

## 5 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Annahme, daß die Zusammenlagerung von spleißosomalen U snRNPs *in vivo* von Faktoren wie SMN, dem Produkt des Krankheitsgens der SMA, und mit ihm assoziierten Proteinen abhängig ist. Demgegenüber gab es den Befund, daß die Assoziation von isolierten Sm-Proteinen mit einer U snRNA *in vitro* ein spontaner Prozeß ist (Raker *et al.*, 1999). Mit dieser Arbeit konnte der Nachweis geführt werden, daß SMN in der Tat essentiell für die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* ist. Darüber hinaus konnten neue mit SMN assoziierte Faktoren identifiziert und ein zytosolischer SMN-Komplex (CSCII) gereinigt werden, dessen Protein-Zusammensetzung konsistent mit einer Funktion von SMN während der U snRNP Biogenese ist.

### 5.1 SMN ist ein essentieller U snRNP Zusammenlagerungsfaktor

#### 5.1.1 Die Tudor-Domäne von SMN bindet direkt an Sm-Proteine

Um einen Einblick in die putative Funktionsweise von SMN während der Zusammenlagerung von spleißosomalen U snRNPs zu gewinnen, wurde die Interaktion von SMN mit Sm-Proteinen im molekularen Detail charakterisiert. Biochemische Bindungsexperimente zeigten, daß die Tudor-Domäne von SMN für die direkte Bindung von spleißosomalen Sm-Proteinen ausreichend ist (Abb. 4.12). Diese Aussage wird durch folgende experimentelle Beobachtungen unterstützt: Erstens binden nur SMN-Fragmente, die die Tudor-Domäne (Aminosäuren 90-160) enthalten, an *in vitro* translatierte Sm-Proteine. Fragmente, die extreme N- oder C-terminale Bereiche von SMN umfassen, tun dies nicht (Abb. 4.12 und 4.13). Zweitens binden Sm-Proteine, die aus gereinigten U snRNPs isoliert wurden, direkt an die Tudor-Domäne (Abb. 4.13). Drittens führt eine Punktmutation innerhalb der Tudor-Domäne nur zu einem Verlust der Bindung an die Sm-Proteine SmB/B<sup>c</sup> und SmD1. Die

Oligomerisierung von SMN und die Interaktion mit SIP1 war durch diese Mutation dagegen nicht betroffen (Abb. 4.13). Viertens blockieren Antikörper, die spezifisch die Tudor-Domäne von SMN erkennen, die Bindung der Sm-Proteine an SMN (Abb. 4.14).

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu Studien, die eine Rolle des C-Terminus von SMN für die Sm-Protein Bindung vorschlagen. Liu et al. (1997) zeigten, daß ein Überschuß an Peptiden, die dem Exon 6 von SMN entsprechen, die Bindung der Sm-Proteine kompetieren können. In dieser Studie wurde aber keine direkte Bindung der Sm-Proteine an den C-Terminus von SMN nachgewiesen. Möglicherweise beruhen diese Ergebnisse auf indirekten und/oder unspezifischen Effekten der für die Konkurrenz verwendeten Peptide. Pellizzoni et al. (1999) zeigten, daß SMA verursachende Deletionen und Punktmutation im C-terminalen Exon 6 von SMN zu einer reduzierten Bindung der Sm-Proteine führt. Allerdings beeinträchtigen diese Mutationen auch die Fähigkeit von SMN zu oligomerisieren, mit Gemin3/dp103 und RNA-Helicase A zu interagieren und im Kern zu lokalisieren (Frugier *et al.*, 2000; Lorson *et al.*, 1998a; Pellizzoni *et al.*, 2001). Damit scheinen Veränderungen im C-Terminus von SMN die generelle Struktur des Proteins zu verändern und damit die meisten seiner Funktionen zu beeinträchtigen. Vor diesem Hintergrund und in Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche, welche die Fähigkeit der Tudor-Domäne, Sm-Proteine zu binden, aus vier unterschiedlichen experimentellen Ansätzen ableiten, wird davon ausgegangen, daß die Tudor-Domäne von SMN in der Tat ausreichend für eine direkte Wechselwirkung mit spleißosomalen Sm-Proteinen ist. Diese Aussage wird auch durch die NMR-Strukturanalyse der Tudor-Domäne gestützt (siehe unten). Es ist allerdings denkbar, daß die durch den C-Terminus vermittelte Oligomerisierung von SMN die Effizienz der Interaktion mit Sm-Proteinen beeinflusst (Lorson *et al.*, 1998a; Pellizzoni *et al.*, 1999).

Die biochemische Analyse zur Bestimmung der Bindungsdomäne der Sm-Proteine für SMN zeigte, daß SMN an die Arginin- und Glycin-reichen (RG-

reichen) C-Termini von SmB/B', SmD1 und SmD3 bindet (Abb. 4.16, (Friesen und Dreyfuss, 2000)). Dieser Befund konnte die Beobachtung erklären, daß nur diese Sm-Proteine effizient mit SMN wechselwirken (Friesen und Dreyfuss, 2000). Im Gegensatz zu SmB/B', D1 und D3 besitzen SmE, F, G und D2 nämlich keine solchen C-terminalen Strukturen, sondern bestehen nahezu ausschließlich aus dem konservierten, N-terminalen Sm-Sequenzmotiv. Daß trotzdem eine schwache Wechselwirkung von SMN mit den Sm-Proteinen SmE und D2 beobachtet wird (Daten nicht gezeigt; Liu *et al.*, 1997), kann möglicherweise durch die Struktur der Tudor-Domäne von SMN erklärt werden (siehe unten).

Interessanterweise scheint es eine Eigenschaft der Tudor-Domäne von SMN zu sein, auch mit Proteinen anderer Ribonukleoproteinpartikel (RNP) zu interagieren, die wie Sm-Proteine über RG-reiche Sequenzen verfügen. Dabei handelt es sich um Fibrillarin, eine Komponente von snoRNPs, und das Sm-Protein ähnliche LSm4-Protein des U6 snRNP. Diese beiden Proteine binden über ihre RG reichen Sequenzen an die Tudor-Domäne von SMN und die E134K Mutation blockiert spezifisch diese Wechselwirkung (Daten nicht gezeigt; Friesen und Dreyfuss, 2000; Jones *et al.*, 2001). Die funktionelle Relevanz dieser Interaktionen wird später diskutiert.

