

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Spinalen Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (engl.: *Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1*; im folgenden SMARD1 genannt; OMIM #604320), einer seltenen, autosomal-rezessiven Erkrankung, deren genetische Ursache erstmals 2001 (Grohmann *et al.*, 2001) beschrieben wurde. Die Patienten sind Säuglinge, bei denen das Leitsymptom - eine lebensbedrohliche Atemnot - innerhalb der ersten 13 Lebensmonate eintritt (Grohmann *et al.*, 2001, 2003). Bei den Betroffenen wurden Mutationen im *Immunoglobulin μ -binding protein 2 (IGHMBP2)*-Gen identifiziert, das für ein Multidomänenenzym kodiert, dessen zelluläre Funktion besonders im Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der Erkrankung unbekannt ist.

Die SMARD1, die auch unter den Bezeichnungen „*Distal spinal muscular atrophy 1 (DSMA1)*“ oder „*Distal hereditary motor neuronopathy type VI (HMN6)*“ bekannt ist, wird aufgrund klinischer Ähnlichkeiten zur Gruppe der Spinalen Muskelatrophien gezählt. Als einen Einblick in dieses Forschungsfeld möchte ich daher im Folgenden zunächst die klinischen Bilder der Spinalen Muskelatrophie und der Spinalen Muskelatrophie mit Atemnot sowie deren molekulargenetische Grundlagen vorstellen. Eine Einführung zu der Enzymklasse der Helikasen, deren Dysfunktion bei der SMARD1 Hauptinhalt dieser Arbeit ist, schliesse ich an.

1.1 Spinale Muskelatrophien

Spinale Muskelatrophien (engl.: *Spinal muscular atrophy*; SMA; OMIM #253300) umfassen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neuromuskulärer Erkrankungen. Unter Kaukasiern ist die Frühform, die SMA Typ I (SMA1) oder auch Morbus Werdnig-Hoffmann, mit einer Häufigkeit von 1:6000 Geburten eine der häufigsten genetisch bedingten Erkrankungen im Kindesalter (Monani *et al.*, 2005). Die Bezeichnung „progressive spinale Muskelatrophie“ wurde erstmals 1893 von dem Heidelberger Neurologen Johann Hoffmann verwendet. Die schwere Verlaufsform der SMA, die „infantile progressive spinale Muskelatrophie“ wird außerdem nach dem aus Graz stammenden Guido Werdnig benannt (Werdnig 1891, Übersetzung ins Englische 1971).

Die SMA manifestiert sich mit einer proximal betonten Skelettmuskelschwäche. Diese ist die Folge eines Untergangs der α -Motoneuronen im Rückenmark, wodurch

es zur Degeneration des Axons und zur Denervation sowie Atrophie der abhängigen Muskelfasern kommt. Klinische Hauptsymptome sind eine zunehmende, meist symmetrisch ausgeprägte Muskelschwäche und –atrophie (Emery *et al.*, 1976).

Vor Etablierung der molekularbiologischen Diagnostik wurden Phänotypen durch ein klinisch orientiertes Klassifikationsschema eingeteilt, welches sich nach dem Manifestationsalter, dem Ausprägungsgrad und den Begleitsymptomen richtete. Das heute gängige Schema unterscheidet vier Subtypen der SMA, wobei sich die Zuordnung nach den maximal erreichten motorischen Fähigkeiten und dem Manifestationalter richtet (Zerres & Davies 1999):

SMA Typ I	Krankheitsbeginn kongenital bis zum 6. Lebensmonat; Patienten können nicht sitzen (OMIM #253300)
SMA Typ II	Krankheitsbeginn vor dem 18. Lebensmonat; Sitzen oder Laufen sind ohne Hilfe nicht möglich (OMIM #253550)
SMA Typ III	Krankheitsbeginn nach dem 18. Lebensmonat; Laufen wird erlernt (Morbus Kugelberg- Welander; OMIM #253400)
SMA Typ IV	Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter (OMIM #271150)

Patienten mit SMA Typ I zeigen das schwerste klinische Bild und überleben das zweite Lebensjahr nicht ohne Hilfsmittel. Patienten mit einer SMA Typ II können das frühe Erwachsenenalter erreichen, während bei den Patienten mit den SMA Typen III und IV die allgemeine Lebenserwartung nicht wesentlich eingeschränkt ist (Zerres *et al.*, 1997).

1.2 Spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD)

1974 berichteten Mellins und seine Gruppe erstmals von Säuglingen mit einer Variante der frühinfantilen SMA Typ I, die auf Grund einer plötzlich eintretenden Zwerchfellschwäche in schwere Atemnot gerieten (Mellins *et al.*, 1974). Weitere Berichte über ähnliche Fälle gaben Grund zu der Annahme, dass es neben der SMA Typ I eine weitere (diaphragmale) Subform geben musste, bei der respiratorische Beschwerden im Vordergrund stehen (Bertini *et al.*, 1989; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 1996).

1.2.1 Die Symptomatik der SMARD1

Die Diagnose der SMARD1 wird durch den Nachweis von Mutationen im *IGHMBP2*-Gen gesichert. Nachfolgend gebe ich eine Übersicht über das klinische Bild der SMARD1-Patienten, bei denen Mutationen im *IGHMBP2*-Gen gefunden wurden.

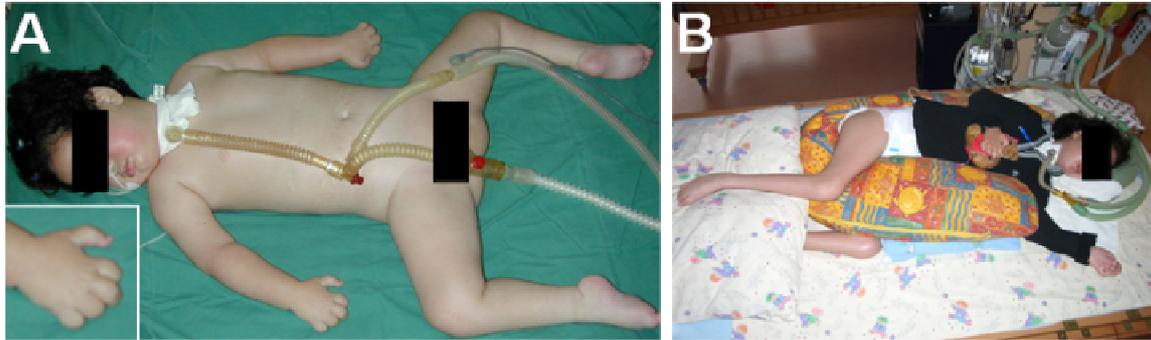


Abbildung 1: Eine SMARD1-Patientin im Alter von 4 (A) und 8 Jahren (B). Permanente maschinelle Beatmung ist seit dem 2. Lebensmonat notwendig. Gleichzeitig entwickelte sich eine distal betonte Muskelschwäche. Man erkennt deutlich Fingerkontraktionen und „fatty pads“ im Bereich der Grundphalangen (A, s.a. Zoom). B) Im Alter von 8 Jahren zeigt die Patientin eine vollständige Lähmung des Körpers bis auf eine eingeschränkte Motorik im Gesichtsbereich. Die Patientin ist Trägerin einer homozygoten Missense-Mutation im *IGHMBP2*-Gen (c.1738G>A; p.V580I).

