

**SMNrp und TUBA:  
Isolierung und Charakterisierung zweier neuer Gene  
mit Homologie zu SMN, dem Krankheitsgen der  
spinalen Muskelatrophie**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Oliver Plöttner

aus

Lahnstein

Bonn 2002



Angefertigt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried  
mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Priv-Doz. Dr. Utz Fischer (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried)

2. Referent: Prof. Dr. Volker Herzog (Institut für Zellbiologie, Universität Bonn)

Tag der Promotion: 6. August 2002



M a r i a [zu Elisabeth, Königin von England]:

[...]

Um dieser fremden Zeugen willen, ehrt  
In mir Euch selbst, entweiht, schändet nicht  
Das Blut der Tudor, das in meinen Adern  
Wie in den Euren fließt – O Gott *im* Himmel!

Friedrich Schiller, *Maria Stuart*

*meinen Freunden*



---

*Inhaltsverzeichnis*

1	EINLEITUNG.....	13
2	MATERIAL .....	31
3	METHODEN.....	37
4	ERGEBNISSE.....	59
5	DISKUSSION .....	115
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	137
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	139
8	ANHANG .....	151

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
1.1	Die spinale Muskelatrophie (SMA) .....	13
1.2	Die genetischen Ursachen der SMA .....	14
1.2.1	Das Krankheitsgen „survival motor neuron“ (SMN).....	14
1.2.2	Der genetische Mechanismus der SMA-Pathogenese.....	15
1.2.3	Die Analyse der SMA durch Maus-Modelle .....	16
1.3	Aufbau und Funktion des SMN-Proteins .....	17
1.3.1	Initiale Charakterisierung des SMN-Proteins .....	17
1.3.2	SMN ist Teil makromolekularer Proteinkomplexe.....	18
1.3.3	SMN ist an der Biogenese der spleißosomalen snRNPs im Cytoplasma beteiligt.....	20
1.3.4	Die Funktion von SMN im Zellkern .....	22
1.3.5	Die Domänenstruktur des SMN-Proteins .....	25
1.4	Die Tudor-Domäne .....	26
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>31</b>
2.1	Geräte.....	31
2.2	Chemikalien und Enzyme .....	31
2.3	Puffer und Kulturmedien.....	31
2.4	Genbanken.....	33
2.5	Plasmide .....	33
2.6	Antikörper .....	35
2.7	Organismen .....	36
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>37</b>
3.1	Molekular- und zellbiologische Methoden.....	37
3.1.1	Standardmethoden der Molekularbiologie.....	37
3.1.2	Klonierung von cDNA-Fragmenten.....	37
3.1.3	Northernblot-Hybridisierung.....	37
3.1.4	Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen .....	39
3.1.5	Two-Hybrid-Screen.....	40
3.1.5.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen .....	40
3.1.5.2	Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode .....	40
3.1.5.3	Prinzip des <i>Two-Hybrid-Screens</i> .....	40
3.1.5.4	<i>Two-Hybrid-Screen</i> nach SMNrp-Interaktionspartnern.....	41
3.1.5.5	<i>Two-Hybrid-Screen</i> nach TUBA-Interaktionspartnern.....	42
3.1.5.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen.....	42

