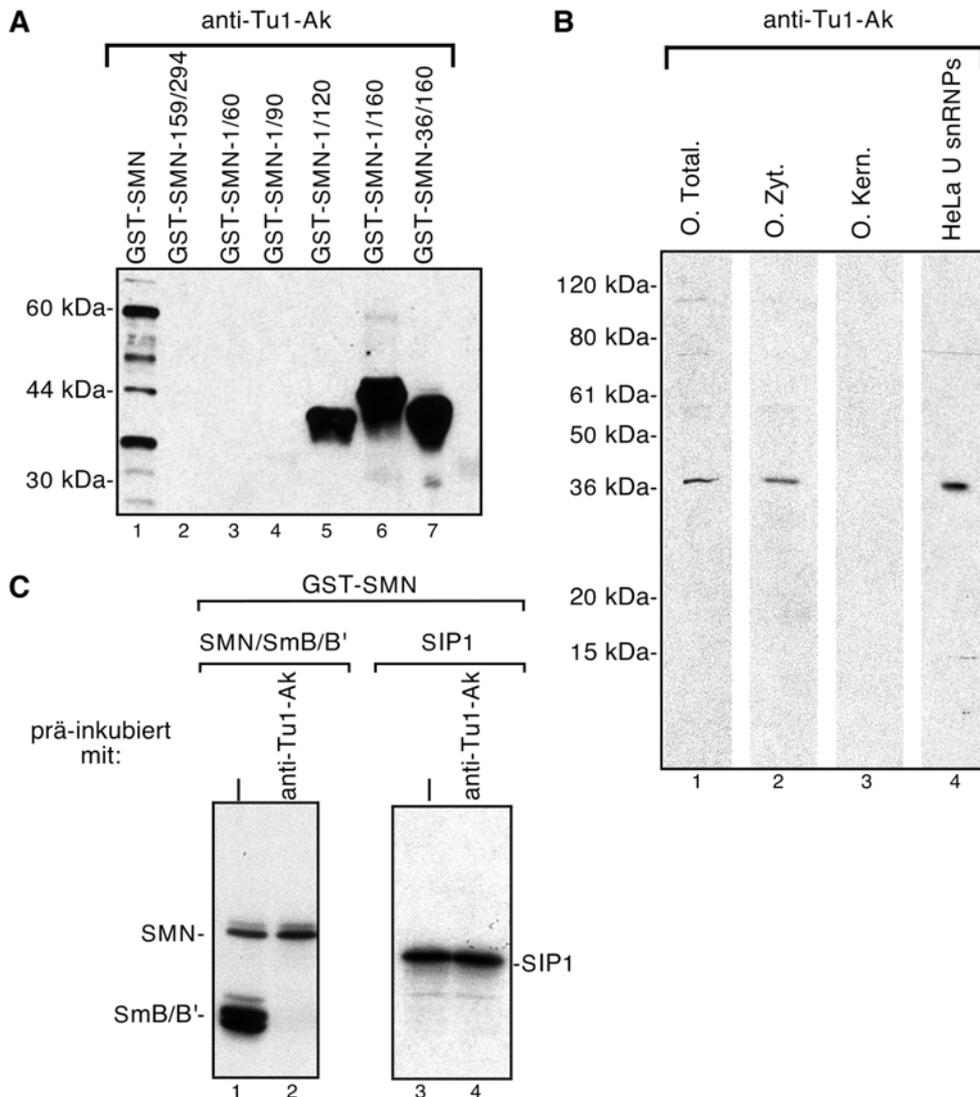


Abb. 4.14: A. Affinitätsgereinigte anti-Tu1-Ak Antikörper (anti-Tu1-Ak) erkennen spezifisch die Tudor Domäne von SMN.

Je 0,1 µg verschiedener, gereinigter GST-SMN-Fragmente (Spuren 2-7) wurden einer Western-Blot-Analyse mit anti-Tu1 Antikörpern unterzogen. Als Positivkontrolle diente GST-SMN (Spur 1). B. Anti-Tu1-Antikörper erkennen spezifisch SMN im Zytosol von *Xenopus laevis* Oozyten und in gereinigten HeLa U snRNPs. Totalextrakt (Spur 1), zytosolischer Extrakt oder Kernextrakt von *Xenopus laevis* Oozyten (Spuren 2 und 3) und gereinigte HeLa U snRNPs (Spur 4) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. C. Die anti-Tu1 Antikörper blockieren die Bindung von Sm-Proteinen an SMN. Immobilisiertes GST-SMN wurde mit Puffer (Spuren 1 und 3) oder anti-Tu1 Antikörper (Spuren 2 und 4) inkubiert. Anschließend wurde die Bindung von [³⁵S]-SmB/B' und SMN (Spuren 1 und 2) sowie SIP1 (Spuren 3 und 4) an GST-SMN getestet.

Zusammengefaßt zeigten diese Ergebnisse, daß die anti-Tu1-Antikörper spezifisch die Tudor-Domäne von SMN erkennen und die Interaktion der Tudor-Domäne mit Sm-Proteinen *in vitro* inhibieren. Die wichtigsten Voraussetzungen für ihre Verwendung in Injektionsstudien waren damit erfüllt. Jetzt konnte analysiert werden, ob diese Antikörper die Zusammenlagerung von U snRNPs in *Xenopus laevis* Oozyten inhibieren (Abb. 4.15).

Es wurden zwei verschiedene anti-Tu-Antikörper Präparationen (anti-Tu1-Ak und anti-Tu2-Ak) ins Zytoplasma der Oozyten injiziert (siehe Schema Abb. 4.15 C). Als Kontrollen wurde entweder ein unspezifisches Kaninchen-Nullserum oder Wasser injiziert. Dieselben Oozyten erhielten nach 30 min eine zweite zytoplasmatische Injektion von drei verschiedenen *in vitro* transkribierten und [³²P]-markierten RNAs. Für die Analyse der Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne wurden die snRNAs U1 und U5 injiziert. Die Dihydrofolat Reduktase (DHFR) mRNA bindet dagegen nicht an Sm-Proteine und diente als Spezifitätskontrolle (Fischer *et al.*, 1997). Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Oozyten homogenisiert und die Ausbildung der Sm-core-Domäne durch Ko-Immünpräzipitation der injizierten RNAs mit dem Y12-Antikörper untersucht.

