

4 Diskussion

4.1 SMARD ist klinisch und genetisch heterogen: Indizien für zwei weitere genetisch bedingte Erkrankungen mit einem SMARD1-ähnlichen Phänotyp

In nur 21% der in dieser Arbeit untersuchten Patienten (15/70) des SMARD-Patientenkollektivs wurden *IGHMBP2*-Mutationen identifiziert. Dies bestätigt, dass SMARD-Erkrankungen genetisch heterogen sind (Grohmann *et al.*, 1999, 2001 und 2003; Maystadt *et al.*, 2004; Guenther *et al.*, 2007a). Die retrospektive Studie von SMARD-Patienten, bei denen auch zum größten Teil eine Deletion des *SMN1*-Gens ausgeschlossen wurde, ermöglichte die Identifikation zweier weiterer sowohl von dem SMARD1-ähnlichen Cluster als auch voneinander unterscheidbarer Patientengruppen innerhalb der non-SMARD1-Patienten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die beiden non-SMARD1-Patientengruppen unterschiedliche genetische Ursachen haben und dass es neben dem *IGHMBP2*-Gen noch mindestens zwei weitere krankheitsverursachende Gene gibt, in denen Mutationen zu einem SMARD1-ähnlichen Phänotyp führen.

Die erste non-SMARD1-Patientengruppe, die ich als „SMARD-LM“ bezeichnet habe, wird durch das Fehlen kongenitaler Kontrakturen und die späte Manifestation der Atemnot definiert. Distal betonte Formen der SMA mit einer späten Manifestation sind seit langem bekannt (Emery *et al.*, 1971). Vor kurzem wurde eine Form der chronisch distalen SMA mit Atemnot (DSMA3) in einer großen libanesischen Familie ebenfalls auf den Chromosomenabschnitt 11q13.3 kartiert, allerdings konnte der Genort des *IGHMBP2*-Gens ausgeschlossen werden (Violetti *et al.*, 2002 und 2004). Die Betroffenen zeigten eine distal betonte Muskelschwäche, deren Manifestationsalter stark variierte. Nur in zwei der fünf Patienten war eine Diaphragmaparese festzustellen. Es bleibt daher abzuwarten, ob die in diesem „SMARD-LM“-Cluster zusammengefassten Patienten oder einige von ihnen eine Mutation in dem gleichen Gen wie die beschriebenen Betroffenen der DSMA3 tragen.

Die zahlenmäßig stärkste Gruppe der non-SMARD1-Patienten wird durch eine kongenitale Manifestation der Atemnot und kongenitale Kontrakturen definiert. Kongenitale Kontrakturen oder Arthrogryposis sind bekannte Merkmale fötaler Akinesien,

Diskussion

die den intrauterinen Beginn der Muskelschwäche bei Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen anzeigen (Hammond und Donnerfeld, 1995). Das Vorhandensein beider klinischer Merkmale wurde ebenfalls bei einem Fall mit infantiler SMA kongenitalen Verlaufs (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2004), bei verschiedenen Formen der fötalen Myasthenie (Hoffmann *et al.*, 2006) und bei einem Einzelfall ungeklärter neuromuskulärer Erkrankung (Hartley *et al.*, 2007) beobachtet.

Interessant ist, dass das Leitsymptom der SMARD1, die Eventration des Diaphragmas, bei etwa 80% der SMARD-Patienten festzustellen war, aber keine Unterscheidung zwischen den entsprechenden Clustern zuließ. Um herauszufinden, ob die Diaphragmaparalyse durch verschiedene Mechanismen oder durch ein gemeinsames pathogenes Prinzip verursacht wird, sind genauere histopathologische Untersuchungen des Zwerchfells der Patienten der verschiedenen Cluster nötig. Diese Untersuchungen könnten zu einer besseren Kategorisierung der Patienten und zur Aufklärung der betroffenen zellulären Stoffwechselwege beitragen.

Relativ wenig ist über die Pathophysiologie der primären Lähmung der Interkostalmuskulatur bei der infantilen SMA und der Schädigung des Diaphragmas bei der SMARD1 bekannt, die zur Atemnot führen. Hinsichtlich der SMA nimmt man an, dass die Atemnot durch eine neurogene Lähmung der Interkostal- und Atemmuskulatur bedingt ist, die durch den Verlust der Vorderhornzellen im Thorakalmark verursacht wird. Bei der SMARD1 wurde bisher nur ein Zwerchfellbiopsat einer Patientin histologisch untersucht, das relativ kurz nach der Manifestation der Atemnot entnommen wurde. Dabei fanden sich keine eindeutig myopathischen Veränderungen (Diers *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu stellen Grohmann *et al.* (2004) bei der *nmd*-Maus myopathische Veränderungen in den Muskelfasern des Diaphragmas fest, ohne dass Axone des *N. phrenicus* betroffen waren. Es ist ungeklärt, ob diese Unterschiede spezies-spezifische Ursachen haben.

Zusammenfassend zeigt die Clusteranalyse, dass sich innerhalb der non-SMARD1-Patienten zwei Gruppen durch klinische Merkmale definieren und sich sowohl voneinander als auch von dem SMARD1-Cluster unterscheiden lassen. Dies legt die Vermutung nahe, dass es für beide Patientengruppen unterschiedliche, krankheitsverursachende Gene gibt, die bisher unbekannt sind. Diese Patienteneinteilung wird

künftigen Kartierungsprojekten eine bessere Definition von Einschlusskriterien ermöglichen.

4.2 SMARD1 ist klinisch und allelisch heterogen.

4.2.1 Klinische und genetische Beschreibung der infantilen Verlaufsform der SMARD1

Die als SMARD1-Cluster bezeichnete Patientengruppe der retrospektiven Clusteranalyse weist einen hohen Anteil an SMARD1-Patienten auf. Dies deutet darauf hin, dass der Krankheitsverlauf von SMARD1-Patienten mit infantiler Manifestation stereotyp ist und dass er sich dadurch von anderen genetisch bedingten SMARD-Varianten mit relativer Sicherheit klinisch abgrenzen lässt. Dies bestätigt auch die statistische „Berechnung“, wonach die Erfüllung der klinischen Merkmale „Manifestation zwischen 6 Wochen und 6 Monate“ UND¹ („Eventration des Diaphragmas“ ODER¹ „Frühgeburt“) eine *IGHMBP2*-Mutation mit 98% Sensitivität und 92% Spezifität voraussagen. Diese Befunde lassen sich künftig im klinischen Alltag differentialdiagnostisch ausnutzen. Abweichungen von dem beschriebenen charakteristischen infantilen Verlauf sind vorhanden, wenn auch selten. So wurden zwei (4,3%) SMARD1-Patienten innerhalb der ersten 6 Lebenswochen und vier (8,5%) Patienten nach dem 6. Monat mit Atemnot klinisch auffällig. Dabei ist ein großer Teil der Variation des Manifestationsalters auf die Variation innerhalb einer einzigen Familie mit drei Betroffenen zurückzuführen. Die drei Patienten sind Träger „compound“-heterozygoter *IGHMBP2*-Mutationen (c.121delC/c.388C>T) und wurden durch eine Atemnot im Alter zwischen 2,8 und 13 Monaten klinisch auffällig. Wie unten noch genauer ausgeführt, gibt es experimentelle Hinweise aus dem SMARD1-Tiermodell (*nmd*-Maus), dass der Krankheitsverlauf durch genetische Faktoren modifiziert werden kann (Cox *et al.*, 1998; Maddatu *et al.*, 2004). Man kann nicht ausschließen, dass die leichte Variabilität des Manifestationsalters der Atemnot innerhalb des infantilen SMARD1-Kollektivs das Wirken bzw. Nichtwirken eines motoneuron-spezifischen Allels reflektiert.