Neben einer zunächst kaum auffälligen, progredienten Muskelatrophie steht die Atemnot als „definierendes“ Merkmal im Vordergrund. Die Ateminsuffizienz ist Folge einer Zwerchfelllähmung, die sich im Röntgenbild durch eine Eventration des Diaphragmas darstellt. Erste Anzeichen für respiratorische Störungen können inspiratorischer Stridor oder leises Schreien sein (Grohmann *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003). Atembeschwerden können sich progredient entwickeln oder ohne Vorwarnungen auftreten und dann eine akute Intubation notwendig machen (Grohmann *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003; Maystadt *et al.*, 2004; Giannini *et al.*, 2006). Die Ateminsuffizienz manifestiert sich meist in den ersten sechs Lebensmonaten, seltener im 7. bis 13. Lebensmonat und nicht kongenital (Grohmann *et al.*, 2003; Maystadt *et al.*, 2004; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004; Giannini *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Guenther *et al.*, 2007a). Nur eine Langzeitbeatmung über ein Tracheostoma gewährleistet das Überleben. Versuche, SMARD1-Patienten von der Beatmungsmaschine zu entwöhnen, waren bisher in keinem Fall erfolgreich (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004; Giannini *et al.*, 2006).

Die Muskelschwäche und -atrophie ist bei der SMARD1 symmetrisch. Sie beginnt an den distalen Muskeln der Füße und steigt progredient auf. Es folgen Fuß- und

Fingerkontrakturen. Auf den muskelatrophen Fingern kommt es zur Ausbildung von Fettpölsterchen („fatty pads“) (Grohmann *et al.*, 2003).

Das sensorische und autonome Nervensystem können ebenfalls betroffen sein, wobei die Ausprägung dieser Merkmale unter SMARD1-Patienten stärker variiert als die oben beschriebene Muskelatrophie und die Atemnot. Beschwerden manifestieren sich in Form verminderter Schmerzperzeption, von Obstipation, Blaseninkontinenz, exzessivem Schwitzen, Bluthochdruck und kardialen Arrhythmien (Grohmann *et al.*, 2003).

In elektroneurographischen und histologischen Untersuchungen fanden sich bei SMARD1-Patienten Auffälligkeiten, die mit dem klinischen Bild in Einklang stehen, wie z.B. eine reduzierte Leitgeschwindigkeit der motorischen Nerven mit neuropathisch veränderten Muskelaktionspotenzialen sowie einen Verlust der Muskeleigenreflexe (Pitt *et al.*, 2003; Grohmann *et al.*, 2003; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004). In Gewebeproben von SMARD1-Patienten wurden Nervenfasern mit degenerierten Axonen und Myelinveränderungen sowie motorische Endplatten ohne axonale Termini beobachtet (Diers *et al.*, 2005). Dadurch ergibt sich das Bild, das axonale Degeneration und Myelinveränderungen zur Denervation bei der SMARD1 führen. Die daraus folgende neurogene Muskelatrophie lässt sich durch die Beobachtung verminderter Durchmesser der Myofibrillen im Skelettmuskel der SMARD1-Patienten nachweisen, während das Diaphragma eher eine breite Variation der Muskelfaserdurchmesser aufweist (Pitt *et al.*, 2003; Diers *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen zur Histopathologie der SMARD1 sind am Tiermodell der SMARD1, der *neuromuscular degeneration (nmd)* Maus, durchgeführt worden (siehe 1.3.3 und 1.3.4).

Die meisten SMARD1-Patienten haben ein geringeres Geburtsgewicht als gesunde Neugeborene. Darüber hinaus sind ein Drittel der Kinder Frühgeborene bzw. zeigen eine Reduktion intrauteriner Bewegungen, sodass man eine Manifestation der Erkrankung bereits *in utero* vermuten kann (Grohmann *et al.*, 2003).

Die Prognose für SMARD1-Patienten ist wie bei der „klassischen“ Form der SMA Typ I schlecht (Grohmann *et al.*, 2003; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004). Mit Hilfe maschineller Beatmung ist allerdings ein Überleben möglich. Dabei ist zu beobachten, dass nach einer Periode rascher Progression mit Ausbildung distaler Paresen und körperlichen Verfalls sich eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs auf niedrigem Niveau einstellt (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004).

1.2.2 Unterschiede der klinischen Bilder zwischen Patienten mit „klassischem“ SMA-Typ I und SMARD1

Es wird geschätzt, dass nur etwa 1% aller Patienten mit dem klinischen Bild einer infantilen SMA Typ I Mutationen im *IGHMBP2*-Gen aufweisen (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004). Da sich die Krankheitsbilder sehr ähneln, möchte ich nachfolgend die klinischen Symptome der „klassischen“ SMA Typ I und der SMARD1 einander gegenüberstellen, die eine Unterscheidung zwischen beiden Krankheiten ermöglichen.

SMA-Typ I	SMARD1
Die Muskelatrophie betrifft rumpfnah (proximale) Muskelgruppen.	Die Muskelschwäche ist zunächst distal nachweisbar und befällt dann zunehmend auch die oberen Extremitäten und proximalen Muskelgruppen.
Respiratorische Funktionsstörungen resultieren aus einer Lähmung der Interkostalmuskulatur und manifestieren sich in Form eines Glockenthorax. Das Diaphragma ist nicht oder erst sehr spät betroffen.	Respiratorische Beschwerden sind ein initiales Krankheitssymptom und resultieren aus einer Zwerchfelllähmung. Es bildet sich kein Glockenthorax.
Kontrakturen finden sich vor allem in proximalen Gelenken, z.B. im Knie- oder Ellenbogengelenk.	Kontrakturen bestehen meist in distalen Abschnitten der Extremitäten, d.h. im Bereich der Finger oder Füße.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der klinischen Unterschiede zwischen SMA Typ I und SMARD1 (modifiziert nach Volk 2007).

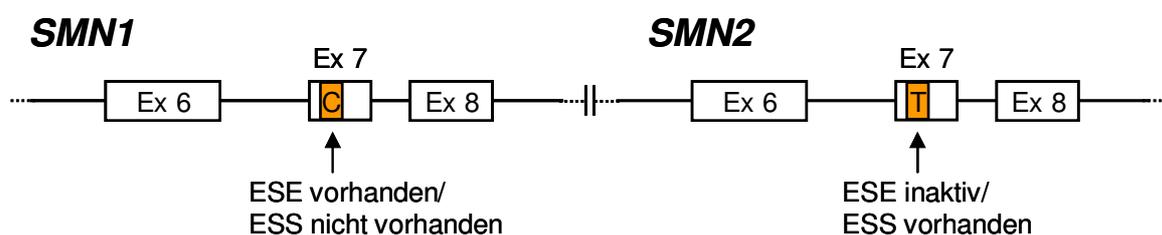
1.3 Molekulare und pathophysiologische Grundlagen der Spinalen Muskelatrophien