Wie erwartet wurden die snRNAs U1 und U5 durch Y12 aus Oozyten immunpräzipitiert, die mit Wasser oder einem Nullserum vor-injiziert worden waren (Abb. 4.15 A, Spuren 5 und 6). Die Ausbildung der Sm-core-Domäne fand spezifisch nur an den U snRNAs statt, da ko-injizierte DHFR-mRNA nicht durch Y12 ko-präzipitiert wurde (Abb. 4.15 A, Spuren 5 und 6). Die Prä-Injektion von anti-Tu-Antikörpern (anti-Tu1-Ak und anti-Tu2-Ak) hatte dagegen drastische Auswirkungen auf die Ausbildung der Sm-core-Domäne. In diesem Fall konnten nur marginale Mengen U1 oder U5 snRNA in den Immunpräzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 4.15 A, Spuren 7 und 8). Durch die Analyse der Überstände wurde zudem sichergestellt, daß die verschiedenen RNAs im Laufe des Experiments nicht degradiert waren (Abb. 4.15 A, Spuren 1 bis 4).

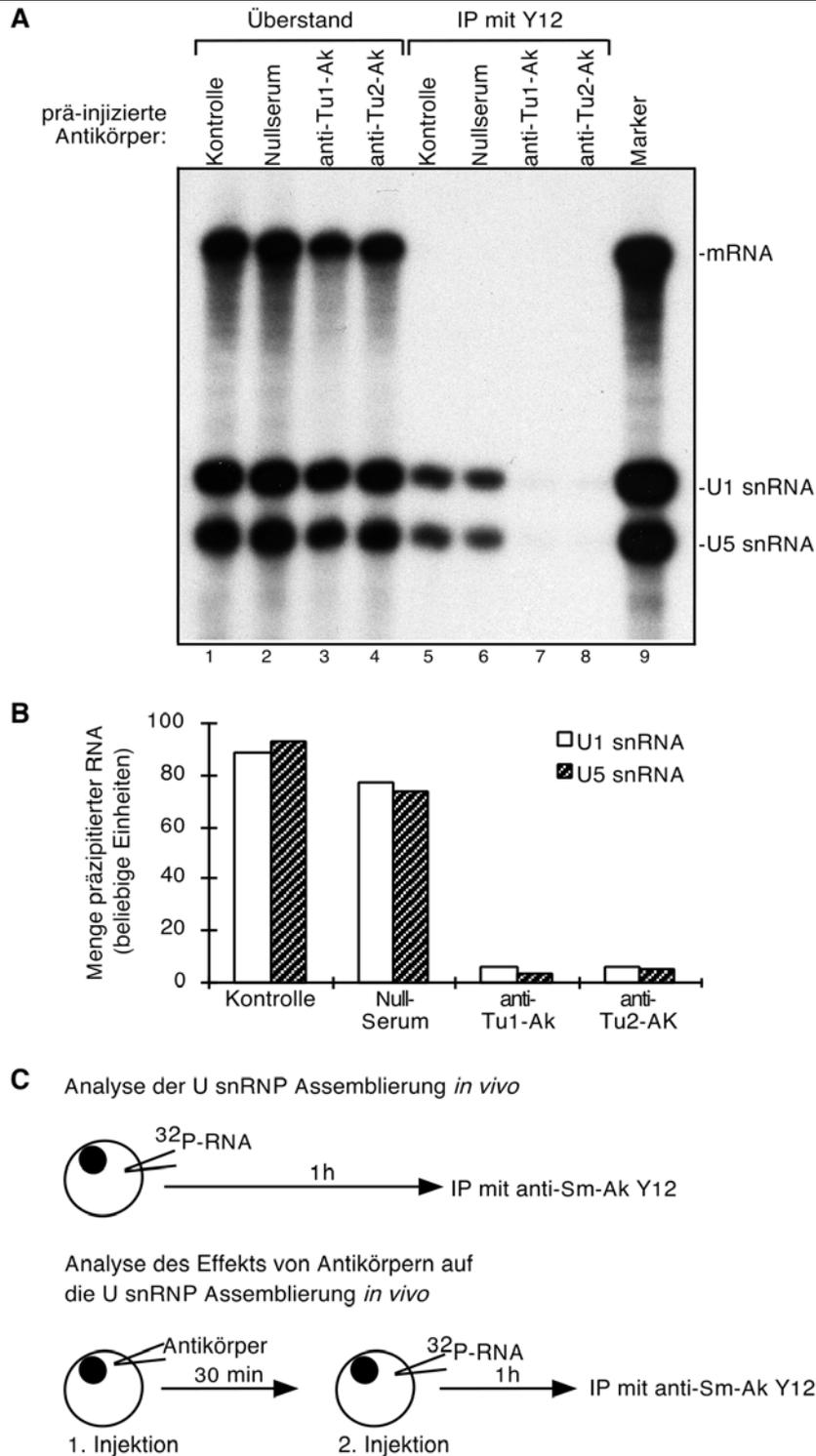


Abb. 4.15: Antikörper gegen die Tudor-Domäne von SMN blockieren die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo*.

A. In *Xenopus laevis* Oozyten wurde Wasser (Spur 5), ein Nullserum (Spur 6) oder verschiedene Präparationen von anti-Tu1 Antikörpern (Spuren 7 und 8) injiziert. Nach 30 min Inkubation erhielten die gleichen Oozyten eine zweite Injektion von *in vitro* transkribierten, [³²P]-markierten snRNAs U1 und U5 sowie DHFR mRNA. Die RNAs wurden aus homogenisierten Oozyten mit dem Y12 Antikörper ko-präzipitiert und durch denaturierende Gelelektrophorese und Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Spuren 5-8 zeigen die RNAs der Präzipitate, die Spuren 1-4 die entsprechenden Überstände. In Spur 9 sind die injizierten RNAs aufgetragen. B. Quantifizierung der in A präzipitierten RNA-Menge. C. Schematische Darstellung des Versuchsablauf.

Somit zeigten diese Befunde, daß Antikörper, die spezifisch die Tudor-Domäne von SMN erkennen und die Bindung der Sm-Proteine an die Tudor-Domäne blockieren, *in vivo* effizient die Ausbildung der Sm-core-Domäne von U snRNPs blockieren. Damit konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, daß SMN ein essentieller U snRNP Zusammenlagerungsfaktor ist.