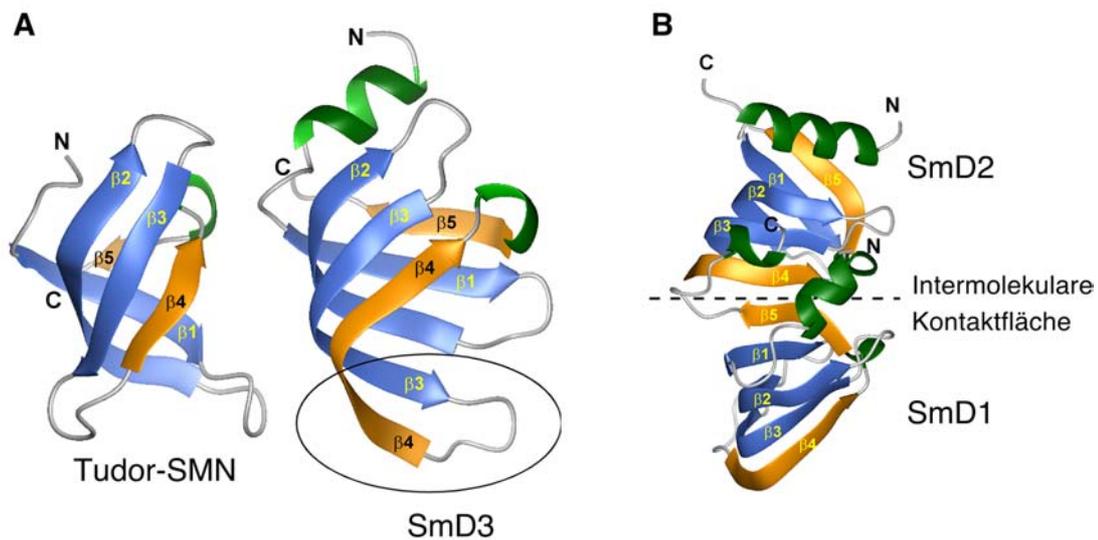
### **5.1.2 Die Struktur der Tudor-Domäne von SMN**

Tudor-Domänen sind durch Homologie-Vergleiche in verschiedenen Proteinen höherer Eukaryonten gefunden worden, wobei als Prototyp das Tudor-Protein von *Drosophila melanogaster* gilt (Ponting, 1997). Dieses Protein besteht fast ausschließlich aus zehn aneinandergereihten Tudor-Domänen. Auch wenn die Funktion des Tudor-Proteins selbst unklar ist, konnte deswegen davon ausgegangen werden, daß es sich um eine funktionell relevante Domäne handelt. Da viele der Proteine, die eine Tudor-Domäne enthalten, in RNA-metabole Prozesse involviert sind, wurde vorgeschlagen, daß diese Proteine entweder direkt oder indirekt über ihre Tudor-Domäne mit RNAs interagieren

(Ponting, 1997). Insofern war es ein überraschender Befund, daß die Tudor-Domäne von SMN Protein-Protein Interaktionen vermittelt und nicht mit RNA wechselwirkt. Die NMR-Strukturanalyse der Tudor-Domäne von SMN lieferte die molekularen Grundlagen für diese Beobachtung.

Die Tudor-Domäne von SMN nimmt eine faßähnliche Form ein, die vor allem von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen gebildet wird und eine mehrheitlich negative Ladungsverteilung aufweist. Aminosäuren, die entscheidende Beiträge zur Stabilisierung dieser Struktur liefern, sind zwischen verschiedenen Tudor-Domänen konserviert (Abb. 4.16). Diese Eigenschaften lassen zwei Schlußfolgerungen zu. Zum einen werden Tudor-Domänen anderer Proteine eine generell ähnliche, dreidimensionale Form aufweisen. Zum anderen verfügen Tudor-Domänen damit über die strukturellen Voraussetzungen, Interaktionen mit Proteinen, aber nicht mit RNAs einzugehen. Es kann also davon ausgegangen werden, daß es eine generelle Eigenschaft dieser Domäne ist, Protein-Protein Wechselwirkungen zu vermitteln. Entsprechend konnte eine Bindung der SMN-Tudor Domäne an U snRNA oder homopolymere RNA nicht nachgewiesen werden (Lorson und Androphy, 1998b).

Die NMR-Strukturanalyse zeigte zudem, daß die Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt wird. Die positiv geladenen C-Termini von SmD1 und D3 binden an den negativ geladenen Bereich der Tudor-Domäne (Abb. 4.18). Der SMA verursachende Aminosäureaustausch Glutamat zu Lysin in der Position 134 liegt genau in dem Bereich, an den die Sm-Proteine SmD1 und D3 binden, und führt zu einer Veränderung der Ladungsverteilung, wodurch die Bindung der erwähnten Sm-Proteine verhindert wird. Er bewirkt aber nicht eine generelle Veränderung der Struktur der Tudor-Domäne, so daß auch das komplette SMN-Protein seine dreidimensionale Struktur beibehalten sollte. In Übereinstimmung damit führen andere Aminosäureaustausche, die ebenfalls eine Ladungsveränderung in der Bindungstasche hervorrufen, auch zu einem Verlust der Sm-Protein Bindung (Abb. 4.18). Zusammenfassend läßt sich damit sagen, daß die aus der NMR-



**Abb. 5.1:** Die Tudor-Domäne von SMN ähnelt dem Sm-Fold.

A. Vergleich der Strukturen der Tudor-Domäne und des SmD3-Proteins (Kambach *et al.*, 1999). Beide Strukturen haben eine ähnliche Form gemeinsam, die durch fünf, stark gebogene  $\beta$ -Faltblattstränge gebildet wird. Der Kreis markiert die Verlängerungen im  $\beta 3$  und  $\beta 4$  Strang von SmD3, die in der Tudor-Domäne von SMN nicht beobachtet werden. B. Röntgenkristallstruktur des Heterodimers SmD1.D2. Die  $\beta$ -Stränge, die die intermolekulare Wechselwirkung vermitteln, sind in orange dargestellt. Die  $\beta$ -Stränge  $\beta 4$  von SmD1 und  $\beta 5$  von SmD2 (ebenfalls in orange) interagieren in analoger Weise mit benachbarten Sm-Proteinen der heptameren Sm-core Domäne.

Strukturanalyse und den biochemischen Bindungsexperimenten gewonnenen Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen sich ergänzen und gegenseitig bestätigen.