1.3.1 Die „klassische“ Form der SMA

Das krankheitsverursachende Gen der „klassischen“ Form der SMA wurde 1995 identifiziert (Lefebvre *et al.*, 1995) und aufgrund des klinischen Bildes „*survival of motor neuron (SMN)*“ genannt. Der chromosomale Abschnitt (5q13), auf dem sich das Gen befindet, liegt invertiert in zwei Kopien vor (*Abbildung 2*). Etwa 96% aller SMA-Patienten tragen entweder eine Deletion oder eine homozygote bzw. „*compound*“-heterozygote Mutation in dem telomerischen *SMN*-Gen (*SMN^T* bzw. *SMN1*) (Wirth *et al.*, 1999). Die fast identische, zentromerische Version (*SMN^C* bzw. *SMN2*) des *SMN*-Gens enthält allerdings einen Einzelbasenaustausch in Exon 7, der durch Inaktivierung einer sogenannten „*exonic splice enhancer*“-Stelle (Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999; Cartegni und Krainer, 2002) bzw. Aktivierung einer „*exonic*

splice silencer“-Stelle (Kashima und Manley, 2003) das korrekte Spleißen des Transkriptes verhindert. Dadurch fehlen 90% der messenger RNA (mRNA) des *SMN2*-Gens. Dieses aberrante Spleißprodukt (*SMN Δ 7*) wird in ein instabiles, nichtfunktionelles Protein translatiert (Coover *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997). Nur etwa 10% der *SMN2*-Transkripte sind vollständig und kodieren für ein funktionelles SMN-Protein. Bei SMA-Patienten kommt es durch Deletionen oder Mutationen im *SMN1*-Gen zu einem Mangel an funktionellem SMN-Protein, der nicht durch das *SMN2*-Gen kompensiert werden kann. Durch die Instabilität des genomischen Abschnittes, der das *SMN2*-Gen enthält, können SMA-Patienten ein oder mehrere *SMN2*-Kopien tragen. Dabei wurde beobachtet, dass Patienten mit milderem Krankheitsverlauf mehr *SMN2*-Kopien aufweisen (Feldkötter *et al.*, 2002; McAndrew *et al.*, 1997). Dies spricht für einen Gendosis-Effekt, d.h. der Schweregrad der Krankheit korreliert direkt mit der Restmenge funktionellen SMN-Proteins (Helmken *et al.*, 2003).

Normales Individuum



SMA-Patient

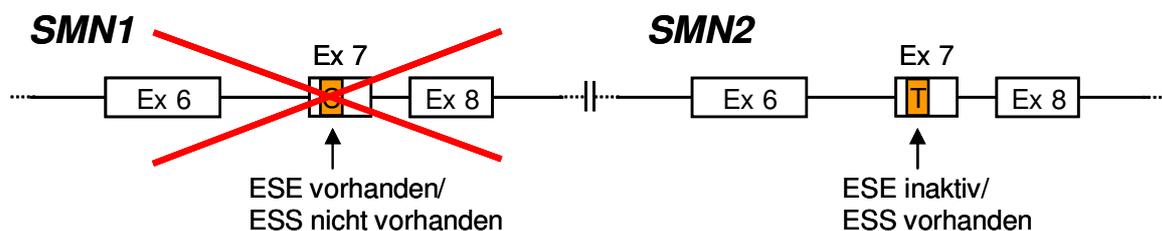


Abbildung 2: **SMA-Genetik (modifiziert nach Monani, 2005)**. Dargestellt sind das krankheitsverursachende Gen *SMN1* und dessen zentromerische Kopie *SMN2*. Aus Gründen der Vereinfachung sind die Gene als Tandemwiederholung dargestellt. Alle SMA-Patienten tragen entweder eine Deletion oder eine Mutation im *SMN1*-Gen (rot durchgestrichelt), besitzen aber wenigstens eine Kopie des *SMN2*-Gens. Das orange Kästchen kennzeichnet die Lage des ESE (= *exonic splice enhancer*) bzw. des ESS (= *exonic splice silencer*).

SMN wird ubiquitär exprimiert und ist Teil eines Multiproteinkomplexes von etwa 1 MDa Größe, dessen Hauptkomponenten als Gemin2-7 bezeichnet werden (Meister 2000). SMN ist im Zytoplasma wesentlich an der Biogenese der U snRNPs (engl.:

Uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particle) beteiligt, kommt allerdings auch in nukleären Strukturen, den sogenannten „Gems“ (engl.: *Gemini of coiled bodies*) vor. Es wurden verschiedene zusätzliche Interaktionspartner des SMN gefunden (siehe Übersichtsartikel Monani 2005), allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, um deren Funktion im Zusammenhang mit dem SMN-Protein zu verstehen. Die Rolle des SMN in der Pathogenese der SMA wird kontrovers diskutiert. Eine Schule postuliert, dass der Motoneuron-spezifische Phänotyp auf der Rolle des SMN bei der snRNP-Biogenese (engl.: *Small nuclear ribonucleoprotein particle*) und dem damit verbundenen „*pre-mRNA processing*“ beruht (Eggert *et al.*, 2006). In diesem Szenario wären Motoneurone deshalb besonders betroffen, weil die für diese Zellen wichtigen mRNAs ineffizient gespleißt werden (Faustino und Cooper 2003). Hinweise auf eine solche Situation erbrachte eine Studie an Zebrafischen, in der nachgewiesen wurde, dass axonale Defekte der Motoneuronen, die durch Injektion von Morpholinos gegen verschiedene Proteine der snRNP-Biogenese (insbesondere SMN) erzeugt wurden, durch Koinjektion gereinigter U snRNPs (also dem Endprodukt der snRNP-Biogenese) verhindert werden konnten (Winkler *et al.*, 2005). Kritik daran kommt von Vertretern einer anderen Hypothese, die dem SMN-Protein eine bislang nicht gut verstandene zelltyp-spezifische Funktion in Motoneuronen unterstellen (Monani, 2005; Eggert *et al.*, 2006). In der Tat wurden eine Akkumulation SMN-haltiger Partikel in Axonen und Wachstumskegeln von Neuronen beobachtet (Fan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Rossoll *et al.*, 2003) oder SMN eine muskel-spezifische Funktion zugeschrieben (Rajendra *et al.*, 2007).

1.3.2 SMARD: Mutationen im *IGHMBP2*-Gen sind die genetische Ursache der SMARD1

In einer ersten Haplotypanalyse konnten Novelli *et al.* 1995 nachweisen, dass bei der infantilen SMA mit frühzeitigen respiratorischen Beschwerden ein anderes Gen als das der klassischen SMA Typ I verändert ist. Weitere Untersuchungen in einer libanesischen Familie mit einer dann später als SMARD1 bezeichneten, autosomal-rezessiven SMA-Variante führten zur Entdeckung von Mutationen im *Immunoglobulin μ -binding protein 2*-Gen (*IGHMBP2*) auf Chromosom 11q13.3 (Grohmann *et al.*, 1999; Grohmann *et al.*, 2001). Die Analyse weiterer Familien mit einem SMARD1-ähnlichen Phänotyp machte früh deutlich, dass dieses Erkrankungsbild klinisch und genetisch heterogen ist (Grohmann *et al.*, 1999). Bisher wurden mehr als 50

SMARD1-Patienten mit Mutationen im *IGHMBP2*-Gen beschrieben, wobei bei einigen krankheitsverursachende Veränderungen nur auf einem Allel nachgewiesen werden konnten (Grohmann *et al.*, 2001, 2003; Pitt *et al.*, 2003; Maystadt *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006; Giannini *et al.*, 2006).