Durch das Mutationsscreening in einem Kollektiv (n=70) von SMARD-Patienten konnte ich das Spektrum der Mutationen im *IGHMBP2*-Gen erweitern. In 10 der 15 hier

¹ Die Wörter mit Großbuchstaben bezeichnen Boole'sche Operatoren.

Diskussion

erstmalig beschriebenen infantilen SMARD1-Patienten konnte ich 15 neue Mutationen (von insgesamt 26 verschiedenen) identifizieren. Die Spleißstellen- und Missense-Veränderungen konnten als Polymorphismen ausgeschlossen werden, was auf einen pathogenen Charakter dieser *IGHMBP2*-Varianten hinweist (Collins und Schwartz, 2002). Die Vielzahl der verschiedenen SMARD1-Mutationen deutet daraufhin, dass beim *IGHMBP2*-Gen kein „Founder-Effekt“ vorliegt (die häufigste Mutation ist die p.C496X Nonsense-Veränderung, die bisher etwa 12,5% der Krankheitsallele ausmacht) und dass bei der molekulargenetischen Diagnostik weiterer SMARD1-Patienten wahrscheinlich weitere neue *IGHMBP2*-Mutationen gefunden werden.

60% Prozent der neu entdeckten Mutationen waren kurze Deletionen oder Spleißstellenmutationen, die auf mRNA-Ebene den Leserahmen verschoben oder Nonsense-Veränderungen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führten. Diese Transkripte sind Substrate für den sogenannten „*nonsense-mediated decay* (NMD)“-Mechanismus und sollten in der Zelle abgebaut werden (Hentze und Kulozik, 1999). Sieben (40%) Missense-Veränderungen, die alle in oder direkt neben der Helikasedomäne des Proteins lokalisiert waren, konnten erstmalig in dieser Arbeit identifiziert werden. Dieser Befund unterstützt meine Hypothese, dass SMARD1 durch den Verlust der enzymatischen Entwindungsaktivität des *IGHMBP2* verursacht wird.

Weiterhin konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass man bei der standardisierten Sequenzierung der Exone und der exon-flankierenden Bereiche des *IGHMBP2*-Gens Mutationen übersehen kann. In der Literatur sind bisher vier mögliche SMARD1-Patienten mit nur einer *IGHMBP2*-Mutation auf einem Allel beschrieben (Grohmann *et al.*, 2003: Fall 22; Pitt *et al.*, 2003: Fälle 2 und 6; Maystadt *et al.*, 2004: Fall 27).

Bei genauerer Untersuchung der Mutation des paternalen Allels der Patientin 2#22 (Grohmann *et al.*, 2003: Fall 22) konnte ich erstmalig ein komplexes Rearrangement des *IGHMBP2*-Genortes identifizieren, das aus zwei Deletionen und einer Inversion bestand. Das Zustandekommen dieses Rearrangements ist ungeklärt: mit Ausnahme geringer Sequenzähnlichkeit zu einem LINE2-Element (engl.: *Long interspersed nuclear element*; LINE) an der Bruchpunktstelle im Intron 14 konnte ich keine direkten Wiederholungen (engl.: *direct repeats*), repetitiven Elemente oder Füll-DNA finden. Deshalb vermutete ich, dass diese Umordnung ein Produkt illegitimer Rekombination sein könnte, die von Sekundärstrukturen sowie Sequenzmotiven der DNA wie Palindromen, Topoisomerase

Diskussion

Sequenzelemente in der DNA an dieser Stelle (z.B. „*inverted repeats*“) wahrscheinlich machen.

4.2.2 Zwei juvenile Patienten mit Mutationen im *IGHMBP2*-Gen erweitern das klinische Spektrum der SMARD1 um eine juvenile Verlaufsform

Im Rahmen dieser Arbeit werden erstmalig zwei Patienten mit Mutationen im *IGHMBP2*-Gen beschrieben, deren Krankheitsverlauf durch eine juvenile Manifestation der Atemnot gekennzeichnet ist. Da die Variabilität der klinischen Merkmale innerhalb der SMARD1-Patientengruppe relativ gering ist und bisher kein SMARD1-Fall mit einem Manifestationsalter jenseits des 13. Lebensmonats bekannt wurde, weisen die beiden SMARD1-Fälle mit dem Beginn der Atemnot im Alter von 4,3 (Juv Px 1) bzw. 10 (Juv Px 2) Jahren auf klinische Variabilität der SMARD1 hin (Guenther *et al.*, 2004; Guenther *et al.*, 2007b).

Die Frage, welche Beziehung zwischen den verschiedenen Verlaufsformen der SMARD1 und dem *IGHMBP2*-Genotyp (Genotyp-Phänotyp-Beziehung) besteht, wird noch ausführlich im nächsten Abschnitt der Diskussion behandelt. An dieser Stelle möchte ich auf die Genotypen der beiden Patienten mit juvenilem Beginn der Atemnot eingehen.

Bei Patient Juv Px 1 fand ich zwei Mutationen im *IGHMBP2*-Gen (c.1107C>G, p.F369L und p.G86_T353del), die bei keinem SMARD1-Patienten mit infantilem Beginn der Atemnot identifiziert wurden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass beide Mutationen allein oder in Kombination für den milden Krankheitsverlauf verantwortlich sind. Allerdings wurde in dieser und in anderen Arbeiten gezeigt, dass das Mutationsspektrum im *IGHMBP2*-Gen breit ist. Daher ist es durchaus nicht unwahrscheinlich, dass man bei einem SMARD1-Patienten zufällig zwei neue Mutationen im *IGHMBP2*-Gen entdeckt (Grohmann *et al.*, 2003; Guenther *et al.*, 2007a).

Bemerkenswert ist, dass Patient Juv Px 1 eine genomische Deletion von 18,5 kbp trägt, die bei einer standardisierten molekulargenetischen Untersuchung übersehen worden wäre (Guenther *et al.*, 2004). Bei der Analyse der Fusionsstelle der Rekombination fiel eine 33 bp lange Sequenz mit einer Sequenzidentität von 88% auf, an der die beiden, an der Rekombination beteiligten Alu-Sequenzen verschmolzen (*Abbildung 24*). Daher

erscheint es mir wahrscheinlich, dass die Deletion durch homologe Rekombination vermittelt wurde.