Überraschenderweise ähnelt die dreidimensionale Form der Tudor-Domäne der Struktur des Sm-Sequenzmotivs der verschiedenen Sm-Proteine („Sm-Fold“), obwohl SMN und Sm-Proteine auf Aminosäureebene keinerlei Sequenzähnlichkeit aufweisen (siehe Abb. 5.1 A; Kambach *et al.*, 1999). Zwar sind im Vergleich zu SmD3 die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 5$  der Tudor-Domäne von SMN wesentlich kürzer und  $\beta 3$  und  $\beta 5$  von SMN deswegen weniger stark gebogen. Allerdings sind diese Bereiche auch zwischen den einzelnen Sm-Proteinen von variabler Länge. Innerhalb des Rings der Sm-core-Domäne interagieren die verschiedenen Sm-Proteine jeweils über das  $\beta$ -Faltblatt 4 des

einen Sm-Proteins mit dem  $\beta$ -Faltblatt 5 des anderen Sm-Proteins (siehe Abb. 5.1 B und 2.4 A). Es ist daher eine interessante Spekulation, daß SMN neben den RG-reichen C-Termini auch an den Sm-Fold von Sm-Proteinen in der gleichen Weise bindet, wie dies die Sm-Proteine untereinander tun. Da eine solche Interaktion mit dem Sm-Fold auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, wäre sie sehr viel schwächer als die elektrostatische Interaktion mit den C-Termini der Sm-Proteine. Im Falle von SmD1 und D3 kann sie wahrscheinlich deswegen nicht nachgewiesen werden (4.10; Friesen und Dreyfuss, 2000). Dieses Modell wird aber durch die Beobachtung gestützt, daß die Sm-Proteine SmE und D1 und die LSm-Proteine LSm2, 6 und 7, die alle keine RG reichen C-Termini besitzen, mit geringer Affinität an SMN binden (Liu *et al.*, 1997; Friesen und Dreyfuss, 2000). SMN bindet damit möglicherweise Sm-Proteine in differentieller Weise und verschiedenen Orientierungen. Diese Eigenschaft von SMN hat interessante Auswirkungen für die Funktion der Tudor-Domäne während der Zusammenlagerung von U snRNPs (siehe unten).

### **5.1.3 Die Funktion der Tudor-Domäne bei der Bildung der Sm-core-Domäne von U snRNPs**

Durch Injektionsstudien in *Xenopus laevis* Oozyten mit SIP1-spezifischen Antikörpern war gezeigt worden, daß die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* von Faktoren abhängig ist, die im reifen Partikel nicht angetroffen werden (Fischer *et al.*, 1997). Da in analogen Experimenten mit monoklonalen SMN-spezifischen Antikörpern eine ähnliche Funktion SMN nicht zugewiesen werden konnte, war unklar, ob SMN ebenfalls essentiell für die Bildung von U snRNPs *in vivo* ist oder daran nur über seine Interaktion mit SIP1 teilnimmt (Fischer *et al.*, 1997).

Mit den in der vorliegenden Arbeit hergestellten Antikörpern, die spezifisch die Tudor-Domäne von SMN erkennen (Abb. 4.14), war es möglich, diese Frage im *Xenopus laevis* Oozyten-System experimentell zu untersuchen. Es konnte

gezeigt werden, daß die Tudor-spezifischen Antikörper nach Injektion ins Zytoplasma von *Xenopus laevis* Oozyten die Bildung der Sm-core-Domäne an den snRNAs U1 und U5 verhindern (Abb. 4.15). Damit wurde erstmals nachgewiesen, daß SMN ein essentieller Faktor für einen spezifischen Schritt der Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* ist. Da die injizierten Antikörper die Interaktion von SMN und Sm-Proteinen *in vitro* blockieren und die Tudor-Domäne die Bindung der Sm-Proteine an SMN vermittelt (Abb. 4.14 und 4.13), ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Wechselwirkung eine der entscheidenden molekularen Grundlagen für die Funktion von SMN während der Bildung der Sm-core-Domäne ist. Für die funktionelle Relevanz dieser Interaktion *in vivo* spricht auch, daß Mutationen in der Tudor-Domäne, die spezifisch die Bindung der Sm-Proteine inhibieren, zu SMA führen (Abb. 4.13). Angesichts dieser Befunde stellt sich die Frage, welche genaue Funktion der Tudor-Domäne bei der Bildung der Sm-core-Domäne zukommt.

*In vitro* Experimente mit isolierten Sm-Proteinen haben gezeigt, daß die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne von U snRNPs durch die aufeinanderfolgende Interaktion von heterooligomeren Sm-Protein-Komplexen gekennzeichnet ist. Die Heterooligomere SmE.F.G binden an SmD1.D2. Dieser Komplex assoziiert mit der U snRNA unter Ausbildung der Sm-subcore Domäne. Nach Einbau des Heterodimers SmB/B'.D3 ist die Bildung der Sm-core-Domäne abgeschlossen (Abb. 1.6; Raker *et al.*, 1996). Die Assoziation der isolierten Sm-Proteine mit der U snRNA verläuft *in vitro* spontan (Raker *et al.*, 1999). SMN und mit ihm assoziierte Faktoren haben *in vivo* daher wahrscheinlich eine regulatorische Rolle während dieses Prozesses.

Es ist momentan unklar, ob solche SMN-Komplexe *in vivo* Sm-Proteine für die Ausbildung der heterooligomeren Komplexe aktivieren, ob sie die Bildung dieser Komplexe vermitteln oder die Assoziation mit der U snRNA beeinflussen. Anhand der dargestellten Daten erscheint es aber eine gerechtfertigte Spekulation, daß die Tudor-Domäne von SMN die Funktion einer Protein-Plattform hat, auf der diese Prozesse ablaufen. Dabei könnte SMN

durch Bindung der Tudor-Domäne an die RG-reichen C-Termini Sm-Proteine bzw. Sm-Protein-Komplexe in einer Konformation fixieren, die ihre Interaktion mit den Sm-Folds anderer Sm-Proteine erlaubt. Auch eine transiente Wechselwirkung der Tudor-Domäne mit Sm-Proteinen, die nicht über diese RG-reichen Sequenzen verfügen, ist vorstellbar (siehe 5.1.2). Dieses Modell ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, daß die Interaktion zwischen der Tudor-Domäne und Sm-Proteinen reguliert zu sein scheint. Die RG-reichen Sequenzen von SmB/B', D1 und D3 sind am Arginin symmetrisch dimethyliert (Brahms *et al.*, 2000). Erst kürzlich ist gezeigt worden, daß SMN abhängig vom Methylierungsstatus dieser Sequenzen stärker oder schwächer mit Sm-Proteinen interagiert (Friesen *et al.*, 2001). Es wird eine der wichtigen, zukünftigen Fragen sein, ob die Wechselwirkung der Tudor-Domäne mit Sm-Proteinen *in vivo* von der spezifischen Methylierung der Sm-Proteine abhängig ist und welche Auswirkungen dies auf die Zusammenlagerung von U snRNPs hat.