In analog durchgeführten Experimenten gelang es ebenfalls, Antikörper zu isolieren, die spezifisch für die N-terminale Oligomerisierungsdomäne von SMN sind (Aminosäuren 60-90) und die Interaktion von SMN mit sich selbst blockieren. Allerdings inhibierten diese Antikörper nicht die *in vivo* Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne von U snRNPs, wenn sie ins Zytoplasma von Oozyten prä-injiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Damit ist unklar, ob die Oligomerisierung von SMN über diese Domäne *in vivo* funktionell wichtig für die Biogenese von U snRNPs ist.

4.10 Die NMR-Struktur der Tudor-Domäne von SMN

Durch die oben beschriebenen Experimente konnte man der Tudor-Domäne erstmals eine Funktion in einem zellulären Kontext zuweisen und zeigen, daß diese Funktion auf Protein-Protein Wechselwirkungen beruht. Um die strukturelle Grundlage der Interaktion zwischen der Tudor-Domäne und spleißosomalen Sm-Proteinen im Detail zu verstehen, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Sattler (EMBL, Heidelberg) die NMR-Struktur der Tudor-Domäne gelöst (Abb. 4.16).

Die Struktur der Tudor-Domäne in Lösung wurde durch heteronukleare, multidimensionale NMR-Spektroskopie bestimmt. Das rekombinante SMN-Protein, das für diese Experimente benutzt wurde, umfaßte die Aminosäuren 83-173. Allerdings nahmen nur die Aminosäuren 92-144, die dem größten Teil von Exon 3 von SMN entsprechen, eine genau bestimmbare Tertiärstruktur ein (Abb. 4.16 A).

Die dreidimensionale Struktur der Tudor-Domäne ist gekennzeichnet durch eine stark gebogene β -Faltblatt Struktur (Abb. 4.16 B). Fünf Bereiche innerhalb der Tudor Domäne (β 1- β 5, Abb. 4.16 A) bilden eine faßähnliche Form, die an ihrem Boden durch den langgezogenen β 2-Strang begrenzt wird und durch eine Wechselwirkung zwischen dem β 1-Strang und dem Leu 142 des kurzen β 5-Strangs geschlossen wird. Die Stränge β 1- β 4 sind durch kurze Biegungen (engl.: loops) miteinander verbunden, wohingegen die Stränge β 4 und β 5 durch eine helikale Biegung miteinander verknüpft sind. Dies führt dazu, daß der Winkel zwischen diesen beiden Stränge ca. 90° beträgt.

Die Aminosäuren Cys98, Ala100, Ala111, Ile113, Ile116, Cys123, Val125 und Leu141 stabilisieren die Struktur, indem sie einen hydrophoben Kern ausbilden. Da diese Aminosäuren in den Tudor-Domänen verschiedener Proteine konserviert sind (siehe Abb. 4.16 A), kann man davon ausgehen, daß Tudor-Domänen anderer Proteine eine ähnliche dreidimensionale Form annehmen.

Die konservierten aromatischen Aminosäuren Trp102 (loop 1), Tyr109 (β 2), Tyr127 (β 3) und Tyr130 (loop 3) formen zusätzlich eine Ansammlung von hydrophoben Seitenketten zwischen loop 1 und loop 3. Deswegen nehmen beide loops eine klar definierte Struktur an und sind nicht ungeordnet. Das ebenfalls konservierte Gly131 ist dabei wichtig für die distinkte Konformation des loop 3. Die elektrostatische Oberflächenverteilung der Tudor-Domäne (Abb. 4.16 C) zeigt einen hydrophoben Fleck in dieser Region, der in die Bindung von Liganden involviert sein könnte.

Verschiedene negativ geladene Aminosäuren sind im loop1 (Glu 104, Asp 105), im β 4 Strang (Glu 134) und in der helikalen Biegung (Asp 140), die die Stränge β 4 und β 5 verbindet, lokalisiert. Wegen dieser Aminosäurereste, die in vielen Tudor-Domänen Proteinen strikt konserviert sind, weist die Oberfläche der Tudor-Domäne von SMN eine mehrheitlich negative Ladungsverteilung auf (Abb. 4.16 C). In Übereinstimmung mit den biochemischen Daten legen diese strukturellen Eigenschaften der Tudor-Domäne nahe, daß sie eine Protein-Interaktionsdomäne ist und wahrscheinlich nicht direkt mit RNAs wechselwirkt, wie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz ursprünglich vermutet wurde (Ponting, 1997).