Das IGHMBP2-Protein besteht aus 993 Aminosäuren und ist im Wesentlichen aus drei Domänen, nämlich der N-terminalen Helikase-Domäne, einer R3H-Domäne und einem C-terminalen Zinkfinger-Motiv aufgebaut (*Abbildung 3*).

Da die Untersuchung der Helikasedomäne einen wesentlichen Aspekt dieser Arbeit darstellt, widme ich nachfolgend ihrer Beschreibung ein ganzes Kapitel.

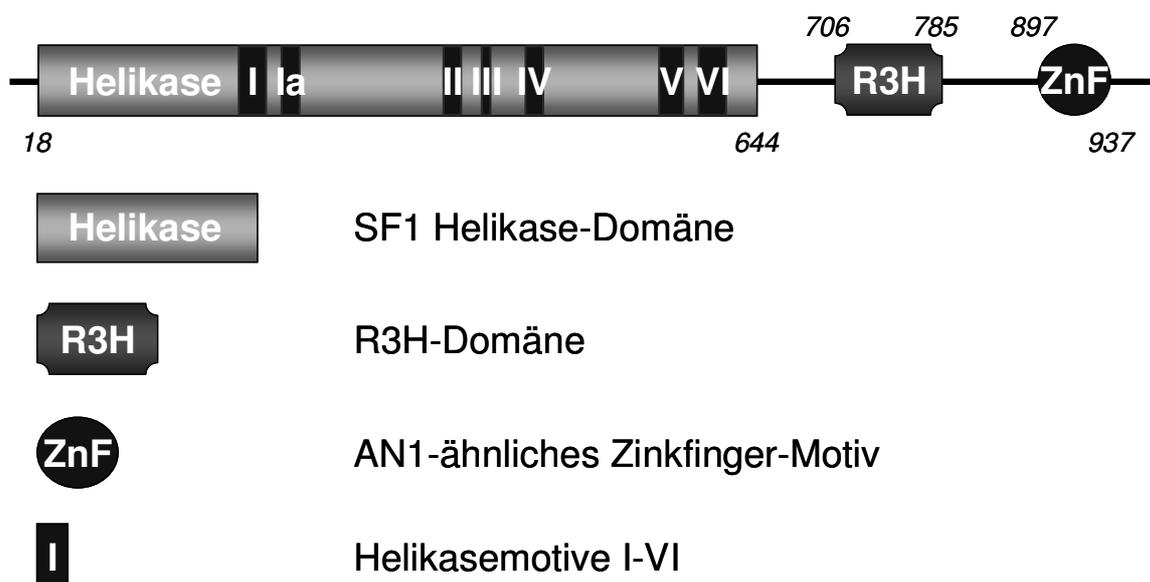


Abbildung 3: Struktureller Aufbau des IGHMBP2-Proteins. Durch Sequenzvergleiche der IGHMBP2-Proteinsequenz (NP_002171) mit denen verschiedener Datenbanken (SMART, Prosite, EBI) wurde der abgebildete Aufbau des Proteins in seinen Domänen und ihren Grenzen bestimmt. Die kursiven Zahlen kennzeichnen die Aminosäurepositionen der Domänengrenzen. SF1= Superfamilie 1.

Die R3H-Domäne wurde erstmals 1998 beschrieben (Grishin, 1998). Namensgeber sind ein invariantes Arginin („R“) und ein durch drei Aminosäuren getrenntes Histidin („H“). Die R3H-Domäne von IGHMBP2 besteht aus einer Anordnung von 3 antiparallelen β -Faltblättern and zwei α -Helices und ähnelt nicht-homologen Strukturen, die im „*translations initiation factor 3*“ (IF3) und in YhhP-Proteinen vorkommen (Liepinsh *et al.*, 2003). Die Fähigkeit zu Interaktionen mit doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäuren wird vermutet (Grishin, 1998). Diese Annahme wird unterstützt durch Versuche von Fukita *et al.* (1993), die für ein Fragment des IGHMBP2, welches hauptsächlich die R3H-Domäne umfasste, eine spezifische Bindung zu 5'-phosphorlierter, guaninreicher, einzelsträngiger DNA (ssDNA)

Einleitung

nachwiesen (Fukita *et al.*, 1993). Die NMR-Struktur der R3H-Domäne des IGHMBP2 zeigt außerdem eine konkave Oberfläche aus hydrophoben Seitenketten, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen könnte (Liepinsh *et al.*, 2003).

IGHMBP2 besitzt zudem ein AN1-Typ Zinkfinger-Motiv, das 6 konservierte Cysteine und 2 Histidine (C6H2) enthält und vermutlich 2 Zinkatome koordiniert. Dieses spezielle Motiv kommt oft zusammen mit anderen Domänen, wie dem A20-Typ Zinkfinger, in anderen Proteinen vor, die im Ubiquitilierungsstoffwechsel eine Rolle spielen. Viele Transkriptionsfaktoren oder andere DNA-bindende Proteine besitzen oft mehrere Zinkfinger-Kopien. Jedoch wurde in den letzten Jahren deutlich, dass viele Zinkfinger-Proteine auch hochspezifisch RNA binden können (Übersichtsartikel Brown 2005). Eine genaue Funktion des AN1-Typ Zinkfingers ist allerdings unbekannt.

IGHMBP2 wurde initial (s.o.) im Zusammenhang mit dem „*class switch*“ der Immunglobulin-Gene beschrieben (Fukita *et al.*, 1993). Andere Arbeiten wiesen vielseitige Verbindungen mit der Transkription nach. So aktiviert IGHMBP2 die Transkription z.B. des späten Promotor des JC virus (Chen *et al.*, 1997) oder in Assoziation mit zwei weiteren Proteinen (p58 und p62) am RIPE3b-Element des *Insulin-2*-Promotors in *Rattus norvegicus* (Shieh *et al.*, 1995). Die Transkription des „*lytic switch*“ Promotors des Epstein-Barr-Virus wird durch Überexpression des IGHMBP2 reprimiert (Zhang *et al.*, 1999). Allerdings findet man IGHMBP2 hauptsächlich im Zytoplasma (Grohmann *et al.*, 2004; Shieh *et al.*, 1995), so dass das Protein neben der nukleären wahrscheinlich noch eine weitere Funktion im Zytoplasma erfüllt. Molnar *et al.* (1997) beschreibt eine Assoziation mit prä-mRNA-Spleißkomplexen, die aber nicht auf einer Bindung an snRNPs beruht. Im Einklang damit stehen die Befunde der ersten immunzytologischen Färbungen, die IGHMBP2 in bestimmten Foci des Zellkerns und diffus im Zytoplasma darstellen (Molnar *et al.*, 1997). Die Überprüfung der enzymatischen Aktivität ergab eine 3'-5' gerichtete DNA-Helikase-Aktivität. Da IGHMBP2 bisher aber nicht in proteomischen Untersuchungen der Spleißosomen detektiert wurde, ist die Rolle des IGHMBP2 beim Spleißen eher unklar. Auch die Translokationsrichtung des IGHMBP2 ist bisher noch umstritten, da Untersuchungen von Biswas *et al.* (2001) eine entgegengesetzte Polarität (5'-3') der Entwindungsaktivität im Vergleich zu Molnar *et al.* (1997) ergaben.