Alu-Sequenzen (etwa 300 bp lang) gehören zu den sogenannten SINEs (engl.: *Short interspersed nuclear elements*; SINE) und machen etwa 10% des humanen Genoms aus. Für andere genetisch bedingte Erkrankungen wurden ebenfalls Deletionen beschrieben, die durch homologe Rekombinationen von Alu-Sequenzen verursacht wurden (Levran *et al.*, 1998; Daborah *et al.*, 2000). Pathomechanistisch kommt es dabei während der Meiose durch die hohe Sequenzidentität zu Fehlanlagerungen zweier Alu-Sequenzen. Dadurch werden Genabschnitte dupliziert, deletiert oder anders (fehlerhaft) umgeordnet (Deininger und Batzer, 1999). Dabei spielt eine von Rudiger *et al.* (1995) beschriebene 26 bp lange „*core sequence*“ eine besondere Rolle, da sie oft in direkter Nähe solcher Rekombinationsbruchpunkte identifiziert wurde. Man vermutet, dass diese Sequenz über das Vorhandensein eines Pentanukleotidmotivs (CCAGC), das ebenfalls in χ -Sequenzen vorkommt, die homologe Rekombination stimuliert. Von χ -Sequenzen ist bekannt, dass sie recBC-vermittelte Rekombination in *Escherichia coli* anregen (Stahl 1979). Dies scheint im Einklang mit der hier beschriebenen Deletion zu stehen, da Kopien dieser „*core sequence*“ in beiden beteiligten Alu-Wiederholungen vorhanden (die Alu-Sequenz in Intron 7 ist nur an einer Stelle verändert) waren.

Das durch die Rekombination entstandene neue Fusionsintron 2-7 ist funktional und wird während des Spleißens entfernt. Auf mRNA-Ebene kommt es dadurch zu einer „*in-frame*“-Deletion, die zum Verlust der Aminosäuren 86-353 des IGHMBP2-Protein führt. Innerhalb dieser Deletion befindet sich das Walker A-Motiv, das für die ATPase-Aktivität wichtig ist. Die Kontrollmutante mit Substitutionen im Walker A-Motiv zeigt keine ATPase- oder Helikase-Aktivität, so dass man annehmen darf, dass das Translationsprodukt dieses *IGHMBP2*-Allels des Patienten Juv Px 1 (p.G86_T353del) keine Entwindungsaktivität besitzt. Die *IGHMBP2*-Mutation des maternalen Allels (c.1107C>G, p.F369L) liegt auf Proteinebene in der Nähe des Helikasemotivs II, das bei der ATP-Hydrolyse eine Rolle spielt. Ob und welche Auswirkungen diese Veränderung auf die enzymatische Aktivität des Proteins hat, wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt.

Patientin Juv Px 2 trägt dagegen zwei krankheitsverursachende Missense-Veränderungen (c.1082T>C, p.L361P und c.1478T>C, p.T493I) im *IGHMBP2*-Gen, die bereits bei Patienten mit infantiler SMARD1 festgestellt wurden. Während die

Diskussion

c.1082T>C-Mutation (p.L361P) auch in Kombination mit einer weiteren Missense-Veränderung infantile SMARD1 verursacht (Grohmann *et al.*, 2003), wurde die c.1478T>C-Veränderung im *IGHMBP2*-Gen (p.T493I) nur bei einem weiteren infantilen SMARD1-Fall in Kombination mit einer Nonsense-Mutation identifiziert. Weitere Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität der p.T493I-Mutation und der „*steady state*“-Menge an IGHMBP2-Protein der verschiedenen Patienten schließen die Möglichkeit eines Gendosis-Effektes von IGHMBP2 bei der SMARD1 nicht aus. Dies wird im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert.

4.3 Untersuchung zur Genotyp-Phänotyp-Beziehung der SMARD1.

4.3.1 Genexpressionsstudie

Die Charakterisierung der c.1235+3A>G-Spleißstellenmutation brachte das überraschende Ergebnis, dass Patient #21 im Vergleich zu gesunden Kontrollen über eine Gendosis von $24,4 \pm 6,9\%$ Wildtyp-*IGHMBP2* mRNA verfügt. Diese Menge reicht aber offensichtlich nicht aus, den Krankheitsverlauf der SMARD1 bei diesem Patienten abzumildern oder die infantile Manifestation zu verzögern.

Dieser SMARD1-Fall zeigt eine Parallele zu der *nmd*-Maus, dem Mausmodell der SMARD1, die eine ebenfalls durch eine Spleißstellenmutation reduzierte *Ighmbp2*-Menge von 20-25% besitzt (Cox *et al.*, 1998). Die *nmd*-Maus weist im Vergleich zu SMARD1-Patienten einen deutlich milderen Phänotyp auf. Bisher war es nicht möglich, diese Unterschiede auf die verbliebene *Ighmbp2*-Menge oder art-spezifische Unterschiede zurückzuführen (Maddatu *et al.*, 2004). Die hier beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich nur um art-spezifische Unterschiede handelt.

Ähnliche art-spezifische Unterschiede des Phänotyps sind bei Mutationen des *Dystrophin*-Gens bekannt. In verschiedenen Stämmen der *mdx*-Maus (*mdx*: *X chromosome-linked muscular dystrophy*) führen Mutationen des *Dystrophin*-Gens nur zu milder Muskelschwäche und nicht zu einer Reduktion der Lebenszeit (Bulfield *et al.* 1984), während Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie früh die Fähigkeit zu laufen verlieren und eine um mindestens 50% reduzierte Lebenserwartung haben.

4.3.2 Proteinmengenbestimmung

Um zu überprüfen, ob es bei der SMARD1 einen ähnlichen Gendosis-Effekt wie bei der „klassischen“ SMA (s. 1.3.1) gibt, der für die unterschiedlichen Verlaufsformen verantwortlich sein könnte, haben wir die „*steady state*“-Menge des IGHMBP2-Proteins in LCLs der Patienten mit infantiler und juveniler Manifestation der Atemnot bestimmt.

Dabei ergab die Quantifizierung der restlichen IGHMBP2-Proteinmengen zwischen infantilen und juvenilen SMARD1-Patienten signifikante Unterschiede ($p=0.0032$ für den 481-Antikörper und $p=0.0067$ für den K14B-Antikörper) im Whitney-Mann-Test. Das Vorhandensein größerer IGHMBP2-Mengen in lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) juveniler *versus* infantiler SMARD1-Patienten legt daher die Vermutung nahe, dass selbst das mutierte Protein einen protektiven Effekt ausübt, wenn es in ausreichenden Mengen vorkommt.

Allerdings war kein signifikanter Unterschied in der IGHMBP2-Proteinmenge festzustellen, wenn man den infantilen Patienten #38 mit dem juvenilen Patienten Juv Px 1 verglich ($p=0.2752$ für den 481-Antikörper und $p=0.8273$ für den K14B-Antikörper). Daher ist es denkbar, dass die bei Patient #38 vorgefundene Menge an aktivem IGHMBP2-Restprotein die Obergrenze darstellt, die noch den infantilen SMARD1-Phänotyp verursacht. Dies könnte man mit den Ergebnissen der Überprüfung der enzymatischen Restaktivität der p.I493-Variante in Einklang bringen. Da die c.1478T>C (p.T493I)-Mutation *in vitro* (s.unten) keinen Verlust der Helikase-Aktivität aufweist, verfügt Patient #38 durch die Reduktion der Proteinmenge über etwa 25% IGHMBP2-Proteinaktivität. Etwa ebenso viel IGHMBP2-Restaktivität wurde für den infantilen Patienten #21 abgeschätzt, der durch eine Spleißstellenmutation ~25% Wt-IGHMBP2-mRNA bildet. Es erscheint möglich, dass Patientin Juv Px 2 durch eine erhöhte spezifische IGHMBP2-mRNA-Expression und IGHMBP2-Restproteinmenge über mehr als vergleichbare 25% Wt-IGHMBP2-Aktivität verfügt, die den Krankheitsverlauf dann mildernd beeinflusst haben könnte. Für den juvenilen Patienten Juv Px 1 kann ich dies nicht weiter abschätzen, da die Auswirkungen der p.F369L- und p.G86_T353del-Veränderungen auf die enzymatische Aktivität des IGHMBP2 nicht überprüft wurden.