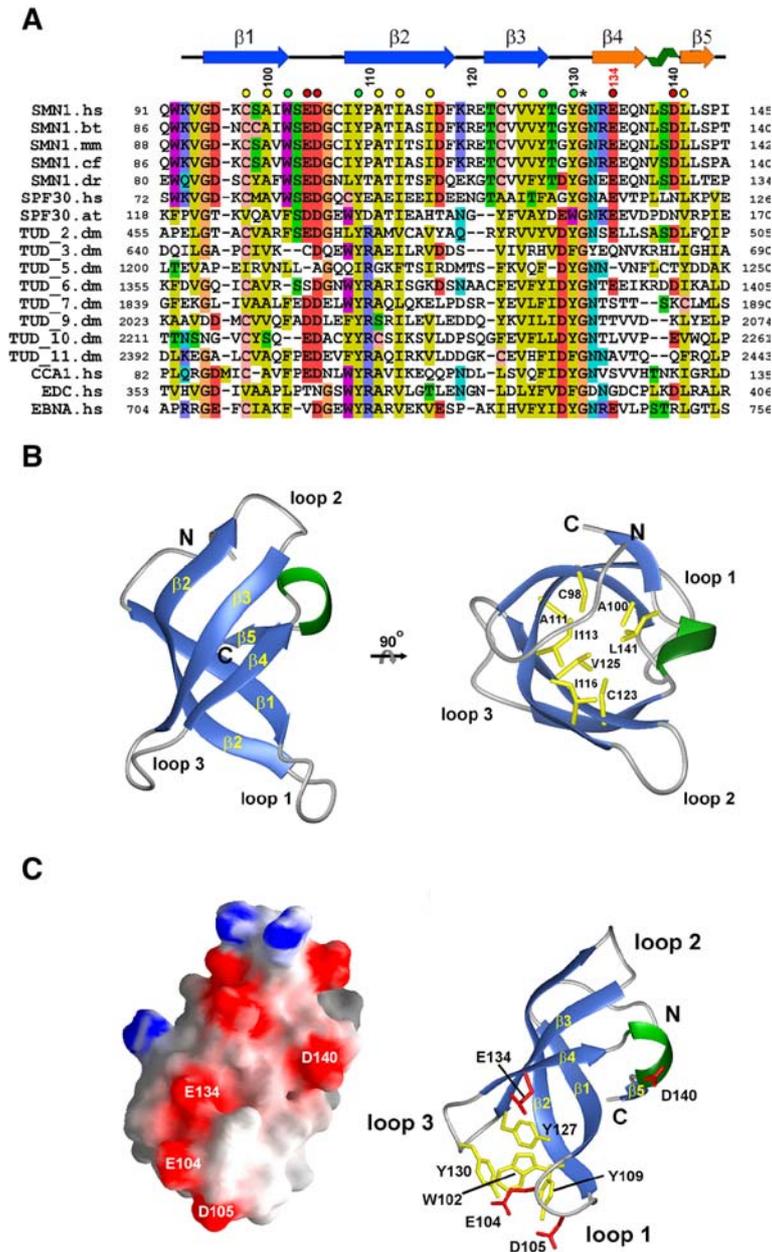


Abb. 5.16: Die NMR-Struktur der Tudor-Domäne von SMN.

A. Sequenzvergleich der Tudor-Domänen verschiedener Proteine. Sekundärstrukturelemente, die durch die NMR-Struktur identifiziert werden konnten, sind oberhalb der humanen SMN-Tudor Sequenz dargestellt. Zwischen verschiedenen Tudor-Domänen konservierte hydrophobe, aromatische und negativ geladene Aminosäuren sind in gelb, grün und rot unterlegt. B. Die Tudor-Domäne hat eine Faß-ähnliche Form, die hauptsächlich von β -Faltblatt-Strukturen gebildet wird. *links*: Die β -Faltblatt-Strukturen sind als blaue Bänder dargestellt, die helikale Biegung ist in grün hervorgehoben. *rechts*: Ansicht der Tudor-Domäne nach 90° Drehung. Die Seitenketten der Aminosäuren, die den hydrophoben Kern der Struktur bilden, sind in gelb eingezeichnet. C. *links*: Darstellung der Oberflächenladungsverteilung der Tudor-Domänen Struktur. Blau und rot zeigen positiv bzw. negativ geladene Bereiche an. *rechts*: Ansicht der Sekundärstrukturelemente der Tudor-Domäne in gleicher Orientierung wie links. Die im Text erwähnten konservierten aromatischen und negativ geladenen Aminosäurereste sind eingezeichnet.

Die NMR-Struktur der Tudor-Domäne erlaubte es erstmals, die strukturellen Grundlagen der SMN-Sm-Protein Interaktion im Detail zu untersuchen. Da es aber nicht möglich war, volle Länge Sm-Proteine rekombinant in *E. coli* zu exprimieren, konnte keine Struktur eines Komplexes bestehend aus der Tudor-Domäne und Sm-Proteinen bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Deswegen sollte die Bindungsdomäne in den Sm-Proteinen für SMN identifiziert werden, um so die Wechselwirkung der beiden Interaktionsdomänen in NMR-Messungen zu analysieren. Im Gegensatz zu den Sm-Proteinen SmE, F und G, die fast nur aus dem N-terminalen Sm-Sequenzmotiv bestehen, besitzen die Sm-Proteine SmB/B', D1 und D3 ausgeprägte C-Termini, die Arginin und Glycin reiche Dipeptidsequenzen enthalten und positiv geladen sind. Da SMN effizient nur an die Sm-Proteine SmB/B', D1 und D3 bindet, erschien es wahrscheinlich, daß es mit den C-Termini dieser Sm-Proteine interagiert (siehe 4.7; Friesen und Dreyfuss, 2000). Daher wurden die C-Termini der Sm-Proteine D1 und D3 als GST-Fusionen exprimiert und ihre Bindung an *in vitro* translatiertes SMN oder verschiedene Tudor-Konstrukte getestet (Abb. 4.17 A). SMN und die Tudor-Domäne banden effizient an die C-Termini von SmD1 (Spuren 3 und 4) und SmD3 (Spuren 6 und 7), wohingegen die Tudor-Domäne mit der (E134K)-Punktmutation mit keinem der beiden Proteinfragmente interagiert (Spuren 5 und 8). Weder SMN noch die Tudor-Domäne banden an GST alleine, was die Spezifität der Bindung anzeigte (Spuren 1 und 2). Im umgekehrten Fall (Abb. 4.17 B) interagiert volle Länge SmD1, aber nicht der N-Terminus von SmD1 (Spuren 1 und 2) mit der Tudor-Domäne von SMN. Diese Interaktion wurde ebenfalls durch die E134K Mutation in der Tudor-Domäne beeinträchtigt (Spuren 3 und 4). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Interaktion von SmD3 mit der Tudor-Domäne erhalten (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente zeigten, daß die C-Termini von SmD1 und SmD3 die Interaktion mit der Tudor-Domäne von SMN vermitteln.

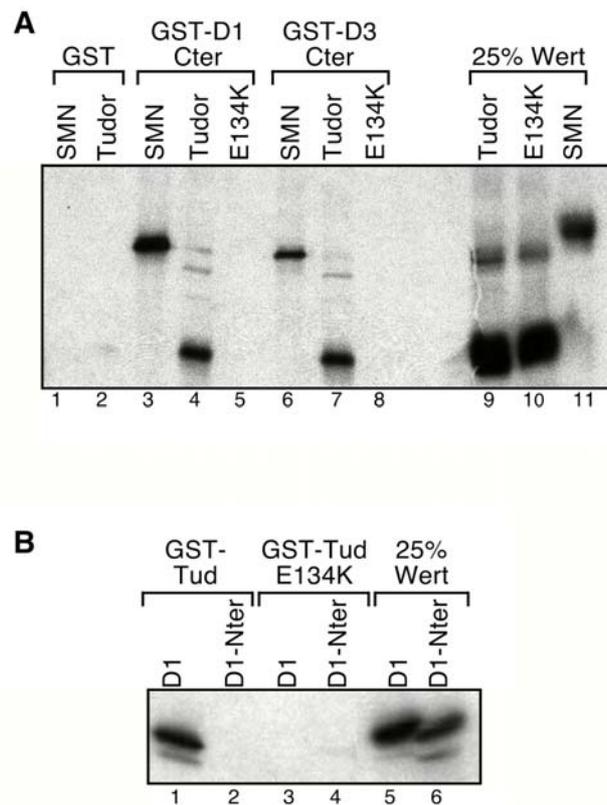


Abb. 4.17: Die Tudor-Domäne von SMN bindet an die C-Termini von SmD1 und SmD3.