Die Funktion des IGHMBP2-Proteins und die Abfolge der intrazellulären, pathophysiologischen Ereignisse, die zu SMARD1 führen, sind ungeklärt.

1.3.3 Das Tiermodell der SMARD1: die *neuromuscular degeneration*

(*nmd*) Maus

Die *neuromuscular degeneration (nmd)* Maus ist eine Spontanmutante mit autosomal-rezessivem Erbgang, die am Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) charakterisiert wurde (Cook *et al.*, 1995) und einen der humanen SMARD1 ähnlichen Phänotyp aufweist (Grohmann *et al.*, 2001). Diese *nmd*-Maus entwickelt eine distal betonte Muskelatrophie aufgrund des Verlustes des zweiten Motoneurons. Als genetische Ursache wurde eine Mutation im Intron 4 (IVS4+23A>G) des *Immunoglobulin μ -binding protein 2 (Ighmbp2)* – Gens auf Mauschromosom 19 entdeckt, die zum Fehlspleißen der mRNA führt. Die Synthese des Wildtyp-Genproduktes ist dadurch in der *nmd*-Maus auf etwa 20-25% reduziert (Cox *et al.*, 1998). Interessanterweise wurde ein semidominanter Repressor des *nmd*-Phänotyps auf dem *CAST/EiJ*-Hintergrund gefunden, der auf einem genomischen Abschnitt des Mauschromosoms 13 kartiert werden konnte. Die Wirkungsweise des als *Mnm (modifier of nmd)* bezeichneten modifizierenden Allels ist unbekannt.

Genetisch veränderte *nmd*-Mäuse, bei denen die Expression des *Ighmbp2* in Neuronen selektiv wiederhergestellt wurde, zeigten keine Muskelatrophie der Skelettmuskulatur mehr. Dieses als *nmd-TgNI* bezeichnete Mausmodell entwickelte dagegen eine Kardiomyopathie (engl.: *Dilated cardiomyopathy*; DCM), die ebenfalls die Lebensspanne verkürzte (Maddatu *et al.*, 2004). *Nmd*-Mäuse, deren *Ighmbp2*-Expression in den beiden betroffenen Zelltypen - Neuronen und Kardiomyozyten - wiederhergestellt wurde, entwickelten weder eine Muskelatrophie noch eine Kardiomyopathie und erreichten in vielen Parametern Normalwerte (Maddatu *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse dieses experimentellen Systems verdeutlichen, dass die Aktivität des *Ighmbp2*-Genproduktes zumindest in der Spezies Maus modifizierbar und nicht nur für Neurone sondern auch für Kardiomyozyten wichtig ist. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass das Zwerchfell der *nmd*-Maus im Krankheitsverlauf myopathische Veränderungen aufweist und *Ighmbp2* somit auch zur Integrität der Myozyten des Diaphragmas beiträgt (Grohmann *et al.*, 2004).

1.3.4 Unterschiede in der Neurodegeneration zwischen der SMARD1 und der SMA Typ I

Untersuchungen an dem Mausmodell der SMARD1 und verschiedenen Mausmodellen der „klassischen“ SMA verdeutlichten Unterschiede des zellulären Pathomechanismus zwischen beiden Motoneurondefekten. Für die SMA wurden mehrere Mausmodelle generiert, weil die homozygote Deletion des murinen *Smn* einen embryonal letalen Phänotyp erzeugt (Schrank *et al.*, 1997). Um dies zu umgehen, wurden gewebsspezifische „Knock out“-Mäuse oder transgene *Smn*^{-/-}-Mäuse erzeugt, die ein oder mehrere Kopien des humanen *SMN2* oder mutiertes *SMN1* tragen (für eine Übersicht siehe Monani, 2005).

Gezüchtete *nmd*-Neuronen entwickelten sich normal und zeigten keine Defekte im Axonwachstum, dagegen erwiesen sich Störungen des Wachstumskegels und der Axontermini als vorherrschende pathophysiologische Merkmale der *Smn*-defizienten Motoneuronen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002; Rossoll *et al.*, 2003; Grohmann *et al.*, 2004). Die Abfolge pathologischer Ereignisse beginnt bei der *nmd*-Maus im Gegensatz zu den Mausmodellen der SMA im Rückenmark. Die Zellkörper (Axonhügel) der *nmd*-Motoneuronen sind wahrscheinlich zuerst betroffen, was primär zu einer Axondegeneration und sekundär zu einer Demyelinisierung führt. Obwohl *nmd*-Mäuse 10 Tage nach der Geburt (P10) schon 37% ihrer Motoneurone verloren haben, lassen sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Anzeichen von Muskelschwäche erkennen (Grohmann *et al.*, 2004). Transgene *Smn*^{-/-}-Mäuse, die 2-3 Kopien des humanen *SMN2* tragen, sind dagegen bei Geburt schon stark paralysiert ohne jedoch Motoneuronenverluste zu zeigen (Monani *et al.*, 2000). Interessanterweise entwickeln *nmd*-Mäuse erst spät respiratorische Beschwerden. Diese beruhen nicht auf einem Rückgang der Anzahl der Axone im *N. phrenicus*, sondern auf myopathischen Veränderungen mit zentralisierten Nuclei und Muskelfaserregeneraten im Zwerchfell (Grohmann *et al.*, 2004). Dies ist ein wesentlicher Unterschied zur SMARD1 beim Menschen, zu deren ersten und prominentesten Krankheitssymptomen - aus bisher unbekanntem Gründen - die Diaphragmaparese gehört.

1.4 Helikasen

Im herkömmlichen Sinn modulieren Helikasen die Struktur von Nukleinsäuren und sind deshalb an allen Prozessen des DNA/RNA-Metabolismus beteiligt. Helikasen

wurden 1976 in *E. coli* entdeckt (Abdel-Monem *et al.*, 1976), kommen in allen Organismen vor und machen etwa 2% aller *open reading frames* (ORF) in *Saccharomyces cerevisiae* aus (Shiratori *et al.*, 1999). Helikasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und nutzen die chemische Energie aus der Spaltung von γ -Phosphodiesterbindung eines Nukleosid-5'-triphosphates (NTP), um sich entlang der Nukleinsäuren zu bewegen und/oder doppelsträngige Nukleinsäuren in ihre Einzelstränge zu trennen. In letzter Zeit wurde diese Sichtweise immer mehr in Frage gestellt, weil sich einige aufgrund ihrer Primärsequenz als Helikasen kategorisierte Proteine entlang der Nukleinsäuren bewegen ohne Entwindungsaktivität zu zeigen (Übersichtsartikel Singleton *et al.*, 2007). Darüberhinaus demonstrierten Fairman *et al.* (2004), dass Helikasen NTP-abhängig RNA-Protein-Komplexe remodellieren können, ohne eine Strangtrennung zu katalysieren.

Die Dysfunktion von Helikasen kann zu Krankheiten wie Krebs oder vorzeitigem Altern (Progerie) führen, wie z.B. das Werner-Syndrom (Yu *et al.*, 1997). Rezessive Mutationen im *Senataxin*-Gen, das eine ähnliche Helikasedomäne enthält wie IGHMBP2, führen zu dem klinisch heterogenen Bild der Ataxie mit okulärer Apraxie Typ 2 (Moreira *et al.*, 2004; Duquette *et al.*, 2005). Dominante Mutationen im selben Gen verursachen dagegen eine (juvenile) Form der Amyotrophen Lateralsklerose Typ 4 (ALS4, Chen *et al.*, 2005), also eine neurodegenerative Erkrankung.