<b>3.2</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Standardmethoden der Proteinbiochemie.....	43
3.2.2	Diskontinuierliche Gelelektrophorese von Proteinen.....	43
3.2.3	Rekombinante Expression von Proteinen.....	44
3.2.3.1	Expression in <i>E. coli</i> .....	44
3.2.3.2	Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen .....	45
3.2.4	Radioaktive Markierung von Proteinen durch gekoppelte in-vitro-Transkription und -Translation.....	45
3.2.5	Herstellung von Zellextrakten .....	46
3.2.5.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus transfizierten 293-Zellen.....	46
3.2.5.2	Herstellung von HeLa-Zellextrakten .....	46
3.2.6	Bindungsexperimente .....	47
3.2.7	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.....	47
3.2.8	Identifikation von Proteinen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	48
<b>3.3</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Immunologische Standardmethoden .....	48
3.3.2	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	49
3.3.3	Proteinnachweis durch Westernblot .....	49
3.3.4	Immunpräzipitation .....	50
3.3.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	51
<b>3.4</b>	<b>Spezielle Experimente .....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Acetylierung von Histonen .....	52
3.4.2	Spleißen einer prä-mRNA .....	52
3.4.2.1	Radioaktive Markierung von RNA.....	52
3.4.2.2	Herstellung von SMNrp-depletiertem Kernextrakt .....	53
3.4.2.3	Spleißreaktion <i>in vitro</i> .....	54
3.4.2.4	Das <i>Xenopus laevis</i> Oocytensystem .....	54
3.4.2.5	Spleißreaktion in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten .....	55
3.4.3	Decatenierung von Kinetoplast-DNA.....	55
3.4.4	Inhibition der in-vitro-Translation einer mRNA .....	56
3.4.4.1	<i>Run-off</i> -Transkription der SMN-cDNA.....	56
3.4.4.2	Translations-Assay .....	56
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Das SMN-homologe Protein SMNrp.....</b>	<b>59</b>
4.1.1	Identifizierung und Klonierung von SMNrp .....	59
4.1.1.1	Entdeckung von SMNrp und Klonierung der cDNA .....	59
4.1.1.2	SMNrp ist ein entwicklungsgeschichtlich altes Protein .....	62
4.1.2	SMNrp wird ubiquitär transkribiert und codiert für ein Kernprotein.....	63
4.1.2.1	Das SMNrp-Gen wird in allen Geweben transkribiert .....	63
4.1.2.2	Herstellung eines SMNrp-spezifischen Antiserums.....	64
4.1.2.3	SMNrp lokalisiert im Zellkern .....	65
4.1.3	SMNrp ist ein Aktivator der Histon-Acetyltransferase GCN5-S .....	67
4.1.3.1	Suche nach Interaktionspartnern durch <i>Two-Hybrid-Screen</i> .....	67
4.1.3.2	SMNrp bindet direkt an GCN5-S .....	68
4.1.3.3	Die Tudor-Domäne von SMNrp ist für die Bindung an GCN5-S wichtig .....	70
4.1.3.4	Der GCN5-S-SMNrp-Komplex kann Nucleosomen acetylieren.....	71

4.1.4	SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor .....	74
4.1.4.1	SMNrp ist mit dem 17S-U2-snRNP assoziiert .....	74
4.1.4.2	Das Spleißen von prä-mRNA benötigt SMNrp .....	76
<b>4.2</b>	<b>Das UBA- und Tudor-Domänen-Protein TUBA .....</b>	<b>79</b>
4.2.1	Identifizierung und Klonierung eines weiteren Tudor-Domänen-Proteins.....	79
4.2.1.1	Entdeckung von TUBA und Klonierung der cDNA .....	79
4.2.1.2	Das humane TUBA-Gen besteht aus 14 Exons .....	83
4.2.1.3	TUBA ist ein bei höheren Eukaryonten konserviertes Protein .....	83
4.2.1.4	Das <i>TUBA</i> -Gen wird ubiquitär exprimiert.....	83
4.2.2	TUBA ist im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert.....	85
4.2.2.1	Herstellung eines spezifischen Antiserums.....	85
4.2.2.2	Lokalisation von endogenem und rekombinantem TUBA in Kulturzellen ....	86
4.2.3	TUBA interagiert mit DNA-Topoisomerase-III-beta (TOP3 $\beta$ ) .....	91
4.2.3.1	TOP3 $\beta$ copräzipitiert mit TUBA in stöchiometrischen Mengen.....	91
4.2.3.2	TOP3 $\beta$ und TUBA binden direkt aneinander und colokalisieren im Cytoplasma	92
4.2.3.3	TUBA hat keinen Einfluss auf die Topoisomerase-Aktivität von TOP3 $\beta$ <i>in vitro</i>	94
4.2.4	FMRP, das Krankheitsgenprodukt des Fragilen-X-Syndroms, und seine	
	Homologe interagieren mit TUBA.....	96
4.2.4.1	FXR1 wird als Interaktionspartner von TUBA im <i>Two-Hybrid-Screen</i>	
	gefunden	96
4.2.4.2	FMRP, FXR1 und FXR2 binden direkt an TUBA und lassen sich	
	copräzipitieren.....	99
4.2.4.3	TUBA und FMRP zeigen ein ähnliches Laufverhalten bei der	
	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und colokalisieren partiell im Cytoplasma .....	100
4.2.4.4	Ein Einfluss von TUBA auf die Aktivität von FMRP als Inhibitor der	
	Translation ist nicht nachweisbar.....	101
4.2.4.5	Zwei unterschiedliche Regionen in der FMRP-Sequenz sind für die Bindung an	
	TUBA verantwortlich .....	104
4.2.4.6	Die in Patienten gefundene Punktmutante FMRP-I304N bindet nicht mehr an	
	TUBA	106
4.2.5	Verschiedene Domänen von TUBA haben unterschiedliche Aufgaben bei der	
	Protein-Interaktion .....	109
4.2.5.1	TOP3 $\beta$ bindet an den N-Terminus von TUBA, die FMRP-Bindungsstelle ist	
	der Tudor-Domäne benachbart .....	109
4.2.5.2	Die UBA-Domäne von TUBA bindet spezifisch an Lys <sub>48</sub> -verknüpfte	
	Ubiquitin-Ketten .....	110
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>115</b>
<b>5.1</b>	<b>SMNrp ist ein Protein mit verschiedenen Funktionen im Zellkern .....</b>	<b>115</b>
5.1.1	Initiale Charakterisierung von SMNrp.....	115
5.1.2	SMNrp ist ein U2-snRNP-assoziiertes, essentielles Spleißfaktor .....	116
5.1.3	SMNrp als Cofaktor der Histon-Acetyltransferase GCN5.....	120
5.1.3.1	Ist SMNrp Komponente eines humanen GCN5-Komplexes? .....	121
5.1.3.2	Welche Funktion könnte die Interaktion von SMNrp mit GCN5 haben?.....	123
5.1.4	SMNrp, ein Bindeglied zwischen Transkription und Spleißen?.....	124