A. GST-Sm-Protein-Fragmente, die den C-Terminus von SmD1 (Aminosäuren 68-119, Spuren 3-5) und SmD3 (Aminosäuren, 72-126, Spuren 6-8) umfassen, bzw. GST alleine (Spuren 1 und 2) wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und die Bindung von [³⁵S]-SMN (Spuren 1, 3 und 6), der Tudor-Domäne von SMN (Spuren 2, 4 und 7) bzw. der Tudor-Domäne mit der E134K-Mutation (Spuren 5 und 8) getestet. Die Spuren 9-11 zeigen 25% der eingesetzten Protein-Mengen. B. Bindung von [³⁵S]-SmD1 (Spuren 1 und 3) und des N-Terminus von SmD1 (Aminosäuren 1-68, Spuren 2 und 4) an die Tudor-Domäne von SMN (Spuren 1 und 2) bzw. an die Tudor-Domäne mit der E134K Mutation (Spuren 3 und 4). Die Spuren 5 und 6 zeigen 25% der eingesetzten Protein-Menge.

Es war nun möglich, die Bindungsfläche der Tudor-Domäne für die Sm-Proteine zu lokalisieren und die strukturellen Auswirkungen der E134K Mutation zu analysieren. Dazu wurden Peptidtitrationen der Tudor-Domäne mit dem Peptid (GR)₉GGPRR, das vom C-Terminus von SmD1 abgeleitet wurde, durchgeführt. Aminosäuren, die aufgrund ihrer Interaktion mit dem Peptid ihre

Position veränderten, wurden durch NMR-Messungen der Tudor-Domäne bestimmt (Abb. 4.18 A). Die Gruppe von Dr. Sattler zeigte, daß der C-Terminus von SmD1 an eine Region der Tudor-Domäne bindet, die aus den loops 1 und 3, dem konservierten Rest Gly131 und benachbarten Teilen der Stränge β 1- β 4 besteht (Abb. 4.18 A). Dieser Bereich beinhaltet die konservierten negativ geladenen und aromatischen Aminosäurereste der Tudor-Domäne und weist eine mehrheitlich negative Ladungsverteilung auf (vergleiche Abb. 4.16 C). Die für die Sm-Protein Bindung essentielle Aminosäure Glu134 (E134) liegt genau in diesem negativ geladenen Bereich der Tudor-Domäne. Diese Daten ließen den Schluß zu, daß der durch die E134K Mutation bewirkte Ladungsaustausch die lokale negative Ladungsverteilung innerhalb der Sm-Protein Bindungsstelle verändert und dadurch wahrscheinlich elektrostatische Wechselwirkungen der Tudor-Domäne mit den positiv geladenen C-Termini der Sm-Proteine beeinträchtigt (Abb. 4.18 A).

Diese Vermutung konnte man experimentell überprüfen, indem basierend auf der NMR-Struktur eine Reihe von Punktmutationen in die Tudor-Domäne eingeführt wurden. Alle eingeführten Punktmutationen veränderten die Ladungseigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren. Aufgrund ihrer jeweiligen Position in der Sm-Bindungsstelle sollten einige der Mutationen (E104K und D105K) zu einem Verlust der Sm-Protein Bindung führen. Die anderen Austausche sollten dagegen keinen Einfluß auf diese Wechselwirkung haben (K97E, D105K, R133K, E135K, Q136K, N137A, L141A, S142Q). Für die Bindungsexperimente wurden die SMN-Punktmutanten als GST-Fusionen exprimiert und mit nativen HeLa Sm-Proteine aus TPs inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Sm-Proteine erfolgte durch Western Blotten mit dem anti-Sm-Antikörper Y12 (Abb. 4.18). Wie erwartet konnte durch Y12 die Bindung von SmB/B' sowie SmD1 und SmD2 an GST-SMN und GST-SMN-1/160 nachgewiesen werden (Spuren 10 und 11). Dagegen band keines der Sm-Proteine signifikant an GST-SMN-Tudor-Konstrukte, die die E104K und D105K Mutationen trugen (Spuren 2 und 3). Alle anderen Punktmutationen

fürten erwartungsgemäß nicht zu einem Verlust der Sm-Protein Bindung (Spuren 4-9).

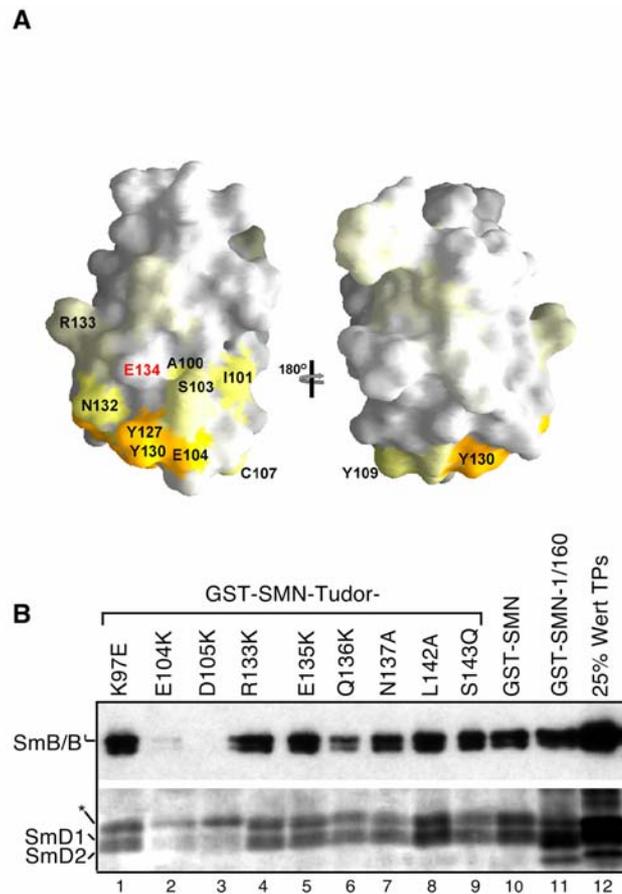


Abb. 4.18: Die Bindungsdomäne für Sm-Proteine liegt im negativ geladenen Bereich der Tudor-Domäne von SMN.