1.4.1 Struktur-Funktion-Beziehung der Helikasen

Der Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener Helikasen ergab, dass sie kurze, konservierte Motive in ihrer Primärsequenz miteinander teilen, welche als „Helikasemotive“ bezeichnet wurden. Die einzelnen Helikasen wurden nach dem Grad der Ähnlichkeit ihrer Helikasemotive in Familien und Superfamilien (SF) eingeteilt (Gorbalenya und Koonin, 1993).

Die Vertreter der großen Gruppen der SF1 und SF2 besitzen 7 bis 9 konservierte Motive, während Helikasen der SF3 nur drei Motive gemeinsam haben und viralen Ursprungs sind. Die Helikasemotive sind innerhalb ihrer Superfamilie konserviert, aber weniger zwischen den Superfamilien. IGHMBP2 gehört aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit zur sogenannten UPF1-ähnlichen Untergruppe der Superfamilie 1 Helikasen, in der es neben IGHMBP2 nur zwei weitere humane Proteine gibt (*UP-frameshift mutation 1* - UPF1 und *Senataxin* - SETX). *Abbildung 4* zeigt das multiple Alignment der humanen Vertreter der UPF1-ähnlichen Superfamilie 1-Helikasen im

Einleitung

Bereich der Helikasemotive, welches die konservierten Aminosäuren besser heraushebt.

	Motiv I	Motiv Ia
IGHMBP2	I I H G P P G T G K T T T	V L C C A P S N I A V D
hUPF1	L I Q G P P G T G K T V T	V L V C A P S N I A V D
SETX	I I H G P P G T G K S K T	V L V C A P S N A A V D
	: * : * * * * * * * * :	* * * * * * * * * * * * *

	Motiv II	Motiv III	Motiv IV
IGHMBP2	V V I D E C A Q	I L A G D H K Q L	L T V Q Y R M H
hUPF1	I L I D E S T Q	I L V G D H C Q L	L Q V Q Y R M H
SETX	V I V D E A G Q	I L V G D P K Q L	L T V Q Y R M H
	: : : * * * * *	* * * * * * * * *	* * * * * * * * *

	Motiv V	Motiv VI
IGHMBP2	E I K S V D G F Q G R	R R I N V A V T R A R
hUPF1	E I A S V D A F Q G R	R R L N V A L T R A R
SETX	E V D T V D A F Q G R	Q R L N V T I T R A K
	* : : * * * * *	: * : * * : : * * * :

Abbildung 4: Multiples Alignment der Proteinsequenzen der humanen Vertreter der UPF1-ähnlichen Helikasen der Superfamilie 1. Die Primärsequenz im Bereich der 7 Helikasemotive ist zwischen den verschiedenen Proteinen stark konserviert. Die Helikasemotive I und II entsprechen den Walker A bzw. Walker B-Motiv der ATPasen. Das Alignment wurde mit dem ClustalW-Programm des *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/>) und den Sequenzen für hUPF1 (synonym: RENT1, NP_002902) und SETX (Senataxin, NP_055861) erstellt. Die Farben bezeichnen die physiko-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren (AS): rot = kleine und hydrophobe AS, blau = saure AS, magenta = basische AS, grün = restliche (in der Regel polare) AS. Unter den Boxen sind Konsensussymbole abgebildet: * = kein Austausch, : = konservativer Austausch, . = semi-konservativer Austausch.

Röntgenkristallstrukturanalysen verdeutlichten, dass Helikasen unterschiedlicher Familien zwei Hauptdomänen (Domäne 1A und 2A) gemeinsam haben, die wie das recA-Protein gefaltet sind (Story und Steitz 1992) und an deren Innenseite alle Helikasemotive angeordnet sind. Daneben können die Proteine meist noch andere Domänen („optional domains“) besitzen, die charakteristisch für die jeweilige Helikase sind (Abbildung 5). Diese können die Helikasedomäne flankieren oder oft auch zwischen den Helikasemotiven inseriert sein. Ein Protein ohne diese Nebendomänen ist eIF4A der Hefe (Johnson und McKay, 1999).

Untersuchungen biochemischer Eigenschaften ergaben, dass Mitglieder derselben Superfamilie unterschiedliche Substratspezifitäten (RNA vs. DNA) und Translokationspolaritäten (3'-5' vs. 5'-3') besitzen können, wofür schon kleine Veränderungen in der Primärsequenz verantwortlich gemacht werden (Übersichtsartikel: Patel und Donmez, 2006). Helikasen zeigen trotz ähnlicher 3D-Struktur

unterschiedliche Assemblierungszustände, um ihre volle enzymatische Aktivität zu entwickeln. Neben der monomeren Form sind die häufigsten Multimerisierungszustände ringförmige Hexamere und Homo- oder Heterodimere.