---

<b>5.2</b>	<b>Analyse des UBA- und Tudor-Domänen-Proteins TUBA .....</b>	<b>126</b>
5.2.1	Sequenz, Expression und intrazelluläre Lokalisation.....	126
5.2.2	Die Interaktion von TUBA mit DNA-Topoisomerase-III-beta .....	127
5.2.3	TUBA ist ein Komplexpartner von FMRP und seinen Homologen.....	130
5.2.4	Die Funktionen von Tudor-, UBA- und anderen Domänen .....	134
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>139</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>151</b>
8.1	Abkürzungen.....	151
8.2	Buchstabensymbole für Aminosäuren und Nucleotide.....	154
8.3	Veröffentlichungen .....	155
8.4	Danksagungen.....	156



# 1 Einleitung

## 1.1 Die spinale Muskelatrophie (SMA)

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine tödlich verlaufende, neuromuskuläre Erkrankung des Menschen. Sie tritt mit einer geschätzten Inzidenz von 1 in 10 000 Neugeborenen auf und ist damit die zweithäufigste, autosomal rezessive Erbkrankheit mit Todesfolge nach cystischer Fibrose (Roberts *et al.*, 1970; Pearn, 1973; Pearn, 1978). SMA ist gekennzeichnet durch fortschreitende Degeneration der  $\alpha$ -Motoneuronen in den Vorderhörnern der grauen Substanz des Rückenmarks. Dadurch kommt es bei den Patienten zu progressiver Muskelschwäche und -atrophie an den Gliedmaßen und am Rumpf. Die proximale Muskulatur ist dabei meist früher und stärker betroffen als die distale. Daneben werden abgeschwächte oder fehlende Muskeleigenreflexe, häufige Faszikulationen und auch Skelettanomalien (Skoliose, Hyperlordose, Hohlfuß) beobachtet. Die Patienten haben eine normale Intelligenz. Eine spezifische Therapie der SMA ist bisher nicht bekannt.

Nach dem Zeitpunkt des ersten Auftretens von Symptomen und dem klinischen Verlauf der Erkrankung werden drei verschiedene Formen der SMA unterschieden (Munsat und Davies, 1992), siehe Tabelle 1-1): Patienten mit Typ-I-SMA (auch: Werdnig-Hoffmann-Krankheit) erkranken innerhalb der ersten sechs Lebensmonate. Aufgrund der stark ausgeprägten und schnell zunehmenden Muskelschwäche erlernen sie nie das Sitzen oder Gehen und sterben innerhalb der ersten zwei bis drei Jahre an Ateminsuffizienz. Bei Typ-II-SMA treten die ersten Symptome innerhalb der ersten 18 Lebensmonate auf. Die betroffenen Kinder lernen meist noch selbstständig zu sitzen, können aber ohne fremde Hilfe nicht stehen oder gehen. Die Lebenserwartung liegt bei etwa 10 Jahren. Bei Typ-III-SMA (auch: Kugelberg-Welander-Syndrom) zeigen sich die ersten Symptome erst nach dem 18. Lebensmonat. Die Patienten können häufig noch selbstständig stehen und laufen. Die Krankheit zeigt hier einen milderen, chronischen Verlauf, die Betroffenen erreichen das Erwachsenenalter.