A. Oberflächendarstellung der Tudor-Domäne. *links*: Die Aminosäurereste, die durch die Titration mit dem (GR)₉GGPRR-Peptid ihre Position verändern, sind farbig dargestellt. Die Farbänderung von grau nach orange gibt dabei das zunehmende Ausmaß dieser Positionsveränderung wieder. Die Orientierung der Tudor-Domäne ist die gleiche wie in Abb. 5.16 C. *rechts*: Rückansicht der Oberflächendarstellung der Tudor-Domäne. B. Es wurde die Bindung von nativen, gereinigten Sm-Proteinen (aus TPs) an die Tudor-Domäne, in die unterschiedliche Aminosäureaustausche eingeführt worden waren, analysiert. Die unterschiedlichen Tudor-Domänen wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt (Spuren 1-9). Als Positivkontrollen wurden GST-SMN (Spur 10) und GST-SMN-1/160 (Spur 11) verwendet. Der Nachweis der gebundenen Sm-Proteine erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit dem Y12 Antikörper. Signale, die auf unspezifischen Kreuzreaktivitäten des Antikörpers beruhen, sind mit einem Sternchen markiert.

Durch NMR-Messungen wurde zudem sichergestellt, daß die generelle dreidimensionale Struktur der Tudor-Domäne durch die E134K Mutation nicht verändert wird (Daten nicht gezeigt). Damit bestätigten diese Experimente die Voraussage, daß die Interaktion der Tudor-Domäne mit den positiv geladenen C-Termini der Sm-Proteine SmD1, SmD3 und SmB/B' wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt wird.

4.11 Die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne *in vitro*

Durch die bisher beschriebenen Experimente konnte erstmals gezeigt werden, daß SMN ein essentieller Faktor für die Ausbildung der Sm-core-Domäne *in vivo* ist. Dabei ist die Interaktion der Tudor-Domäne von SMN mit spleißosomalen Sm-Proteinen entscheidend. Demgegenüber gab es den Befund, daß isolierte Sm-Proteine mit einer U snRNA spontan, d. h. ohne assistierende Faktoren, zur Sm-core-Domäne assoziieren können (Raker *et al.*, 1999). Es war daher eine gerechtfertigte Annahme, daß SMN und SIP1 und sehr wahrscheinlich auch der zytosolische SMN-Komplex CSCII *in vivo* eine regulative Funktion haben, die den fehlerlosen Ablauf dieses Vorgangs sicherstellt.

Allerdings stand der Beweis für eine solche Rolle dieses Komplexes und seiner neu identifizierten Komponenten aus. Ein experimentelles System, das die *in vitro* Rekonstitution von U snRNPs in einer SMN-abhängigen Weise erlaubt, wäre ideal geeignet, um die mechanistischen Aspekte der U snRNP Zusammenlagerung *in vivo* zu analysieren. In einem solchen System könnten insbesondere die funktionellen Beiträge der isolierten SMN-Komplexe, der einzelnen Komplexkomponenten und ihrer Interaktionsdomänen während der U snRNP Zusammenlagerung ausgearbeitet werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sind Experimente beschrieben, die, aufbauend auf den bisher erhaltenen Ergebnissen, erste Schritte bei der Etablierung eines solchen *in vitro* U snRNP Rekonstitutionssystems darstellen. Zunächst wurde

untersucht, ob und in welchen Extrakten eine Sm-core-Domäne an der Sm-Bindungsstelle einer U snRNA gebildet wird (Abb. 4.19). Dazu wurde eine U1 snRNA *in vitro* transkribiert, mit [³²P]-UTP radioaktiv markiert und mit unterschiedlichen Zellextrakten für 30 min bei 20° C inkubiert (siehe 3.4.9). Gebildete RNA-Protein Komplexe konnten dann durch native Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Abb. 4.19 A). Als Positivkontrolle für die spezifische Bildung der Sm-core-Domäne wurden gereinigte Sm-Proteine aus TPs mit U1 snRNA inkubiert und in gleicher Weise analysiert (vergleiche Spur 1 und 2; Raker *et al.*, 1999). *E. coli* tRNA und Heparin dienten in jedem Rekonstitutionsexperiment als unspezifische Kompetitoren.

In zytoplasmatischen HeLa-Zellextrakten konnten keine RNA-Protein Komplexe detektiert werden (Spur 3), möglicherweise weil die Sm-Proteine in diesen Extrakten in zu geringen Konzentrationen vorhanden sind. Dagegen führten bereits geringe Mengen eines *Xenopus laevis* Eiextrakts zur Ausbildung eines RNA-Protein Komplexes, der mit der von TPs gebildeten Sm-core-Domäne ko-migrierte (vergleiche Spuren 2 und 4). Zusätzlich wurde ein Komplex beobachtet (Spur 4, als X bezeichnet), dessen Identität unklar ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Rekonstitutionsexperimente der *Xenopus laevis* Eiextrakt verwendet.

Zunächst sollte sichergestellt werden, daß der in Eiextrakten gebildete Protein-RNA Komplex tatsächlich mit der Sm-core-Domäne identisch ist. U1 snRNA wurde zunächst mit Eiextrakten für 30 min bei 20° C inkubiert und dann entweder der Sm-Protein spezifische Antikörper Y12 oder ein anti-Flag Antikörper zu den Reaktionsansätzen gegeben (Abb. 4.19 B). Ohne Zugabe von Antikörpern wurde an der snRNA der RNA-Protein Komplex ausgebildet, der mit der Sm-core-Domäne ko-migriert (vergleiche Spur 1 und 2). Dagegen bewirkte die Inkubation mit dem Y12 Antikörper einen „Supershift“, d. h. der Antikörper band an den gebildeten RNA-Protein Komplex und verhinderte, daß dieser in das Gel einwanderte (Spur 3). Mit dem anti-Flag Antikörper wurde

dagegen kein Supershift beobachtet (Spur 4, mit Sternchen markiert). Dies zeigte, daß die U1 snRNA in Eiextrakten in Protein-RNA Komplexe inkorporiert wird, die spezifisch Sm-Proteine enthalten.