Die Tudor-Domäne von SMN fungiert möglicherweise auch bei der Bildung anderer RNPs als eine Plattform, auf der die regulierte Assoziation von Komponenten dieser RNPs abläuft. Wie erwähnt kann SMN mit den RG-reichen Sequenzen des U6 snRNP-spezifischen LSm-Proteins LSm4 und des snoRNP-spezifischen Proteins Fibrillarin interagieren. Für die Interaktion mit Fibrillarin ist gezeigt worden, daß sie *in vivo* auftritt (Jones *et al.*, 2001). Dieser Nachweis steht für Lsm4 noch aus (Daten nicht gezeigt; Friesen und Dreyfuss, 2000). Es ist ebenfalls unklar, ob die Interaktion von SMN mit Fibrillarin und Lsm4 entscheidend für die Bildung der entsprechenden RNPs ist und ob sie vom Methylierungsstatus dieser Proteine abhängt. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse ist es aber eine reizvolle Hypothese, daß die Fähigkeit der Tudor-Domäne, spezifisch mit dimethylierten, RG-reichen Proteinen zu interagieren, die Grundlage für eine generelle Funktion von SMN als essentieller Faktor bei der Zusammenlagerung von RNPs ist.

## **5.2 Die Zusammensetzung von CSCII deutet auf eine Rolle bei der Zusammenlagerung von U snRNPs hin**

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, daß SMN essentiell für die Bildung der Sm-core-Domäne von U snRNPs ist. Ausgehend von der Annahme, daß SMN *in vivo* in Form von makromolekularen Komplexen zusammen mit anderen Proteinen seine Funktion während dieses Prozesses ausübt, wurde zunächst versucht, solche Komplexe biochemisch zu reinigen und ihre Protein-Zusammensetzung zu bestimmen. Mit der Etablierung eines zellfreien Systems, das die *in vitro* Rekonstitution von U snRNPs in einer SMN-abhängigen Weise erlaubt, sollte dann die genaue Funktion der einzelnen SMN-Komplexe und ihrer Komponenten während der Zusammenlagerung von U snRNPs charakterisiert werden.

### **5.2.1 CSCII ist ein strukturell intakter, einzelner Komplex mit mindestens 14 Proteinkomponenten**

In zytosolischen HeLa-Extrakten konnten mindestens zwei SMN-Komplexe mit molekularen Massen von  $\leq 670$  kDa (CSCI) und  $\approx 300$  kDa (CSCII) identifiziert werden (Abb. 4.4). Diese Daten sind mit anderen Studien konsistent. Charroux et al. (2000) detektierten in zytosolischen HeLa S100 Extrakten einen SMN-Komplex mit einer Masse von ca. 670 kDa und einen wesentlich weniger abundanten SMN-Komplex mit einer Masse von  $\leq 230$  kDa. Das ähnliche Fraktionierungsverhalten dieses größeren SMN-Komplexes und CSCI legt nahe, daß es sich um identische Komplexe handelt. Der  $\leq 230$  kDa Komplex ist dagegen sicher nicht identisch mit dem CSCII Komplex, da die beiden Proteine Gemin3/dp103 und GIP1/Gemin4 nur in CSCII als Komponenten vorhanden sind (siehe unten; Charroux *et al.*, 2000). Möglicherweise sind unterschiedliche Präparationsmethoden der zytosolischen HeLa-Extrakte dafür entscheidend, daß CSCII nur in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden kann.

Die Reinigung und Bestimmung der Protein-Zusammensetzung von CSCII zeigte, daß dieser zytosolische SMN-Komplex aus mindestens 14 Proteinen besteht (siehe unten). Es ist offensichtlich, daß die einzelnen Komponenten einen Komplex bilden sollten, der eine größere molekulare Masse als 300 kDa aufweist. Mehrere Argumente sprechen aber dafür, daß es sich bei CSCII nicht um mehrere kleine, sondern einen einzelnen, strukturell intakten SMN-Komplex handelt. Durch Ionenaustauscher-chromatographie getrennte CSCI und CSCII Komplexe ko-fraktionierten exakt mit den SMN-Komplexen des zytosolischen HeLa-Extrakts (Abb. 4.5). SIP1, das am besten charakterisierte SMN interagierende Protein, war Bestandteil dieser Komplexe (Abb. 4.5). Diese Daten lassen zunächst den Schluß zu, daß die CSCI und CSCII Komplexe während der Reinigung strukturell intakt bleiben. SMN und SIP1 ko-eluierten exakt von allen verwendeten Ionenaustauschersäulen, wenn lineare Salzgradienten für die Isolierung der zytosolischen SMN-Komplexe benutzt wurden (Daten nicht gezeigt). Dies galt auch, wenn CSCII durch Gelfiltration aufgetrennt wurde (Abb. 4.5). Angesichts dieser Beobachtungen ist es sehr unwahrscheinlich, daß CSCII tatsächlich aus mehreren Komplexen mit exakt gleicher Größe und denselben biochemischen Eigenschaften besteht. Da die Auftrennung von Protein-Komplexen in der Gelfiltration vor allem vom Durchmesser der zu trennenden Partikel abhängt, ist CSCII wahrscheinlich ein einzelner Komplex, der aus dicht assoziierten Proteinen besteht.