Die Möglichkeit eines modifizierenden genetischen Faktors sollte man auch als Ursache des variablen klinischen Verlaufes der SMARD1 in Betracht ziehen. Dafür spricht, dass der Krankheitsverlauf der *nmd*-Maus durch einen genetischen Faktor *Mnm^C* auf

Diskussion

Mauschromosom 13 beeinflusst werden kann, der von dem *CAST/EiJ*-Hintergrund stammt (Cox *et al.*, 1998). Dieser nicht näher identifizierte Faktor scheint sich nicht auf das Spleißen oder die Expression der *Ighmbp2* mRNA auszuwirken, weshalb es fraglich ist, ob dieser Faktor direkt mit Ighmbp2-Protein interagiert oder das Überleben der α -Motoneurone auf andere Weise sichert. Die reinerbige *Mnm^C-nmd*-Maus unterscheidet sich von den nicht modifizierten *nmd*-Mäusen durch eine weniger progressive neurogene Muskelatrophie mit verbesserten motorischen Fähigkeiten (Maddatu *et al.*, 2004). Daher erscheint es möglich, dass sich das klinische Bild der Patienten mit juvenilem Beginn der SMARD1 durch das Wirken eines noch nicht identifizierten neuroprotektiven Allels erklärt.

Allerdings sollte man auch kritisch hinterfragen, inwiefern es überhaupt einen kausalen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen IGHMBP2-Proteinmengen und dem verzögerten Krankheitsbeginn geben kann: Zunächst sind alle untersuchten infantilen SMARD1-Patienten heterozygote Träger eines Allels mit einer Nonsense-Veränderung, während der Juv Px 2 heterozygot für zwei Missense-Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen ist. Juv Px 1 ist ebenfalls kein Träger einer Nonsense-Mutation, dennoch stammen die für diesen Patienten festgestellten Proteinmengen nur von einem Allel, da das paternale Allel, wie unter 3.1.5.2 beschrieben, für ein stark verkürztes Translationsprodukt kodiert und nicht auf dieser Höhe in der SDS-PAGE laufen würde. Daher könnten die unterschiedlichen Proteinmengen einfach nur die ungleiche Verteilung der Nonsense-Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen zwischen den untersuchten Patienten reflektieren.

Weiter sollte man beachten, dass Aminosäuresubstitutionen gleichzeitig viele Parameter eines Proteins, wie Stabilität, Aggregation, Faltungskinetik und Enzymaktivität, verändern können (DePristo *et al.*, 2005). Veränderungen der Primärsequenz führen daher oft zu einem erhöhten „*pool*“ an nicht vollständig oder fehlgefalteten Molekülen, die dann schnell abgebaut werden oder nichtfunktionale, hyperstabile Aggregate bilden können. Daher bedeuten erhöhte Restproteinmengen nicht notwendigerweise mehr spezifische Enzymaktivität, wenn man verschiedene Mutationen betrachtet.

Auch andere Aspekte mahnen zur Vorsicht bei der Interpretation der unterschiedlichen IGHMBP2-Restmengen bei den verschiedenen Verlaufsformen der SMARD1. Zum einen sind die Fallzahlen sehr niedrig, weshalb die Untersuchungen auf weitere Patienten ausgedehnt werden sollten. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zum anderen müssen die in LCLs vorgefundenen Verhältnisse nicht notwendigerweise denen in α -Motoneuronen entsprechen, den in der SMARD1 primär betroffenen Zellen. Dazu ist anzumerken, dass *IGHMBP2* wie *SMN* ein ubiquitär exprimiertes „Haushalts“-Gen ist, dessen Ausfall aus unbekanntem Gründen den Untergang eines hochspezialisierten Zelltyps herbeiführt. Die *nmd*-Maus zeigt in verschiedenen Organen eine Reduktion der *Ighmbp2*-Proteinmenge (Grohmann *et al.*, 2004), so dass der Effekt der Spleißstellenmutation der *nmd*-Maus wahrscheinlich auch in lymphoiden Zellen beobachtet werden könnte. Vor diesem Hintergrund erscheint mir ein Vergleich der Situation zwischen LCLs und α -Motoneuronen berechtigt. Unterstützung für diese Annahme kommt von einer Studie mit LCLs von Patienten mit SMA-Typ I-III, bei der die in LCLs untersuchten *SMN*-Proteinmengen sehr gut mit der Schwere der SMA-Erkrankung korrelierten (Helmken *et al.*, 2003). Dies traf sogar auf Familien mit intrafamiliär diskordantem SMA-Verlauf zu.

Schließlich sollte man berücksichtigen, dass die katalytische Aktivität der mutierten Proteine *in vitro* nicht unbedingt der Aktivität *in vivo* entsprechen muss.

4.4 IGHMBP2 ist eine ATP-abhängige 5'-3'-RNA/DNA-Helikase

Um die Pathophysiologie der SMARD1 auf Proteinebene zu untersuchen, war es notwendig, die enzymatische Aktivität des Wildtyp-IGHMBP2 und der SMARD1-Mutanten in Nukleinsäurebindungs-, ATPase- und Helikaseexperimenten zu überprüfen. Die Aufreinigung des als Fusionsprotein exprimierten IGHMBP2-Proteins war ausreichend, da beide IGHMBP2-Kontrollmutanten nur sehr geringe ATPase- und keine Helikase-Aktivität aufwiesen. Dennoch waren die Ausbeuten gering.

Der Hauptanteil des induzierten IGHMBP2-Proteins befand sich in den sogenannten Einschlusskörperchen von *E.coli*. Ein Grund für deren Entstehung ist die Unfähigkeit der bakteriellen Chaperone und Proteasen, das rekombinante Protein zu falten oder nicht- bzw. fehlgefaltetes Protein abzubauen (Marston 1986; Villaverde und Carrio 2003, Baneyx und Mujacic 2004). Ob dies an spezifischen Anforderungen für eine korrekte Faltung des IGHMBP2-Proteins liegt, ob es durch eine übermäßig starke Induktion der Proteinsynthese oder durch andere Faktoren verursacht wurde, konnte ich nicht sicher klären. Alle Versuche blieben erfolglos, das Verhältnis von unlöslichen zu löslichen

Diskussion

IGHMBP2 durch Modifikationen des Expressionsprotokolls zu verändern. Daher nehme ich an, dass die hier eingesetzte Methode nahe am Optimum war.

Wie in der Einleitung schon beschrieben, benutzen Helikasen die freie Energie aus der Spaltung der Phosphodiesterbindung der NTPs, um komplementäre Stränge von Nukleinsäuren zu trennen. Der erste Schritt dafür ist die Bindung des Enzyms an die Nukleinsäure. Anschließend wird die Energie aus der NTP-Hydrolyse in die Translokation des Proteins und/oder in die Separation der doppelsträngigen Abschnitte eines Nukleinsäuremoleküls umgewandelt. In der vorliegenden Arbeit habe ich deshalb die „klassischen“ enzymatischen Aktivitäten der Helikasen untersucht, d.h. i) die Bindung an Nukleinsäuren, ii) die Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten und iii) die Entwindung partiell doppelsträngiger Nukleinsäuren.