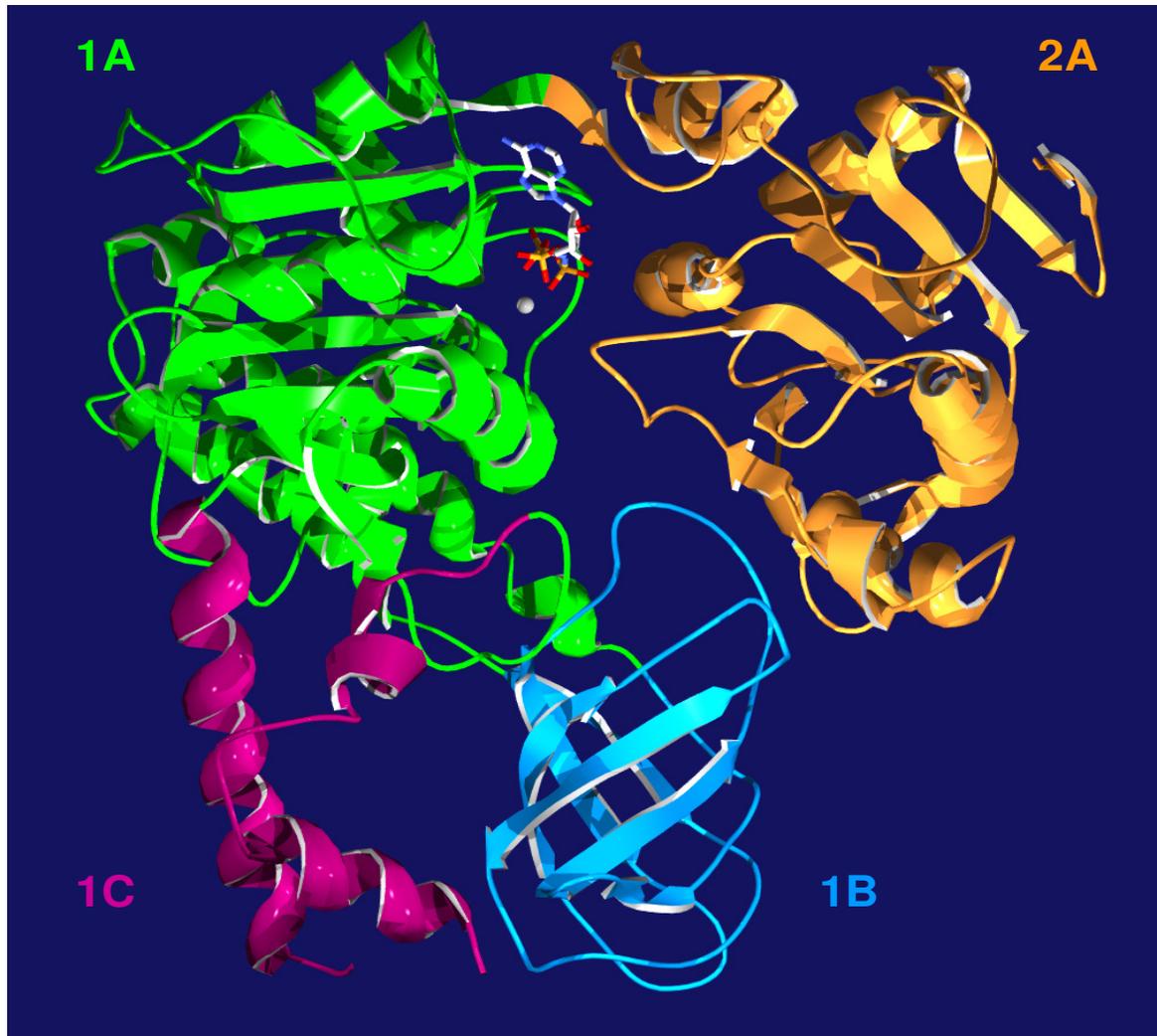


Abbildung 5: Bänderdarstellung der Struktur der Helikasedomäne des humanen UPF1-Proteins (hUPF1; Cheng *et al.* 2007) mit den recA-ähnlichen Subdomänen 1A (grün) und 2A (gold). Zusätzlich sind das gebundene Nukleotid als „stick“-Modell, das Mg²⁺-Ion als weiße Kugel und die Subdomänen 1B (blau) and 1C (violett) zu erkennen. Die Darstellung wurde mit dem Programm „Swiss-PdbViewer“ (Guex und Peitsch, 1997) und den Daten des hUPF1-Proteins (2gjk.pdb) der „RCSB Protein Data Bank“ (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) erstellt.

1.4.2 Die Arbeitsweise der Helikasen

Die in den letzten Jahren publizierten Daten ermöglichten erste Einblicke in die Funktionsweise der Helikasen und gaben Anstoß zu einigen Hypothesen über den Entwindungsmechanismus und die Prozessivität dieser Enzyme. Ein zentraler Punkt aller Modelle ist, dass sich mit wechselndem NTP-Status die Affinität des Proteins zu seinem Substrat verändert und damit eine Konformationsänderung stattfindet.

Einleitung

Die Vielzahl und die Unterschiede der vorgeschlagenen Modelle reflektieren hierbei die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der untersuchten Proteine, wie z.B. den Assemblierungszustand, die Substratspezifität, die Translokationsrichtung, die Prozessivität, den Modus der Substratbindung sowie den Effekt des jeweiligen NTP-Zustandes auf die Bindungsaffinität. Im Folgenden möchte ich kurz auf die wichtigsten Punkte eingehen, da eine ausführliche Betrachtung der vorgeschlagenen Entwindungsmodelle nicht im Fokus dieser Arbeit steht.

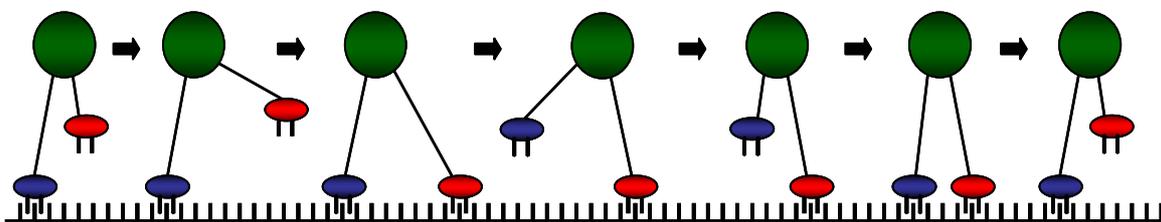
Die meisten Helikasen benötigen einen einzelsträngigen Überhang, um ein Nukleinsäureduplex zu entwinden. Diese Beobachtung hat zu der Hypothese geführt, dass Helikasen an einen einzelsträngigen Abschnitt binden, um sich unidirektional darauf fortzubewegen, bevor sie die Duplexregion erreichen (Patel und Donmez, 2006). Die bidirektional translozierende Helikase Ded1 benötigt dagegen einen einzelsträngigen Abschnitt nur für die Bindung an den Duplex ohne Translokation (Yang und Jankowsky, 2006).

Desweiteren möchte ich zwischen wenig prozessiven RNA-Helikasen, die z.B. als Faltungshelfer bei der Überwindung fehlgefalteter Übergangszustände (sogenannten kinetischen Fallen, engl.: *kinetic traps*) der RNA-Moleküle oder bei der Remodellierung von RNA-Protein-Komplexen (RNPs) beteiligt sind und hochprozessiven DNA-Helikasen, die z.B. bei Replikation mitwirken, unterscheiden. Letztere entwinden doppelsträngige Nukleinsäureabschnitte, die in der Regel sehr viel länger sind als der Teil, der ihnen für die Bindung zur Verfügung steht. Diese Helikasen katalysieren in einer schrittweisen, zyklischen Abfolge die Basentrennung mit einer daran gekoppelten, unidirektionalen Bewegung entlang der Nukleinsäure. RNA-Helikasen (z.B. DExD/H-box-Proteine der Superfamilie 2) entwinden in der Regel nur kurze Duplices in einer nicht-prozessiven Weise, was als Adaptation an den zellulären RNA-Metabolismus interpretiert wird, da bei RNA-Molekülen längere, kontinuierlich doppelsträngige Abschnitte selten vorkommen (Übersichtsartikel: Tanner und Linder *et al.*, 2001; Jankowsky *et al.*, 2007). Eine Ausnahme davon bilden virale RNA-Helikasen, die mit hoher Prozessivität lange doppelsträngige RNA-Moleküle entwinden können (Kadare und Haenni, 1997).

Da sich viele Helikasen auch ohne Entwindung auf Nukleinsäuren fortbewegen können, muss zwischen den Translokations- und Basenseparationsmechanismen unterschieden werden. Der „Regenwurm“-Schrittmechanismus („*Inchworm*“-Mechanismus) sieht für die Translokation monomerer Helikasen zwei Nukleinsäure-

Bindungsstellen vor, die das Substrat in Abhängigkeit vom Status *einer* NTP-Bindungsstelle binden und wieder freisetzen können (*Abbildung 6*). Ein Zyklus des „*inchworm*“-Mechanismus umfasst sechs Konformationsänderungen. Dieser Mechanismus ist auch auf dimere Helikasen anwendbar, allerdings befindet sich dann *eine* Nukleinsäure-Bindungsstelle unter der Kontrolle der NTP-Bindungstasche *einer* Untereinheit. Für dimere Helikasen wurde alternativ ein „*Rolling circle*“-Schrittmechanismus vorgeschlagen (Wong und Lohmann, 1992), bei dem sich im Gegensatz zum eben beschriebenen „*Inchworm*“-Modell die Untereinheiten in ihrer jeweiligen Position zur Nukleinsäure als führende oder folgende Hälfte abwechseln.