### **5.2.2 CSCII enthält neue SMN-assoziierte Proteine**

CSCII besteht aus mindestens 14 Proteinen, bei denen sich es um SMN, SIP1, U1A, Gemin3/dp103, GIP1/Gemin4, unrip, Hsc70, p175 sowie die Sm-Proteine SmD1, D2, E, F und G und das nicht identifizierte Protein p18 handelt. Mit GIP1/Gemin4, unrip, Hsc70 und p175 konnten vier Faktoren identifiziert werden, die bisher nicht in Zusammenhang mit SMN und SIP1 nachgewiesen worden waren. Es mußte daher zunächst sichergestellt werden, daß es sich bei den neu identifizierten Proteinen in der Tat um spezifisch mit SMN assoziierte

Faktoren handelt. Eine Reihe von Beobachtungen sprechen dafür. GIP/Gemin4 bindet an Gemin3/dp103 (Abb. 4.8), welches wiederum direkt mit SMN interagiert (Charroux *et al.*, 1999). Zudem ko-lokalisieren diese beiden Proteine mit SMN im Zytoplasma und in Gems (Charroux *et al.*, 1999; Charroux *et al.*, 2000). Da SMN jeweils mit unrip, Hsc70 und p175 über die entsprechenden Antikörper ko-präzipitiert werden konnte, ist ebenfalls gesichert, daß diese Proteine *in vivo* spezifisch mit SMN assoziiert sind (Abb. 4.9). Es gelang aber nicht, durch *in vitro* Bindungsexperimente direkte Interaktionspartner des SMN-Komplexes für unrip, Hsc70 und p175 zu identifizieren. Dies könnte daran liegen, daß unrip und p175 rekombinant nicht in einem funktionellen Zustand exprimiert werden konnten. Eine andere Möglichkeit ist, daß diese Proteine komplexe Bindungsoberflächen auf dem CSCII-Komplex erkennen. Die auffälligste strukturelle Eigenschaft von unrip ist das Vorhandensein von sechs WD-Motiven (Hunt *et al.*, 1998). Diese Motive treten als repetitive Einheiten in Proteinen auf und bilden Propeller-ähnliche Strukturen bestehend aus  $\beta$ -Faltblättern, die Protein-Protein Wechselwirkungen vermitteln können (Smith *et al.*, 1999). Insofern ist es denkbar, daß unrip über seine WD-Motive in den SMN-Komplex integriert ist. Quervernetzungsexperimente mit den isolierten Komplexen werden Aufschluß über die Interaktionspartner von unrip, Hsc70 und p175 geben.

In einer Reihe von Studien sind *in vitro* und *in vivo* Wechselwirkungen von SMN mit dem poly-Prolin bindenden Protein Profilin (Giesemann *et al.*, 1999), mit dem Zink-Finger Protein ZPR1 (Gangwani *et al.*, 2001), mit dem Transkriptionsaktivator E2 (Strasswimmer *et al.*, 1999) und Komponenten der zellulären Transkriptions-maschinerie (RNA-Helicase A und RNA-Polymerase II) beobachtet worden (Pellizzoni *et al.*, 2001). Keines dieser Proteine konnte im CSCII Komplex identifiziert werden. Gleiches gilt für die nukleären SMN-Komplexe NSCI und NSCII (Manuskript in Vorbereitung; Meister *et al.*, 2000). Möglicherweise sind diese Komponenten in den erwähnten Komplexen nur in

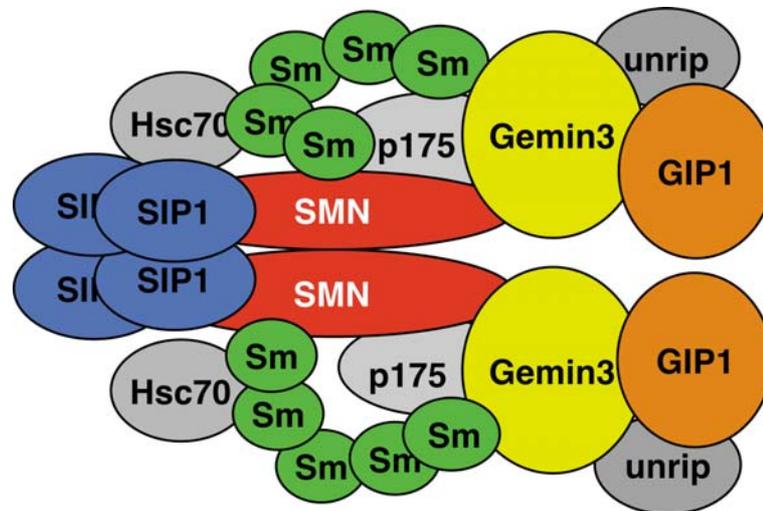
sub-stöchiometrischen Mengen vorhanden oder sie sind Bestandteile von weniger abundanten, bisher nicht identifizierten SMN-Komplexen.

### **5.2.3 Die Struktur des CSCII Komplexes ist für SMN-Komplexe repräsentativ**

Mit der Reinigung von CSCII konnte ein Überblick über die mit SMN *in vivo* assoziierten Faktoren gewonnen werden. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Faktoren während der Zellextrakt-Aufarbeitung und der Reinigung des Komplexes verloren gehen. Anhand der ermittelten Daten läßt sich aber ein Modell der molekularen Organisation dieses Komplexes ableiten, das zumindest die Kernstruktur von CSCII richtig wiedergeben sollte. Durch biochemische Bindungs-experimente konnte gezeigt werden, daß SMN über zwei N-terminale Bindungsstellen für SIP1 und eine sich daran anschließende Oligomerisierungsdomäne verfügt (Abb. 4.12). Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit anderen Studien (Liu *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2000). Daneben besitzt SMN eine zweite C-terminale Oligomerisierungsdomäne im Exon 6 (Lorson *et al.*, 1998a). Die Interaktion mit spleißosomalen Sm-Proteinen erfolgt über die Tudor-Domäne, während Gemin3/dp103 an den C-Terminus von SMN bindet (Charroux *et al.*, 1999). GIP/Gemin4 ist über Gemin3/dp103 in den SMN-Komplex inkorporiert (Abb. 4.8; Charroux *et al.*, 2000). In Abb. 5.2 ist die Organisation des CSCII Komplexes schematisch dargestellt.

Interessanterweise wurde durch die präparative Reinigung von NSCI und NSCII nachgewiesen, daß auch diese beiden SMN-Komplexe Gemin3/dp103, GIP/Gemin4, unrip, Hsc70, U1A, p175 und SIP1 (Meister *et al.*, 2000, Manuskript in Vorbereitung) als Komponenten enthalten. Darüber hinaus konnte in dem zytosolischen  $\approx 670$  SMN-Komplex Gemin3/dp103, GIP/Gemin4, U1A und Proteine von 175 und 70 kDa nachgewiesen werden (Charroux *et al.*, 2000). Daß es sich dabei um p175 und Hsc70 handelt, ist denkbar. Damit stellt die für den CSCII Komplex identifizierte Struktur und Komposition möglicherweise ein Grundgerüst dar, das generell für SMN-

Komplexe charakteristisch ist, die potentiell in die U snRNP Biogenese involviert sind (siehe unten).