SMA-Typ	Erkrankungsalter	Lebenserwartung	Verlauf
I (Werdnig-Hoffmann)	1 – 6 Monate	2 – 3 Jahre	akut
II (intermediäre Form)	6 – 18 Monate	10 Jahre und mehr	intermediär
III (Kugelberg-Welander)	18 Monate bis Erwachsenenalter	30 Jahre und mehr	chronisch

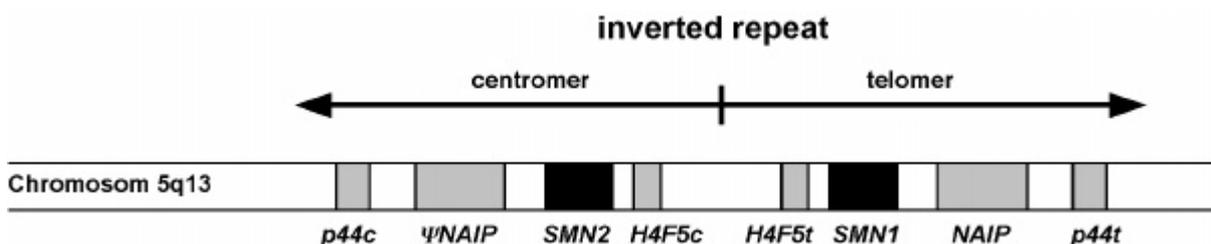
*Tabelle 1-1: Die proximale spinale Muskelatrophie verhält sich klinisch heterogen.*

## 1.2 Die genetischen Ursachen der SMA

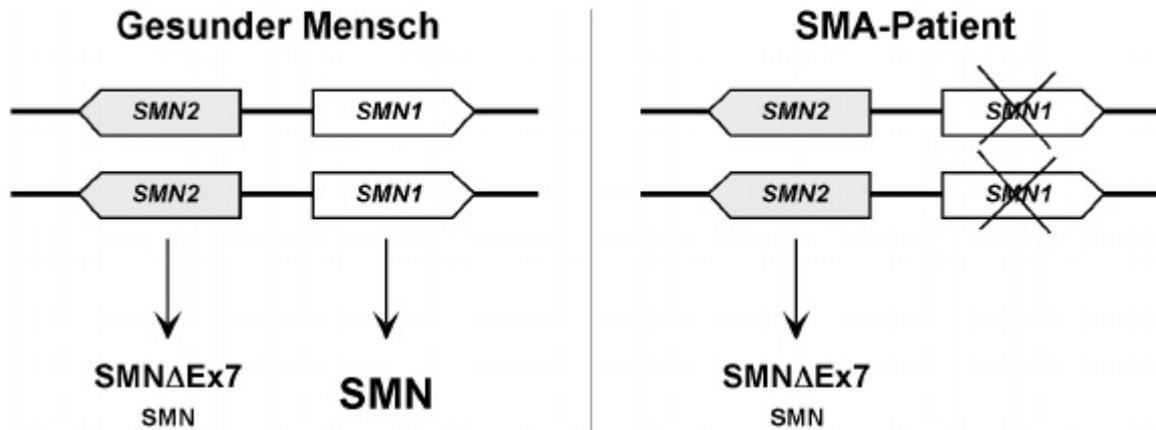
### 1.2.1 Das Krankheitsgen „*survival motor neuron*“ (SMN)

Bereits 1990 wurde durch Kopplungsanalysen herausgefunden, dass sich alle drei SMA-Formen trotz der klinischen Heterogenität genetisch homogen verhalten, d. h. mit Mutationen in der gleichen genomischen Region auf Chromosom 5 im Bereich 5q11.2-13.3 korrelieren (Brzustowicz *et al.*, 1990; Gilliam *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1990). Fünf Jahre später wurde in diesem Abschnitt durch positionelles Klonieren das Gen *survival motor neuron* (SMN) entdeckt, das, wie inzwischen als gesichert gilt, ursächlich für die Entstehung der SMA verantwortlich ist (Lefebvre *et al.*, 1995).