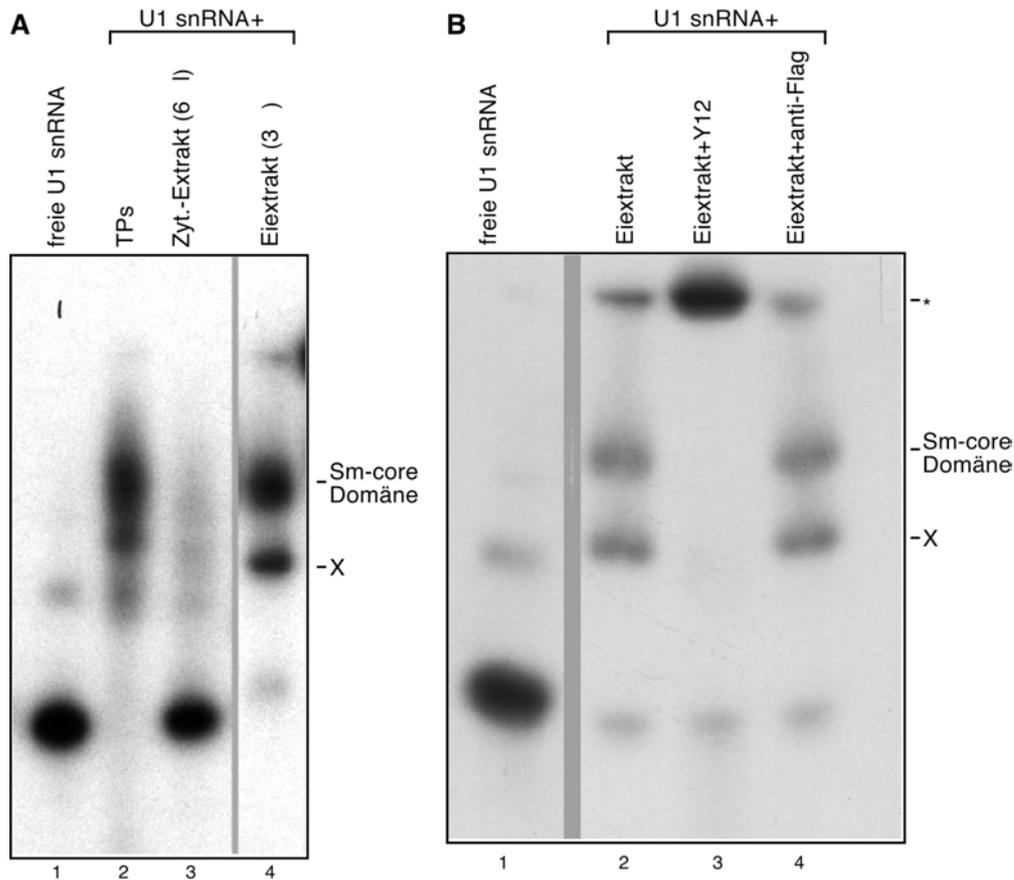


Abb. 4.19: In vitro Zusammenlagerung der Sm-core Domäne.

A. In *Xenopus laevis* Eiextrakten wird wahrscheinlich eine Sm-core Domäne an einer freien U1 snRNA gebildet. *In vitro* transkribierte, [³²P]-markierte U1 snRNA wurde entweder mit Puffer (Spur 1), mit gereinigten Sm-Proteinen aus TPs (Spur 2), zytosolischen HeLa-Extrakten (Spur 3) und *Xenopus laevis* Eiextrakten (Spur 4) bei 20° C inkubiert. RNA-Protein Komplexe wurden durch native Gelelektrophorese und Autoradiographie nachgewiesen. Mit X sind Komplexe bezeichnet, deren Identität unklar ist. B. Die in Eiextrakten gebildeten RNA-Protein Komplexe enthalten Sm-Proteine. [³²P]-markierte U1 snRNA wurde für 20 min bei 20° C mit Eiextrakt inkubiert. Danach wurde der Ansatz geteilt und entweder Puffer (Spur 2), Y12 Antikörper (Spur 3) oder anti-Flag Antikörper (Spur 4) zugegeben. Es wurden je 1 µg Antikörper eingesetzt. Die Analyse der gebildeten RNA-Protein Komplexe erfolgte wie in A. In Spur 1 ist die freie U1 snRNA gezeigt. Der Supershift der Sm-core Domäne durch den Y12 Antikörper ist mit einem Sternchen gekennzeichnet. Komplexe unbekannter Zusammensetzung sind mit X markiert.

Um sicherzustellen, daß die Sm-Proteine in diesen Komplexen tatsächlich die Sm-core-Domäne gebildet hatten, wurde eine U1 snRNA untersucht, deren Sm-Bindungsstelle mutiert ist und die deswegen nicht zu einer Sm-core-Domäne assoziieren kann (U1 Δ Sm; Jarmolowski und Mattaj, 1993). In der Tat konnten keine Protein-RNA-Komplexe detektiert werden, die mit der putativen Sm-core-Domäne ko-migrieren (Abb. 4.20 B, vergleiche Spuren 2 und 5). Zwar band die U1 Δ Sm RNA in Eiextrakten an Proteine (vergleiche Spuren 1 und 5, mit X markiert). Da nach Zugabe von Y12 kein Supershift beobachtet wurde, enthielten diese Komplexe aber keine Sm-Proteine (Daten nicht gezeigt). Die Zusammensetzung dieser Komplexe blieb unklar. Möglicherweise enthalten sie die U1 snRNP spezifischen Proteine. Zusammengefaßt zeigten diese Experimente, daß es in *Xenopus laevis* Eiextrakten die Ausbildung der Sm-core-Domäne rekonstituiert werden kann.

Für die Assoziation isolierter Sm-Proteinen mit der Sm-Bindungsstelle *in vitro* war bekannt, daß sie energieunabhängig bei 4° C und bei 20° C gleichermaßen effizient abläuft (Raker *et al.*, 1999). Ob dies auch für die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* gilt, war unklar. Der zytosolische SMN-Komplex CSCII enthält mit Gemin3/dp103 und Hsc70 zwei Proteine, für die eine ATPase Aktivität entweder vermutet wird oder bekannt ist (Grundhoff *et al.*, 1999; Johnson und Craig, 1997). Insofern lag die Vermutung nahe, daß die Ausbildung der Sm-core-Domäne *in vivo* ein energieverbrauchender Prozeß ist. Um dies zu testen wurde [³²P]-U1 snRNA mit Eiextrakt bei 4° C oder 20° C inkubiert (Abb. 4.20 A). Es zeigte sich, daß die U1 snRNA bei 4° C nicht mit den endogenen Sm-Proteinen assoziierte, sondern mit der freien RNA komigrierte (Spuren 1 und 3). Bei 20° C wurde an der U1 snRNA dagegen die Sm-core-Domäne gebildet (Spur 2). Die *in vivo* Ausbildung der Sm-core-Domäne ist damit energieabhängig. Inwieweit diese Energieabhängigkeit durch Gemin3/dp103 und Hsc70 vermittelt wird, ist momentan aber noch unklar.