**Abb. 5.2:** Schematisches Modell des zytosolischen SMN-Komplexes CSCII. Die verschiedenen Proteine sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Anordnung von p175, Hsc70 und unrip ist willkürlich gewählt.

#### 5.2.4 CSCII ist wahrscheinlich an der Ausbildung der Sm-core-Domäne beteiligt

Die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne *in vitro* ist gekennzeichnet durch die schrittweise Assoziation der Sm-Heterooligomere SmE.F.G und SmD1.D2 mit U snRNA zur Sm-subcore Domäne, deren Bildung dem Einbau von SmB/B'.D3 vorausgeht (Raker *et al.*, 1996). In Übereinstimmung damit konnte *in vivo* der RNA freie 6S-Komplex bestehend aus SmD1, D2, E, F und G nachgewiesen werden (Fisher, 1985). *In vivo* ist die Bildung der Sm-core-Domäne von Faktoren wie SMN und SIP1 abhängig. Konsistent mit einer putativen Funktion von zytosolischen SMN-Komplexen während der U snRNP

Biogenese kann in CSCII eine spezifische Population an Sm-Proteinen nachgewiesen werden. Dies sind die fünf Sm-Proteine der Sm-subcore Domäne (SmD1, D2, E, F und G, siehe Abb. 4.6). Der CSCII Komplex ist allerdings U snRNA frei und damit nicht mit der Sm-subcore Domäne identisch (Abb. 4.9). Es handelt sich bei CSCII auch nicht um den 6S-Komplex, da er in Sucrosegradienten bei wesentlich höheren Werten sedimentiert (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist es aufgrund der Sm-Protein Zusammensetzung gerechtfertigt anzunehmen, daß CSCII zur Bildung der Sm-core-Domäne während eines frühen Zeitpunkts beiträgt. Dies könnte durch Aktivierung von Sm-Proteinen sein, die für ihre Assoziation im Zytoplasma in einem inaktiven Zustand gelagert sind (Zeller *et al.*, 1983). Gleichermaßen könnte der CSCII Komplex die regulierte Interaktion der spezifischen Sm-Heterooligomere vermitteln, bevor sie mit der U snRNA die Sm-subcore Domäne ausbilden. In jedem Fall scheint die Funktion von CSCII bei der Vermittlung von Protein-Umlagerungen zu suchen zu sein.

Während der Tudor-Domäne dabei die Aufgabe einer Protein-Plattform zukommt, auf der diese Prozesse ablaufen, könnten andere Komponenten des CSCII Komplexes die dynamischen Aspekte dieses Vorgangs vermitteln. Gemin3/dp103 als eine ATP abhängige RNA-Helikase der „DEAD-box“ Familie scheint über die notwendigen Voraussetzungen für eine solche Rolle zu verfügen. Für Proteine dieser Familie ist gezeigt worden, daß sie in aktiver Weise Protein-RNA Wechselwirkungen beeinflussen können (Jankowsky *et al.*, 2001). Gemin3/dp103 alleine zeigt zwar keine ATPase oder RNA-Helikase Aktivität. Es gibt aber Hinweise, daß diese Aktivitäten *in vivo* durch einen Ko-Faktor stimuliert werden (Grundhoff *et al.*, 1999). Ob dieser Ko-Faktor mit GIP1 identisch ist, wird momentan untersucht. Hsc70 besitzt ebenfalls ATPase Aktivität und ist in der Lage den Faltungszustand von Proteinen zu regulieren (Johnson und Craig, 1997). Welche Rolle unrip und p175 zukommen könnte, ist momentan allerdings völlig unklar. Unrip ist bisher nur als ein Bindungspartner von unr, das in die m7G-CAP-unabhängige Translation von viralen mRNAs

involviert ist, beschrieben worden (Hunt *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist es mit STRAP (Serine-Threonine Kinase Receptor associated Protein) assoziiert (Datta *et al.*, 1998). P175 ist ein neues Protein, das keinerlei Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen aufweist.

### 5.2.5 Nukleäre SMN-Komplexe enthalten auch Sm-Proteine

Interessanterweise enthalten die nukleären SMN-Komplexe NSCI und NSCII ebenfalls spezifische Populationen an Sm-Proteinen. Während NSCII alle sieben Sm-Proteine der Sm-core-Domäne enthält (SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G, Manuskript in Vorbereitung), ist NSCI mit SmD1, D2 und F assoziiert (Meister *et al.*, 2000). Es ist momentan unklar, warum das den verschiedenen SMN-Komplexen gemeinsame Grundgerüst (5.2.4) in der Lage ist, mit verschiedenen Populationen an Sm-Proteinen zu interagieren und welches die genauen Funktionen der nukleären SMN-Komplexe sind. Nukleäres SMN ist wahrscheinlich ein Regenerierungsfaktor für spleißosomale Komponenten, die an einem Zyklus des Spleißprozesses teilgenommen haben (Pellizzoni *et al.*, 1998). Da kürzlich eine direkte Rolle für die Sm-Proteine SmB/B', D1 und D3 während des Spleißprozesses vorgeschlagen wurde (Zhang *et al.*, 2001), könnte nukleäres, am Spleißprozeß beteiligtes SMN zusammen mit Proteinen wie Gemin3/dp103, GIP1/Gemin4 und Hsc70 ebenfalls die spezifische Assoziation von Sm-Proteinen regulieren.

Die Beobachtung, daß U snRNPs zu großen Teilen im Zytoplasma zusammengelagert werden, stammt vor allem aus Injektionsexperimenten an *Xenopus laevis* Oozyten (Mattaj, 1988). Diese Zellen stellen jedoch wegen ihres Entwicklungsstadiums einen Spezialfall dar. Möglicherweise werden in somatischen Zellen U snRNPs auch im Zellkern zusammengelagert und die Funktion der in den HeLa-Zellextrakten identifizierten nukleären SMN-Komplexe ähnelt mechanistisch denen der zytosolischen.

### 5.3 Die *in vitro* Rekonstitution von U snRNPs erlaubt die Analyse der genauen Funktion von SMN-Komplexen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hatten gezeigt, daß SMN essentiell für die *in vivo* Zusammenlagerung von U snRNPs ist. Da isolierte Sm-Proteine und U snRNA *in vitro* spontan zur Sm-core-Domäne assoziieren (Raker *et al.*, 1999), haben SMN und SIP1 *in vivo* wahrscheinlich eine regulative Funktion, die den fehlerlosen Ablauf dieses Vorgangs sicherstellt. Um die genauen mechanistischen Aspekte der U snRNP Zusammenlagerung *in vivo* zu klären und den experimentellen Nachweis für eine funktionelle Rolle von CSCII (und anderen SMN-Komplexen) bei diesem Prozeß zu führen, wurde ein zellfreies, experimentelles System zur *in vitro* Rekonstitution von U snRNPs etabliert (siehe 4.11).