Das SMN-Gen liegt mit drei anderen Genen innerhalb einer etwa 500 kb großen, invertiert-duplizierten Region (*inverted repeat*). Dadurch gibt es von SMN jeweils eine telomere Kopie (SMN1) und eine centromere Kopie (SMN2) auf Chromosom 5 (siehe Abbildung 1-1). Beide SMN-Gene umfassen je neun Exons (Exon1, 2a, 2b und 3 bis 8) und sind auf DNA-Ebene zu 99 % identisch. Verschiedene humangenetische Studien konnten zeigen, dass in etwa 95 % aller untersuchten SMA-Patienten das telomere SMN1-Gen homozygot deletiert ist. Bei einigen Patienten wurden auch Punktmutationen, Mikrodeletionen und -insertionen oder kurze Duplikationen innerhalb der SMN1-Sequenz gefunden (Wirth, 2000). Ein homozygotes Fehlen von SMN2, wie es in 3-5 % einer Kontrollgruppe gefunden wurde, ist dagegen ohne klinischen Phänotyp (Lefebvre *et al.*, 1995). Normalerweise werden beide SMN-Gene exprimiert. Das Fehlen von SMN1 bei SMA-Patienten kann aber offensichtlich nicht durch die Expression von SMN2 kompensiert werden.



**Abbildung 1-1:** Durch Genduplikation gibt es beim Menschen zwei Kopien des SMN-Gens. SMN liegt mit den drei anderen Genen *BTFp44*, *NAIP* und *H4F5* innerhalb einer 500 kb großen, invertiert-duplizierten Region (*inverted repeat*) auf Chromosom 5q13. Dadurch gibt es eine telomere (SMN1) und eine centromere Kopie (SMN2) des Gens (schematische Darstellung nach Wirth, 2000).



**Abbildung 1-2: SMN2 wird alternativ gespleißt.** Die Abbildung zeigt schematisch die genetische Situation im gesunden Menschen (links) und in SMA-Patienten (rechts). Bei letzteren sind beide *SMN1*-Allele durch Mutation beschädigt. Dadurch wird nur noch *SMN2* exprimiert, das durch alternatives Spleißen aber hauptsächlich zur Entstehung eines am C-Terminus verkürzten Proteins (*SMNΔEx7*) führt.

### 1.2.2 Der genetische Mechanismus der SMA-Pathogenese

*SMN2* unterscheidet sich von *SMN1* in nur fünf Nucleotidpositionen, von denen vier in Intron-Abschnitten oder der 3'-untranslatierten Region liegen. Die einzige Nucleotidsubstitution innerhalb des offenen Leserasters, eine C→T-Transition in Exon 7, ist „still“, verändert also die von *SMN2*-codierte Aminosäuresequenz nicht. Allerdings führt dieser Austausch zu einem veränderten Spleiß-Verhalten des Primärtranskripts. Während von *SMN1* fast ausschließlich ein Transkript voller Länge gebildet wird, führt alternatives Spleißen der *SMN2*-prä-mRNA dazu, dass überwiegend ein Transkript entsteht, dem Exon 7 fehlt (Lefebvre *et al.*, 1995). In der Tat konnte inzwischen gezeigt werden, dass der C→T-Austausch in Exon 7 von *SMN2* zur Unterbrechung eines sogenannten *exonic splicing enhancer* führt, also eines Sequenzmotivs, das an der Regulation des Spleißens beteiligt ist (Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999). Durch das Entfernen von Exon 7 beim Spleißen führt die Expression von *SMN2* hauptsächlich zu einem Protein, das im Gegensatz zum *SMN1*-Genprodukt am C-Terminus verkürzt ist (*SMNΔEx7*, siehe Abbildung 1-2). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass dieses verkürzte *SMN2*-Produkt weniger stabil als das SMN-Protein voller Länge ist und eine reduzierte Selbst-Oligomerisierungsaktivität aufweist (Lorson *et al.*, 1998; Pellizzoni *et al.*, 1999; Lorson und Androphy, 2000). In den α-Motoneuronen von SMA-Patienten, die nur noch *SMN2* exprimieren, steht daher vermutlich zu wenig (voll funktionelles) SMN-Protein voller Länge zur Verfügung. Die Krankheit wird also offenbar durch die verminderte Expression und nicht den völligen Verlust von funktionellem SMN hervorgerufen. Für diesen Gendosis-Effekt spricht auch die Tatsache, dass eine direkte Korrelation zwischen der Höhe

der *SMN*-Expression und der Schwere des Phänotyps in SMA-Patienten beobachtet werden kann (Coovert *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997). Darüberhinaus sind inzwischen viele Patienten mit Typ-II- und Typ-III-SMA bekannt, bei denen *SMN1* nicht komplett homozygot deletiert ist, sondern durch Genkonversion die Sequenz von *SMN2* angenommen hat. Auch hier gilt, dass die Krankheit mit steigender Kopienzahl von *SMN2* einen milderen Phänotyp zeigt (Wirth, 2000).