Eine der zentralen Fragen bei der Entwicklung des Rekonstitutionssystems war, ob die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vitro* von SMN und SIP1 abhängig

ist und damit die *in vivo* Situation widerspiegelt. Bei der Beantwortung dieser Frage gab es

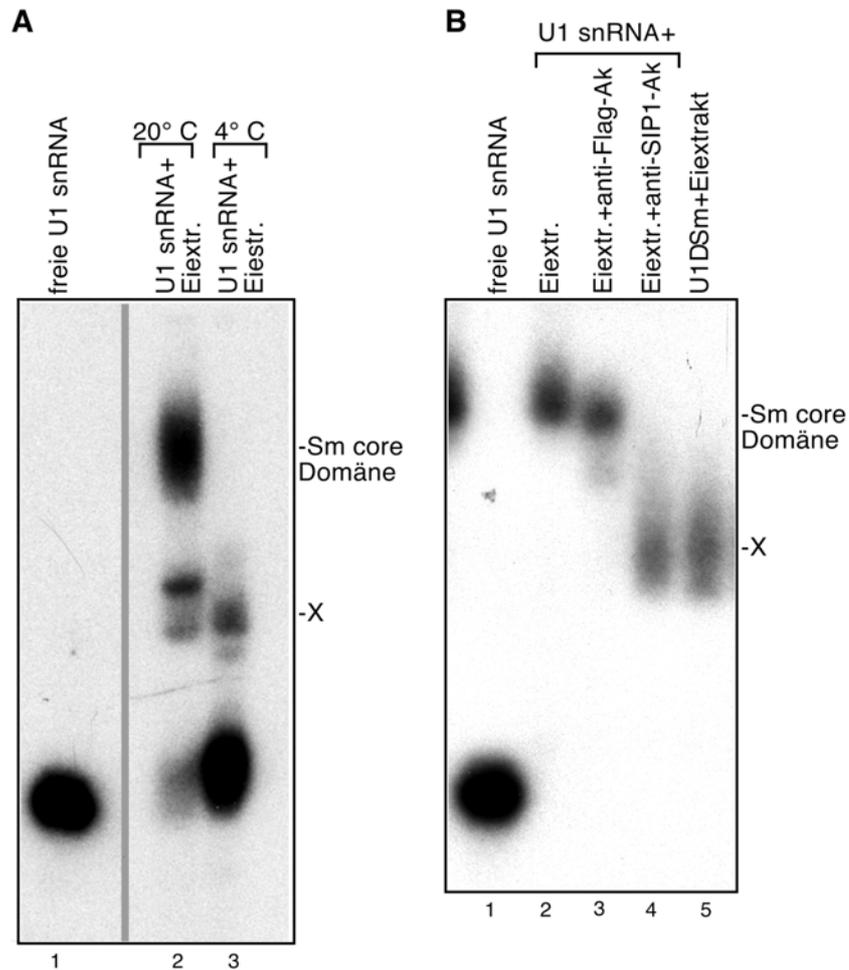


Abb. 4.20: Die *in vitro* Zusammenlagerung der Sm-core Domäne ist energieabhängig und wird durch SIP1-spezifische Antikörper blockiert. A. [32 P]-markierte U1 snRNA wurde mit Eiextrakt für 30 min bei entweder 20° C (Spur 2) oder 4° C (Spur 3) inkubiert. Die Bildung der Sm-core Domäne wurde durch native Gelelektrophorese und Autoradiographie nachgewiesen. In Spur 1 ist die freie U1 snRNA geladen. Komplexe unbekannter Zusammensetzung sind mit X markiert. B. [32 P]-markierte U1 snRNA wurde mit Puffer, mit Eiextrakt alleine (Spur 2) oder mit Eiextrakt und anti-Flag Antikörper (1 μ g, Spur 3) bzw. anti-SIP1-Antikörpern (1 μ g, Spur 4) inkubiert. Parallel dazu wurde *in vitro* transkribierte, [32 P]-markierte U1 Δ Sm-RNA mit Eiextrakt inkubiert (Spur 5). Der Analyse der RNA-Protein Komplexe erfolgte wie in A.

das experimentelle Problem, daß keine SMN-spezifischen Antikörper zur Verfügung standen, die das *Xenopus laevis* SMN erkennen. Die vorhandenen Mengen der anti-Tudor-Antikörper (4.9) reichten für die entsprechenden Experimente nicht aus. Um dennoch Hinweise auf die SMN-Abhängigkeit zu bekommen, wurde überprüft, ob die Bildung der Sm-core-Domäne durch anti-SIP1 Antikörper blockiert wird (Abb. 4.20 B). SIP1 selbst ist ein essentieller *in vivo* U snRNP Zusammenlagerungsfaktor und eng mit SMN assoziiert (Fischer *et al.*, 1997). Für diese Experimente wurden die Eiextrakte erst für 10 min bei 20° C mit anti-SIP1- oder anti-Flag-Antikörpern vorinkubiert. Dann wurde die [³²P]-markierte U1 snRNA zugegeben und die Reaktion für weitere 30 min bei 20° C inkubiert.

Die Inkubation mit anti-Flag Antikörpern hatte keine Auswirkung auf die Ausbildung der Sm-core-Domäne (Spur 3). Dagegen blockierten anti-Sip1 Antikörper die Ausbildung der Sm-core-Domäne (Spur 4). Ähnliche Ergebnisse erhielt man mit GIP1 spezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt). Auch wenn der letztendliche Beweis dafür aussteht, ist es damit wahrscheinlich, daß die Zusammenlagerung von U snRNPs in Eiextrakten von SMN und seinen assoziierten Proteinen abhängig ist und Energie benötigt. Damit bestehen gute Chancen, daß durch Depletions- und Readditionsexperimente die funktionelle Rolle von SMN, seinen interagierenden Proteinen und der isolierten SMN-Komplexe während der U snRNP Zusammenlagerung in Zukunft detailliert charakterisiert werden können.