In dem neu etablierten U snRNP Rekonstitutionssystem wird *Xenopus laevis* Eiextrakt mit *in vitro* transkribierter, [<sup>32</sup>P]-markierter U1 snRNA inkubiert und die Assoziation der U snRNA mit endogenen Sm-Proteinen durch native Polyacrylamidgel-elektrophorese analysiert (Abb. 4.19). Verschiedene Argumente sprechen dafür, daß in diesem System tatsächlich U1 snRNP Partikel mit einer funktionellen Sm-core-Domäne gebildet werden. Erstens wurden in diesen Eiextrakten Protein-RNA-Komplexe nachgewiesen, die mit der aus isolierten Komponenten gebildeten Sm-core-Domäne ko-migrieren (Abb. 4.19). Zweitens enthielten diese Komplexe Sm-Proteine, wie durch eine Supershiftanalyse nachgewiesen wurde (Abb. 4.19). Drittens assoziierten die Sm-Proteine spezifisch mit der Sm-Stelle der verwendeten U1 snRNA, wie die Analyse der U1ΔSm RNA zeigte (Abb. 4.20). Viertens wurde durch Immunpräzipitation mit einem m<sub>3</sub>G-Cap-spezifischen Antikörper nachgewiesen, daß das 5'-Ende der U1 snRNA im Eiextrakt durch Hypermethylierung zum m<sub>3</sub>G-Cap modifiziert wird (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, daß diese Modifikation von der Bildung der Sm-core-Domäne abhängig ist (Mattaj, 1986).

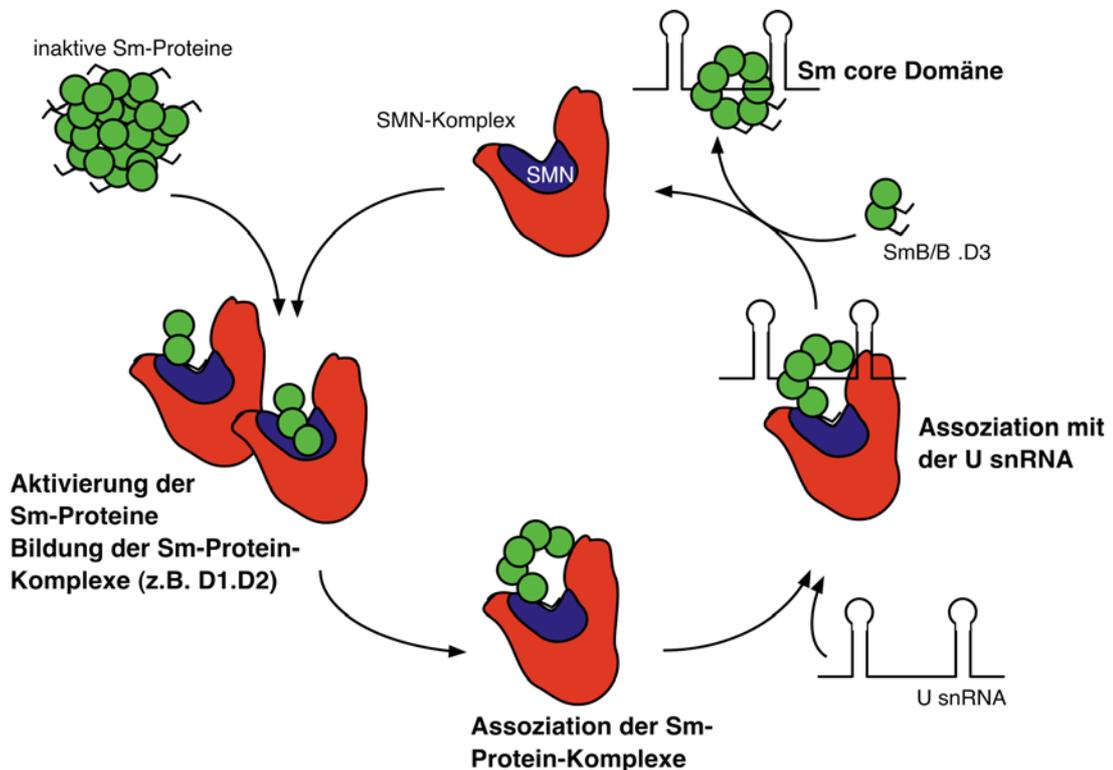
Um die putative Funktion von SMN-Komplexen in dem hier vorgestellten Rekonstitutionssystem analysieren zu können, mußte überprüft werden, ob in diesem System die Bildung der Sm-core-Domäne spontan erfolgt oder ob sie der *in vivo* Situation entspricht und von Faktoren wie SMN und SIP1 abhängig ist. Der Nachweis der SMN-Abhängigkeit konnte aus technischen Gründen noch nicht geführt werden (siehe 4.11). Im Moment werden aber *Xenopus laevis* SMN-spezifische Antikörper hergestellt, um die entsprechenden Experimente durchführen zu können. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die Bildung der Sm-core-Domäne in den *Xenopus laevis* Eiextrakten von SIP1 abhängig ist (Abb. 4.20). In Anbetracht der starken Assoziation zwischen SMN und SIP1 *in vitro* und *in vivo* kann daher davon ausgegangen werden, daß dies auch für SMN gilt und daß die mit diesem System gewonnenen Erkenntnisse den *in vivo* Zusammenlagerungsprozeß von U snRNPs darstellen.