Für IGHMBP2 wurde bereits eine DNA-abhängige ATPase- und DNA-Helikase-Aktivität nachgewiesen (Molnar *et al.*, 1997; Biswas *et al.*, 2001), was eine Bindung zu DNA voraussetzt. In dieser Arbeit konnte ich darüber hinaus erstmals eine Bindung des IGHMBP2 an RNA *in vitro* zeigen. Eine Präferenz für RNA oder DNA oder für einzel- versus doppelsträngigen Nukleinsäuren konnte ich nicht finden.

In Übereinstimmung mit diesem Befund ist die robuste Stimulation der ATPase-Aktivität des IGHMBP2 *in vitro* mit doppelsträngiger DNA oder RNA-Homopolymeren Poly(A), Poly(C) und Poly(U) zu werten. Der Umfang der DNA-stimulierten ATPase-Aktivität liegt in der Größenordnung der Ergebnisse anderer Gruppen, bei denen allerdings ausschließlich einzelsträngige DNA als Stimulans verwendet wurde (Molnar *et al.*, 1997; Biswas *et al.*, 2001). Dies macht deutlich, dass IGHMBP2 einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren unspezifisch, d.h. unabhängig von ihrer Sequenz bindet. Die Analyse der Nukleosidtriphosphatspezifität zeigte allerdings eine deutliche Präferenz für ATP und dATP, was im Widerspruch zu einer vorhergehenden Studie steht, die für IGHMBP2 auch eine, wenn gleich schwächere GTPase-Aktivität nachwies (Molnar *et al.*, 1997).

Durch den Einsatz von RNA- und DNA-Duplices mit ausschließlich 5'-überhängenden Enden erwies sich IGHMBP2 hier als 5'-3' RNA/DNA-Helikase. In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen über die Direktionalität der Translokation des IGHMBP2 (Molnar *et al.*, 1997; Biswas *et al.*, 2001). Die in meinen Experimenten ermittelten biochemischen Eigenschaften des IGHMBP2-Proteins zeigen grundsätzliche Über-

einstimmung mit denen der UPF1-ähnlichen humanen SF1 Helikasen (Kim *et al.*, 1999; Czaplinski *et al.*, 1995; Weng *et al.*, 1996).

Zusammenfassend ist IGHMBP2 eine strikt ATP-abhängige 5'-3' RNA/DNA-Helikase, die unspezifisch Nukleinsäuren bindet.

4.5 Die meisten SMARD1-bezogenen IGHMBP2-Varianten zeigen einen deutlichen Verlust der enzymatischen Aktivität

Die Überprüfung der enzymatischen Aktivität der SMARD1-bezogenen IGHMBP2-Varianten zeigt einen deutlichen Verlust der RNA/DNA-Helikase-Aktivität. Die Analyse des biochemischen Verhaltens der einzelnen IGHMBP2-Varianten suggeriert unterschiedliche pathogene molekulare Mechanismen, die dem Verlust der Entwindungsaktivität zugrundeliegen. Diese Befunde erlauben Rückschlüsse auf die Beteiligung der einzelnen Helikasemotive des IGHMBP2 an dem Reaktionsmechanismus.

In *Abbildung 41B* fasse ich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Mutations- und Funktionsanalyse des IGHMBP2-Proteins zusammen.

Auffällig war zunächst, dass die Expressionsausbeuten zweier SMARD1-Mutanten (Q196R und C241R) besonders schlecht waren (C241R: 6% von Wildtyp-IGHMBP2). Die Proteinpräparationen dieser schlecht exprimierten Konstrukte zeigten auch verstärkt Degradationsprodukte. Deswegen vermute ich, dass die durch *in vitro*-Mutagenese eingeführten Aminosäurenaustausche sich auch strukturell destabilisierend auf das rekombinante IGHMBP2 auswirken. Für diese Vermutung spricht, dass Patientin 2#22, welche die Missense-Veränderung c.721T>C (p.C241R) trägt, stark reduzierte „*steady state*“-IGHMBP2-Mengen von etwa 7% (vgl. *Abbildung 24*) *in vivo* aufweist.

Ob die Abbruchprodukte noch enzymatisch aktiv sind und inwieweit diese Beobachtungen sich auch vollständig auf die Proteinstabilität *in vivo* übertragen lassen, ist ungeklärt. Ich möchte aber festhalten, dass trotz einer gewissen Unterrepräsentation des vollständigen IGHMBP2-Proteins in den Proteinpräparationen der Q196R- und C241R-Konstrukte beide IGHMBP2-Varianten keine enzymatische Aktivität über Hintergrundniveau zeigen, so dass man für diese Mutanten auch ein Verlust der enzymatischen Aktivität annehmen kann.