A: „Inchworm“-Modell



B: „Rolling circle“-Modell

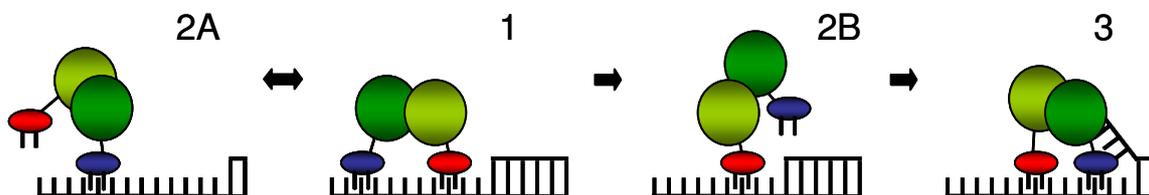


Abbildung 6: Modelle der Fortbewegung von Helikasen. **A)** „*Inchworm*“-Modell: Ein Monomer hat eine hochaffine (gebunden an die Nukleinsäure) und eine schwachaffine Nukleinsäure-Bindungsdomäne. Durch die Hydrolyse von NTPs ändern sich die Affinitäten der beiden Nukleinsäure-Bindungsdomänen und ihre Positionen zueinander, was in einer gerichteten Bewegung der Helikase entlang der Polynukleotiden resultiert. **B)** „*Rolling circle*“-Modell: Die beiden grün-gefärbten Objekte mit ihren Nukleinsäure-Bindungsstellen (rot und blau) stellen funktionelle Monomere dar, die für einzelsträngige Nukleinsäuren eine schwache, für doppelsträngige Nukleinsäuren eine starke Affinität besitzen. Die Bewegung des Dimers entlang der einzelsträngigen Nukleinsäure erfolgt zunächst ungerichtet (2A vs. 2B). Sobald sich aber eine Duplexregion in der Nähe der Helikase befindet, erfolgt eine unidirektionale Bewegung in Richtung der Duplexregion (1-2B-3). Dabei wechseln sich die Monomere in ihrer jeweiligen Position zur Nukleinsäure als führende oder folgende Hälfte ab.

Getrennt vom Translokationsmechanismus wird der Basenseparationsmechanismus in „aktiv“ oder „passiv“ unterteilt. Die Trennung der Wasserstoffbrücken erfolgt am Übergang zwischen einzel- und doppelsträngiger Nukleinsäure passiv, wenn sich durch thermische Fluktuation die letzte Basenpaarung spontan löst und die Helikase durch Bindung der neu geöffneten Base das Rehybridisieren der Stränge verhindert.

Einleitung

Diese Hypothese wäre attraktiv für Helikasen, die pro Schritt nur eine Basepaarung trennen, kann aber nicht auf Helikasen mit größeren Schrittlängen angewendet werden, die einen aktiven Öffnungsmechanismus erfordern.

Weit verbreitet ist dabei die Vorstellung des „*strand exclusion type*“-Mechanismus, bei dem sich die Helikase nur auf einem Strang fortbewegt und dabei durch Ausschluss des komplementären Stranges die Basentrennung wie durch einen Keil („*wedge*“) oder durch einen Kabelzieher („*wire stripper*“) herbeiführt.

Für die Enzyme PcrA und UvrD wurden anhand der Strukturdaten Mechanismen vorgeschlagen, denen zufolge das Protein den einzel- und doppelsträngigen Teil der Nukleinsäure durch zwei um 90° zueinander verschobene Subdomänen des Enzyms bindet. Durch Rotation der Duplexregion und gerichtete Translokation auf dem einzelsträngigen Abschnitt der DNA werden die Wasserstoffbrücken am Übergang der Duplexregion gebrochen und ein Einzelstrang seitlich abgezogen (Velankar *et al.*, 1999; Lee und Yang, 2006).

Das Enzym Hel308 benutzt eine β -Hairpin-Struktur, die sich in die Duplexregion zwischen die Basen der Nukleinsäure drückt und die geöffneten Basen durch Interaktionen stabilisiert. Diese Art der Strangöffnung ist passiv, da sie selbst kein ATP verbraucht, sondern durch die freie Energie der Bindung zwischen dem Enzym und der geöffneten Basen ermöglicht wird (Büttner *et al.*, 2007). Ein ähnlicher Mechanismus wird für RecBCD vorgeschlagen, dass sechs Basenpaarungen ohne ATP-Verbrauch öffnet (Singleton *et al.*, 2004). Für die anschließende Translokation ist die Energie der NTP-Hydrolyse notwendig.

Als sicher gilt, dass diese Enzyme über weitere Mechanismen verfügen, um doppelsträngige Abschnitte des Substrates zu destabilisieren (Wong und Lohmann, 1992; Sengoku *et al.*, 2006). Ringförmige Helikasen können sich auch entlang doppelsträngiger Nukleinsäure fortbewegen und sind u.a. bei der Initiation der Replikation beteiligt, wo sie an spezifische Sequenzen binden. Der exakte Mechanismus für das Entwinden bzw. das Strangöffnen der Doppelhelix dieser Abschnitte ist nicht gut verstanden, wenn auch hierzu einige Modelle postuliert wurden (Takahashi *et al.*, 2005).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die genetische Ursache der SMARD1 wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschrieben. Die Abfolge der molekularen, pathophysiologischen Ereignisse, die zu

der Erkrankung führen, blieb aber ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, Einblicke in den molekularen Pathomechanismus der SMARD1 zu gewinnen, und somit festzustellen, wie der Ausfall eines ubiquitär exprimierten Gens zum selektiven Untergang der α -Motoneuronen führen kann.

Hierfür war zunächst ein größeres Patientenkollektiv mit SMARD1-ähnlichen Phänotypen zu untersuchen. Die dabei erhobenen klinischen Daten sollten der genaueren klinischen Beschreibung der SMARD1 dienen und eine Abgrenzung gegenüber anderen, SMARD1-ähnlichen genetischen Erkrankungen ermöglichen. Weiterhin sollten zwei Patienten mit einem deutlich milderem Krankheitsverlauf durch molekularbiologische und biochemische Methoden untersucht werden, um so Einblicke in eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Beziehung zu gewinnen.

Darüber hinaus wollte ich aus den genetischen Daten Arbeitshypothesen für funktionelle, biochemische Analysen formulieren. So könnten uns die Positionen der Missense-Mutationen Aufschluss darüber geben, welche Proteindomänen und damit welche enzymatische Aktivität des Proteins im Zusammenhang mit der Krankheit eine Rolle spielen könnten.

Sowohl natives als auch mutiertes IGHMBP2-Protein sollten dann rekombinant hergestellt werden, um mittels biochemischer Tests (z.B. einem ATPase- und Helikase-Assay) die Auswirkung der Patientenmutationen auf die IGHMBP2-Funktion *in vitro* zu untersuchen. Eine solche Mutationsanalyse könnte dann auch weitere Erkenntnisse zu Struktur-Funktion-Wechselwirkungen der Helikasen erbringen und so auf funktioneller und struktureller Ebene zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der SMARD1 beitragen.