Mit Hilfe dieses zellfreien U snRNP Rekonstitutionssystem konnte GIP1/Gemin4 erstmals eine funktionelle Relevanz während dieses Vorgangs zugeordnet werden, da Antikörper gegen GIP1/Gemin4 genau wie im Fall von SIP1 spezifisch die Bildung der Sm-core-Domäne blockieren (Abb. 4.20). Vor allem aber wurde gezeigt, daß die Zusammenlagerung der Sm-core Domäne *in vivo* ein energieabhängiger Prozeß ist und sich damit mechanistisch von der spontanen Assoziation isolierter Sm-Proteine mit einer U snRNA unterscheidet (Abb. 4.20; Raker *et al.*, 1999). Es ist momentan unklar, in welcher Form die benötigte Energie zur Verfügung gestellt wird. Da der CSCII Komplex und auch andere SMN-Komplexe mit Gemin3/dp103 und Hsc70 zwei Proteine enthalten, für die eine ATPase Aktivität vermutet wird oder nachgewiesen ist (Grundhoff *et al.*, 1999; Johnson und Craig, 1997), ist es eine interessante Spekulation, daß diese beiden Proteine durch die Hydrolyse von ATP die Energieabhängigkeit der Bildung der Sm-core-Domäne *in vivo* vermitteln.

## 5.4 Hypothesen zur Funktion von SMN bei der Bildung der Sm-core-Domäne

Mit der Etablierung des *in vitro* U snRNP Rekonstitutionssystem besteht die Möglichkeit, die genauen mechanistischen Beiträge von SMN und seinen assoziierten Proteinen während der Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird ein Modell vorgeschlagen, das spezifische Funktionen der zytosolischen SMN-Komplexe vorhersagt (siehe Abb. 5.3):

- Die Sm-Proteine liegen im Zytoplasma in Form von hochmolekularen Aggregaten vor und müssen für die Ausbildung von heterooligomeren Komplexen durch SMN-Komplexe „aktiviert“ werden.



**Abb. 5.3:** Modell der Zusammenlagerung der Sm-core Domäne von U snRNPs. Die möglichen Funktionen von zytosolischen SMN-Komplexen während dieses Vorgangs sind angezeigt.

- Der Ausbildung der Sm-core-Domäne geht eine spezifische Interaktion verschiedener Sm-Proteine miteinander voraus. Die Assoziation dieser Sm-Heterooligomere wird von SMN-Komplexen vermittelt.
- Durch transiente Interaktion mit der U snRNA vermitteln SMN-Komplexe die Assoziation der Sm-Proteine mit der Sm-Stelle.
- SMN-Komplexe übernehmen eine negative, regulatorische Funktion, indem sie die unspezifische Aggregation von Sm-Proteinen verhindern.

Den oben aufgeführten Modellen ist gemeinsam, daß SMN-Komplexe eine Chaperon-ähnliche Funktion für die Ausbildung von U snRNPs haben. Sie sind nur die offensichtlichsten und schließen sich gegenseitig keineswegs aus. Die Rekonstitution von SMN-Komplexen aus den einzelnen, rekombinant exprimierten Komponenten wird eine genaue Überprüfung der aufgestellten Hypothesen ermöglichen. Möglicherweise vermitteln verschiedene SMN-Komplexe mehrere Aspekte der in Abb. 5.3 dargestellten Prozesse. Insofern ist ein unmittelbares Ziel, die Protein-Zusammensetzung von CSCI zu bestimmen. Es besteht die Aussicht, daß auch die Bildung des U6 snRNP und von snoRNPs in *Xenopus laevis* Eiextrakten durch Zugabe der jeweiligen, *in vitro* transkribierten RNAs rekonstituiert werden kann. Da die molekularen Werkzeuge zur Verfügung stehen, um die SMN-Abhängigkeit dieser Zusammenlagerungsvorgänge zu analysieren, wird es eine zentrale Frage sein, ob es sich bei SMN um einen generellen RNP-Zusammenlagerungsfaktor handelt.

## 5.5 Spinale Muskelatrophie und SMN

SMN ist entscheidend an der Biogenese von spleißosomalen U snRNPs beteiligt. Es ist daher wahrscheinlich, daß Defekte in diesem Prozeß kausal mit der SMA-Pathogenese in Verbindung stehen. Dafür spricht, daß durch die Analyse der SMA verursachenden E(134)K Mutation die reduzierte Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen als ein möglicher biochemischer Defekt, der

bei SMA-Patienten auftritt, identifiziert werden konnte (Abb. 4.13). Abschließend soll kurz erörtert werden, daß Defekte in einem grundlegenden zellulären Prozeß wie der U snRNP Biogenese mit dem Zelltyp-spezifischen Phänotyp der SMA prinzipiell vereinbar sind.

SMA beruht auf einem Gen-Dosis Defekt. In Übereinstimmung mit einer essentiellen Funktion von SMN in einem grundlegenden zellulären Prozeß führt die Deletion des *smn* Gens in der Maus bereits im Blastozysten-Stadium, also nach wenigen Zellteilungen, zum Absterben des Embryos (Schrank *et al.*, 1997). Die spezifische Degeneration von Motoneuronen bei SMA-Patienten kann damit erklärt werden, daß Motoneuronen einen besonders hohen Bedarf an funktionellem SMN haben. Es wird angenommen, daß Motoneuronen im Vergleich zu anderen Zelltypen eine sehr hohe Produktion an mRNA aufweisen (Jablonka *et al.*, 2000). Ein fehlerhafter oder verlangsamter Spleißprozeß, beruhend auf einem Mangel an funktionellen U snRNPs infolge einer verminderten Expression von SMN, würde sich daher in diesen Zellen früher als in anderen Zellen fatal bemerkbar machen. Interessanterweise gibt es transgene Mäuse, in denen C-terminal verkürztes SMN (SMN $\Delta$ Ex7) nur in Muskelgewebe exprimiert wird, in neuronalen Geweben dagegen volle Länge SMN (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2001). Diese Mäuse zeigen ausschließlich eine spezifische Degeneration von Muskelfasern. Dies zeigt, daß SMA-ähnliche Symptome nicht auf neuronale Zellen beschränkt sind. Es ist darüber hinaus denkbar, daß der SMN-Komplex mit Motoneuronen-spezifischen Faktoren interagiert und damit ebenfalls zum Phänotyp der SMA beiträgt (Jablonka *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang ist es sicherlich bemerkenswert, daß in neuronalen Zellen das Sm-Protein SmB/B' durch eine neuronale Isoform ersetzt ist, die SmN benannt ist (McAllister *et al.*, 1988) und die ebenfalls effizient mit SMN interagiert (Daten nicht gezeigt).

Abschließend kann damit festgestellt werden, daß eine essentielle Funktion von SMN während der U snRNP Biogenese keineswegs die zelltypspezifischen Defekte der SMA ausschließt. Damit aber verspricht eine weitere detaillierte Charakterisierung seiner Rolle bei der U snRNP Biogenese lohnende Einsichten in die SMA-Pathogenese.