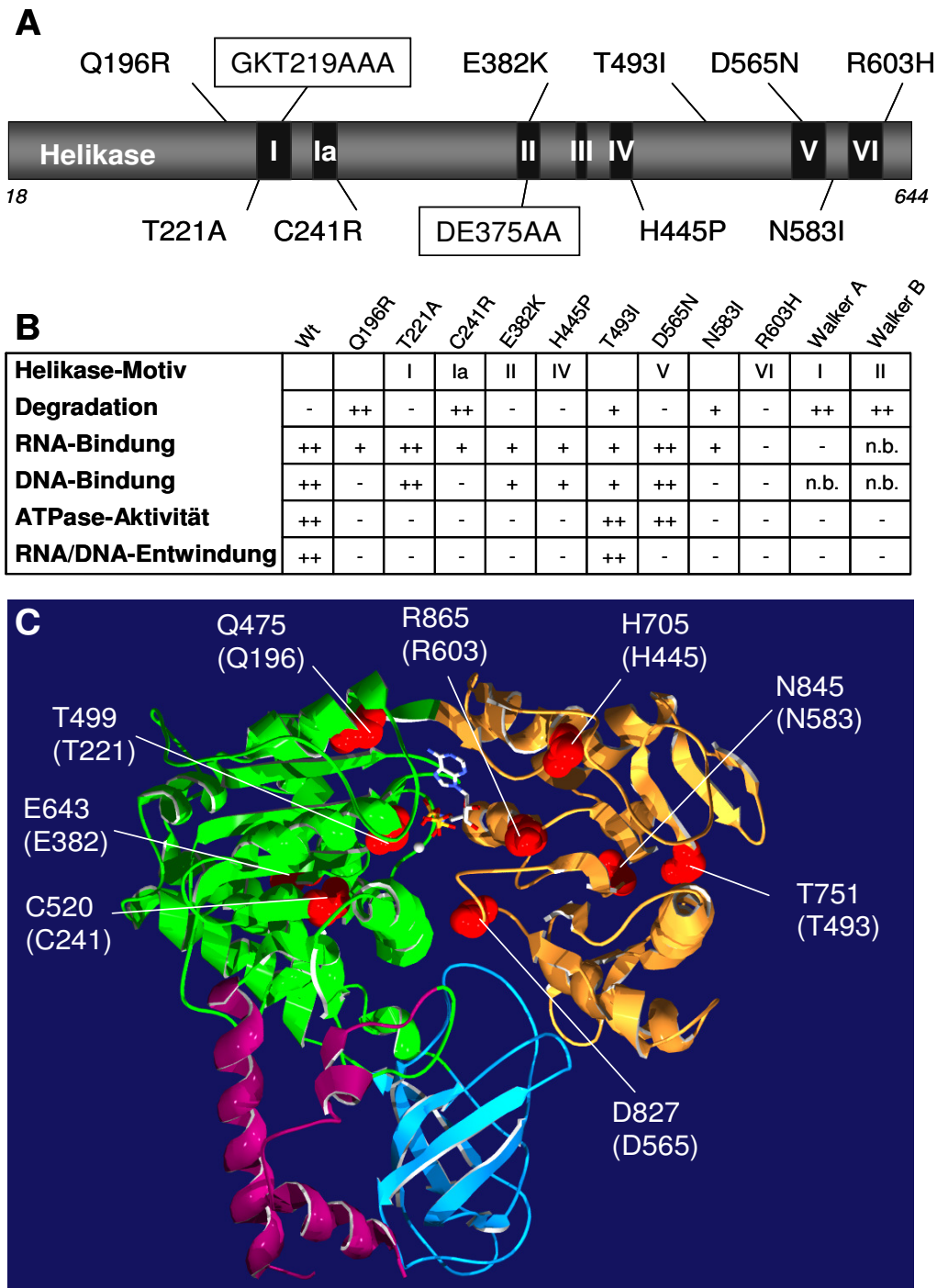


Abbildung 41: Lage und Effekte der untersuchten SMARD1-Mutationen des IGHMBP2-Proteins. A) Lage der untersuchten SMARD1-Mutanten in der Primärsequenz des IGHMBP2-Proteins und der Helikasemotive. **B)** Zusammenfassung der Auswirkungen der untersuchten SMARD1-Mutationen auf die enzymatische Aktivität. - = totaler Verlust an Aktivität, + = moderate Reduktion in der Aktivität, ++ = volle Aktivität. **C)** Räumliche Anordnung der korrespondierenden Aminosäuren der untersuchten SMARD1-Mutationen in der Struktur der Helikasedomäne des hUPF1-Proteins (Sequenzidentität: 34%; Sequenzähnlichkeit: 48% zu IGHMBP2; Cheng *et al.*, 2007). Die Darstellung folgt der Beschriftung für *Abbildung 5*. Alle korrespondierenden Reste (mit den entsprechenden Positionen im IGHMBP2-Protein in Klammern) sind als rote Kugeln dargestellt.

Abgesehen von den T221A- und D565N-Mutanten, offenbaren neun SMARD1-relevante Mutanten leichte bis starke Defizite der Nukleinsäurenbindung, die bei der Bindung zu DNA besonders in Erscheinung treten. RNA-Bindungstests für humanes UPF1-Protein zeigen nur für Mutanten des Nukleinsäurebindungskanals, dessen Lage im IGHMBP2-Protein unbekannt ist, drastische Reduktionen um 70%. Mutanten der Helikasemotive I, II, III und IV bewahren jedoch Bindungsfähigkeit zu einzelsträngiger RNA (Cheng *et al.*, 2007). Leichte Unterschiede in der Bindungsfähigkeit zwischen den UPF1-Mutanten und korrespondierenden IGHMBP2-Mutanten lassen sich möglicherweise auf technische Unterschiede zurückführen, da bei der angesprochenen Studie Filterbindungsassays und „*surface plasmon resonance assays*“ mit dem 150-fachen der eingesetzten IGHMBP2-Proteinmengen durchgeführt wurden (s. 2.3.4.9).

Der vollständige Verlust der Nukleinsäurebindung der R603H-Mutante (Helikasemotiv VI) steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Aminosäureaustausche im Helikasemotiv VI des Hefehomologs von hUPF1 (*Upf1p*) die Bindungsfähigkeit an RNA unterbinden und sich daher wahrscheinlich funktionell wichtig (Weng *et al.*, 1996). Da R603 möglicherweise die Funktion des „Arginin-Fingers“ im IGHMBP2-Protein ausübt, der mit dem γ -Phosphat des ATP interagiert (Cheng *et al.*, 2007), könnte der Verlust der Nukleinsäurebindung aus einer gestörten Modulation der Nukleinsäureaffinität in Abhängigkeit von der NTP-Hydrolyse resultieren. D.h. das Protein bleibt in einer Konformation, in der es eine geringe Nukleinsäureaffinität besitzt. Die drastische Reduktion der Ausbildung von Nukleinsäure-Proteinkomplexen bei der N583I-IGHMBP2-Variante lässt sich ohne Strukturdaten schlecht erklären. Die korrespondierende Aminosäure zu N583, N845 des hUPF1-Proteins, liegt nicht in der Nähe der ATP-Bindungstasche (*Abbildung 41C*). Möglicherweise ist dieser Rest für eine direkte Interaktion mit der Nukleinsäure wichtig.

Die ATP-Hydrolyse ist mit Ausnahme der T493I- und D565N-Mutanten bei allen SMARD1-Mutanten stark reduziert (<17% Restaktivität gegenüber Wildtyp-IGHMBP2). Während der primäre Effekt der N583I- und R603H-Mutationen wahrscheinlich in einer stark eingeschränkten Bindung zu Nukleinsäuren liegt, beeinträchtigen die Mutationen Q196R, T221A, C241R, E382K und H445P primär die ATP-Bindung oder -Hydrolyse. In Übereinstimmung damit finden sich Kristallstrukturdaten für humanes UPF1, welche die korrespondierenden Aminosäurereste von Q196 (=Q475) und T221 (=T499) in der ATP-

Diskussion

Bindungstasche lokalisieren (*Abbildung 41C*; Cheng *et al.*, 2007). Auch die entsprechenden Aminosäuren im UPF1-Protein der anderen IGHMBP2-Positionen C241 (=C520), E382 (=E643), H445 (=H705) befinden sich an der Oberfläche zwischen den beiden Subdomänen 1A und 2A, wo die ATP-Hydrolyse katalysiert wird (*Abbildung 41C*; Cheng *et al.*, 2007). Die Mutationen E382K und H445P betreffen Reste, die sechs bzw. zwei Aminosäurepositionen von katalytisch aktiven Aminosäureresten der ATP-Bindungstasche entfernt sind (E382K= Walker B-Motiv; H445P= Helikasemotiv IV). Es erscheint daher plausibel, dass sich die durch die Mutationen verursachten Strukturveränderungen auf das in räumlicher Nähe befindliche aktive Zentrum der ATP-Hydrolyse auswirken. Eine Beteiligung des Walker B- und des Helikasemotivs IV an der ATP-Hydrolyse wurde in biochemischen und kristallografischen Untersuchungen verschiedener Helikasen der Superfamilie 1 nachgewiesen (Weng *et al.*, 1996; Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2007).

Weiter bestätigen „*strand displacement*“-Experimente mit RNA- und DNA-Duplices übereinstimmend, dass die ATP-Hydrolyse eine Voraussetzung für die Helikase-Aktivität ist, da keine der ATPase-defizienten IGHMBP2-Varianten Entwindungsaktivität besitzt.

Die D565N-Mutation, die im Helikasemotiv V liegt, entkoppelt die ATP-Hydrolyse von der Helikase-Aktivität. Eine ähnliche Wirkung haben Mutationen im Motiv V der SF1 Helikase UL5 oder der SF2 Helikase Vasa (Graves-Woodward *et al.*, 1997; Sengoku *et al.*, 2006). Allerdings erbrachte die Überprüfung der enzymatischen Aktivitäten auch, dass die ATPase-Funktion durch die Aminosäureveränderungen bereits beeinträchtigt oder die Helikase-Funktion nicht vollständig verloren gegangen war. Für das Vasa-Protein konnten Sengoku *et al.* zeigen, dass die betroffenen Aminosäurereste an der Interaktion zwischen den verschiedenen Subdomänen beteiligt sind. Obgleich eine 3D-Struktur der Helikasedomäne des IGHMBP2-Proteins bisher nicht vorliegt, kann man bei Betrachtung der Proteinstruktur der sehr homologen Helikasedomäne des humanen UPF1-Proteins ebenfalls eine Beteiligung an Interdomänen-Kontakten vermuten (*Abbildung 42E-G*; Cheng *et al.*, 2007). Die bei IGHMBP2 veränderte Aminosäure (D565) im Helikasemotiv V ist auch im hUPF1-Protein konserviert (D827; *Abbildung 42A*). Während eines ATP-Zyklus kommt es zu Konformationsveränderungen, bei denen sich die verschiedenen Subdomänen zueinander verschieben (*Abbildung 42B-D*) und so die Affinität zur gebundenen Nukleinsäure modulieren. Dabei spielt eine „loop“-Region in

der Subdomäne 1B eine besondere Rolle, die zwischen einem stabilisierten und einem nicht-stabilisierten („disordered“) Zustand wechselt (Cheng *et al.*, 2007).

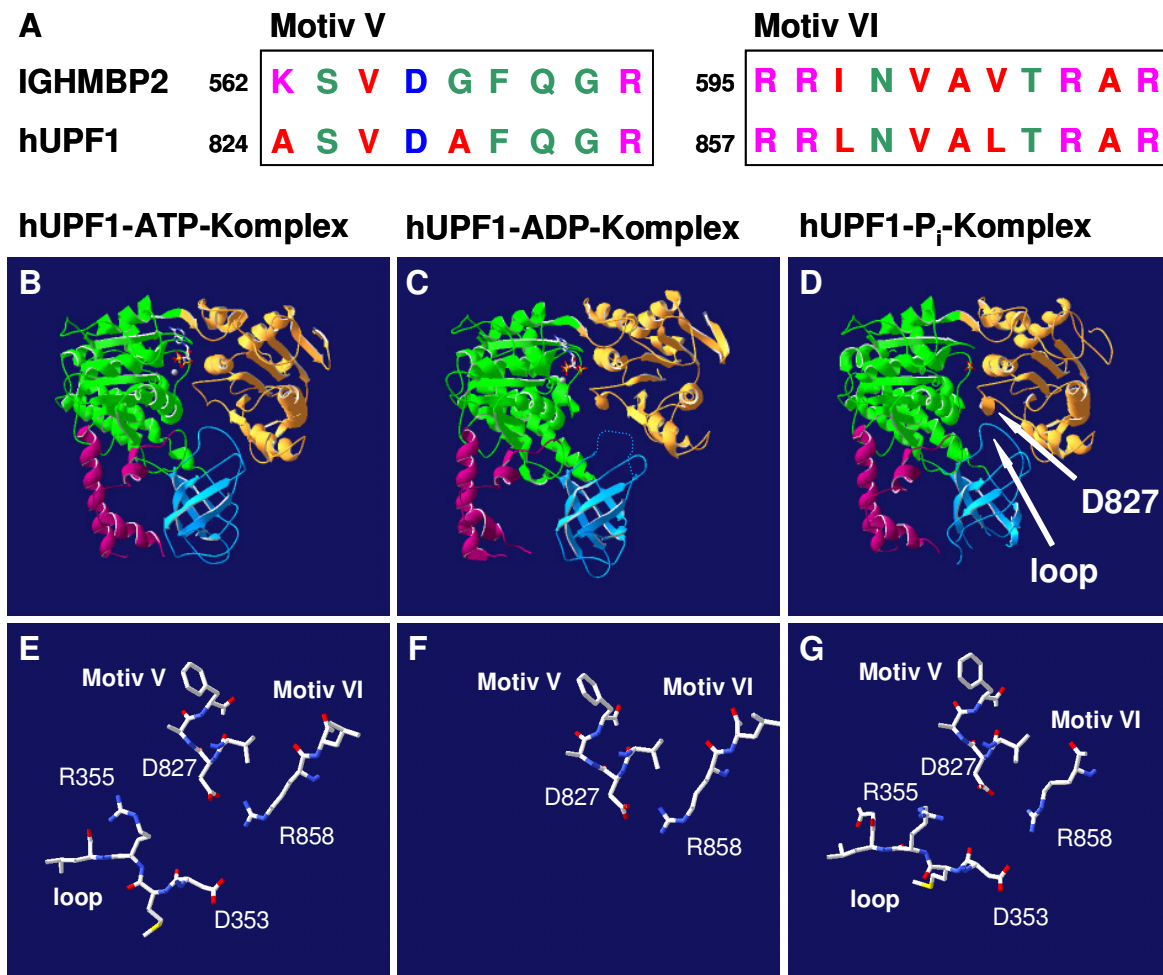


Abbildung 42: Strukturmechanistische Grundlagen der D565N-Mutation. **A)** Vergleich der Primärsequenz des humanen IGHMBP2- und des humanen UPF1-Proteins belegen eine Konservierung der korrespondierenden Aminosäurereste in den Helikasemotiven V und VI, im Speziellen der Reste D565 (hUPF1: D827) und R596 (hUPF1: R858). Erklärung der Farben siehe *Abbildung 4*. **B-D)** Proteinstrukturen des hUPF1-Proteins (Cheng *et al.*, 2007) während des ATPase-Zyklus belegen strukturelle Veränderungen der verschiedenen Subdomänen der Helikasedomäne. Die Farben repräsentieren die verschiedenen Subdomänen der Helikasedomäne (siehe *Abbildung 5*). Die „loop“-Region ist im ADP-hUPF1-Komplex nicht stabil („disordered“) und deshalb gepunktet dargestellt. **E-G)** „Stick“-Darstellung des D827-Restes während eines Zyklus der ATP-Hydrolyse. (E-G entsprechen den Konformationen von B-D; ausführliche Beschreibung siehe Diskussion).

Möglicherweise ist der korrespondierende Aminosäurerest D827 im Helikasemotiv V an der Modulation dieser Zustände auf struktureller Ebene beteiligt. Im ATP- und im ADP-hUPF1-Komplex bildet D827 eine Salzbrücke mit R858 des Helikasemotivs VI aus (Distanz ~ 3 Å). Im Komplex mit P_i ist allerdings der Abstand zu R858 größer (Distanz $> 3,5$ Å), wahrscheinlich weil R858 auch eine Salzbrücke mit D353 aus dem

Diskussion

„loop“ ausbildet (Distanz $\sim 3,8$ Å). Möglicherweise trägt D827 zur weiteren Stabilisierung des „loop“ durch eine Interaktion mit R355 bei (Distanz ~ 5 Å). Unter der Annahme, dass die strukturellen Reaktionsmechanismen zwischen hUPF1 und IGHMBP2 ähnlich sind (was durch die hohe Homologie und eine konservierte Faltung der Domänen 1A und 2A von Helikasen gerechtfertigt erscheint), ist auch für den korrespondierenden Rest im IGHMBP2-Protein (D565) eine Interaktion mit Helikasemotiv VI (R596) und damit möglicherweise eine mittel- oder unmittelbare Beteiligung an Interdomänen-Interaktionen anzunehmen, die durch die Mutation beeinträchtigt wird. Weitere Studien zur Struktur der Helikasedomäne des IGHMBP2 müssen klären, wie diese Mutation im Helikasemotiv V die Entkopplung voller ATPase-Aktivität von RNA/DNA-Entwindungsaktivität verursacht.

Die Pathogenität der T493I-IGHMBP2-Proteinvariante, die noch über eine unverminderte Helikase-Aktivität verfügt, erklärt sich durch eine reduzierte Proteinstabilität, die sowohl bei Patienten als auch heterozygoten Trägern der c.1478T>C (p.T493I)-Mutation beobachtet wurde. Im Einklang damit steht die Lokalisation dieser SMARD1-Mutation in der Struktur des Proteins, da dies die einzige untersuchte Veränderung ist, die nicht in der Nähe eines Helikasemotivs liegt (*Abbildung 41C*). Besonders interessant ist, dass sie auch bei einer Patientin mit juvenilem Beginn der Atemnot (Juv Px 2) identifiziert wurde. Somit gibt es Grund zur Annahme, dass die verbliebene IGHMBP2-Helikase-Aktivität möglicherweise für den milden Krankheitsverlauf verantwortlich sein könnte (Diskussion s.o.).

Zusammenfassend lässt sich die Pathogenität jeder hier betrachteten SMARD1-Mutation mit einem Verlust der RNA/DNA-Helikase-Aktivität des IGHMBP2 *in vitro* oder *in vivo* erklären. Dies stellt somit einen primären biochemischen Defekt im Pathomechanismus der Erkrankung dar. Diese Daten beantworten allerdings nicht die Frage, weshalb der Verlust der IGHMBP2-Helikase-Aktivität zur selektiven Degeneration der α -Motoneurone führt.

4.6 Der molekulare Pathomechanismus der SMARD1: Konsequenz einer Störung des zellulären Translationsapparates?

Ausgehend von der hier gezeigten Analyse der biochemischen Aktivität und der hauptsächlich zytoplasmatischen Lokalisation des IGHMBP2 konnte in Zusammenarbeit

mit dem Labor von Herrn Prof. Utz Fischer (Universität Würzburg) ein zytoplasmatischer Komplex mit IGHMBP2 von etwa 80S identifiziert werden (Katja Grohmann und Lusy Handoko, persönliche Kommunikation). Weitere Experimente deuten daraufhin, dass es sich bei dem Komplex um Ribosomen handelt, an die IGHMBP2 assoziiert ist. Das legt die Vermutung nahe, dass IGHMBP2 an der Proteinsynthese bzw. der Regulation der Genexpression auf der Ebene der Translation beteiligt ist.

Wie der Ausfall einer ubiquitär exprimierten Helikase, die an einem grundlegenden zellulären Prozess wie der Translation beteiligt sein könnte, zu dem zelltyp-spezifischen Phänotyp der SMARD1 führt, lässt sich möglicherweise anhand der „klassischen“ SMA erklären, die ebenfalls durch Mutationen in einem sogenannten „Haushalts“-Gen verursacht wird (Monani *et al.*, 2005; Winkler *et al.*, 2005; Eggert *et al.*, 2005).

Bezüglich des zelltyp-spezifischen Phänotyps der SMA postuliert dabei eine Schule, dass bestimmte prä-mRNAs gewebsspezifischer Gene aufgrund suboptimaler Spleißstellen weniger schnell bzw. weniger effizient gespleißt werden als konstitutiv exprimierte prä-mRNAs (Faustino und Cooper, 2003). Bekannt ist, dass die Reduktion des zellulären SMNs zu einer Reduktion der U snRNPs führt, die für das Spleißen verantwortlich sind (Winkler *et al.*, 2005). Gewebsspezifische prä-mRNAs würden in diesem Szenario empfindlicher auf einen Rückgang aktiver Spleißosomen reagieren als konstitutiv exprimierte.

Bezogen auf die SMARD1 müsste man dieses Modell auf den Prozeß der Translation erweitern. IGHMBP2 entwindet möglicherweise Sekundärstrukturen von mRNAs (z.B. Haarnadel- oder Kleeblattstrukturen), die sonst eine reibungslose Translation verhindern. Der Verlust von ribosomen-assoziiertem IGHMBP2 führt daher zu einem gewebsspezifischen Phänotyp, weil spezifische mRNAs weniger effizient translatiert werden. Da IGHMBP2 *in vitro* unspezifisch RNAs bindet, sorgt die Interaktion mit dem Komplex möglicherweise *in vivo* auch für die Spezifität der Entwindung, d.h. welche doppelsträngigen Strukturen wann entwunden werden. Diese Hypothese erscheint auch deshalb attraktiv, weil sie gleichzeitig die myopathischen Veränderungen der *nmd*-Maus bzw. *nmd*-TgNI-Maus durch eine weitere Gewebsspezifität bzw. -sensitivität erklären könnte (Grohmann *et al.*, 2004; Maddatu *et al.*, 2004).

Der gewebsspezifische Phänotyp der SMARD1 lässt sich allerdings auch auf andere Weise mit dem Ausfall der enzymatischen Aktivität des IGHMBP2 in Verbindung setzen:

Diskussion

i) Das ribosomen-assoziierte IGHMBP2 hat eine gesonderte neuronale Funktion bei der Proteinsynthese bzw. der Regulation der Genexpression in Motoneuronen. In Analogie wurden für das angesprochene SMN-Protein auch spezifisch neuronale Funktionen postuliert (Monani *et al.*, 2005; Rossoll *et al.*, 2005). In Motoneuronen werden aufgrund der starken Polarität der Zellen mRNAs zum Teil zu ihrem Bestimmungsort transportiert (z.B. der neuromuskulären Endplatte) und dort erst translatiert. Diese als „*mRNA localization*“ und „*localized protein synthesis*“ bezeichneten Prozesse sind eng reguliert in Bezug darauf, wann und welche mRNAs diesen Mechanismen unterliegen (Wang *et al.*, 2006). Der gewebsspezifische Phänotyp der SMARD1 kann daher ein Hinweis auf eine besondere Funktion des IGHMBP2 bei diesen zellulären Prozessen (Modulation der mRNPs, axonale Proteinsynthese) sein.

ii) IGHMBP2 ist an einer nukleären Funktion in neuronalen Zellen beteiligt, wie z.B. der Transkription. Dabei sollte man beachten, dass IGHMBP2 auch partiell doppelsträngige DNA-Duplices entwindet und als Komponente eines Komplexes in Zellkernextrakten von HeLa-Zellen identifiziert wurde, der ein Promotorelement des „*Insulin II*“-Gens bindet (Shieh *et al.*, 1995). Ungeklärt ist, ob diese Interaktion nicht auch durch die anderen nukleinsäurebindenden Domänen des IGHMBP2 vermittelt wird, namentlich der R3H-Domäne oder dem AN1-ähnlichen Zinkfinger.

Weitere Studien sollten zum Ziel haben, die Funktion der ribosomalen Assoziation des IGHMBP2 zu verstehen. Wichtig sind außerdem Vorwärts- und Rückwärtsansätze, die ermitteln, welche Zielgene möglicherweise durch IGHMBP2 in ihrer Expression reguliert werden. Diese Gene aufzufinden, wäre ein großer Schritt auf dem Weg zur Aufklärung des Pathomechanismus der SMARD1. Wir würden Wichtiges darüber lernen, welche besonderen molekularen und zellbiologischen Ansprüche und Anpassungen α -Motoneurone, die längsten Zellen des menschlichen Körpers, aufgrund ihrer außergewöhnlichen Morphologie haben.