Eine somatische Gentherapie der SMA scheint aus heutiger Sicht schwierig, da es noch keine geeigneten Vektoren gibt, um das gesunde *SMN1*-Gen in ausreichender Menge und in eine ausreichende Anzahl der betroffenen Zellen zu schleusen (Schmalbruch und Haase, 2001). Andere Ideen für eine mögliche Therapie der SMA gehen daher dahin, das Spleißen des in allen Patienten vorhandenen *SMN2*-Gens so zu beeinflussen, dass mehr mRNA (und damit Protein) voller Länge gebildet wird. Mit Htra2- $\beta$ 1 wurde bereits ein Faktor entdeckt, der an der Regulation des Spleißens der SMN-prä-mRNA beteiligt ist (Hofmann *et al.*, 2000). Durch Überexpression von Htra2- $\beta$ 1 in Kulturzellen konnte die Entfernung von Exon 7 beim Spleißen des *SMN2*-Transkripts deutlich reduziert werden. Darüberhinaus wurde kürzlich mit Aclarubicin eine erste chemische Verbindung beschrieben, die das *SMN2*-Spleißen in Fibroblasten von SMA-Patienten auf ähnliche Weise beeinflusst (Andreassi *et al.*, 2001). Es bleibt abzuwarten, ob es möglich wird, aus diesen Ansätzen eine spezifische Therapie der SMA zu entwickeln.

### **1.2.3 Die Analyse der SMA durch Maus-Modelle**

Der genetische Mechanismus der SMA-Pathogenese konnte durch verschiedene Maus-Modelle bestätigt werden. Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse nur ein *Smn*-Gen (DiDonato *et al.*, 1997; Viollet *et al.*, 1997). Die homozygote Disruption (*knock out*) der beiden *Smn*-Allele in der Maus ist letal. Sehr früh in der Embryonalentwicklung, noch vor Erreichen des Blastocysten-Stadiums, kommt es in den *Smn*-defizienten Mäusen zu einem massiven Zellsterben, das schließlich zum Tod der Embryonen noch vor der Nidation führt (Schrank *et al.*, 1997). Es konnte so gezeigt werden, dass *Smn* in der Maus ein essentielles Gen ist. Entsprechend sind Menschen mit homozygoten Defekten in beiden *SMN*-Genen nicht bekannt und vermutlich ebenso wie die *Smn*<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht lebensfähig. Heterozygote Mäuse mit einem intakten *Smn*-Allel (*Smn*<sup>+/-</sup>) entwickeln sich bis zur Geburt normal. Ähnlich wie SMA-Patienten zeigen sie aber eine reduzierte *Smn*-Expression und ein Absterben spinaler Motoneuronen von fast 50 % innerhalb der ersten sechs Monate nach der Geburt (Jablonka *et al.*, 2000b).

Als weitere Tiermodelle für die spinale Muskelatrophie wurden Mäuse entwickelt, die das humane *SMN2* als Transgen vor einem *Smn*<sup>-/-</sup>-Hintergrund tragen (Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000). Durch die Expression des *SMN2*-Transgens überleben die Tiere die Embryonalentwicklung, zeigen aber schon kurz nach der Geburt einen starken SMA-Phänotyp. Sie entwickeln ein progressives Absterben spinaler Motoneuronen, das schließlich zum Tode führt. Auch hier konnte bestätigt werden, dass der Erkrankung ein Gendosis-Effekt zu Grunde liegt. Wie in SMA-Patienten korreliert in den Mäusen die Schwere des beobachteten Phänotyps mit der Menge an exprimiertem SMN-Protein voller Länge (Hsieh-Li *et al.*, 2000) oder mit der Kopienzahl des integrierten *SMN2*-Transgens. Mäuse mit acht *SMN2*-Kopien sind dabei sogar symptomfrei (Monani *et al.*, 2000).

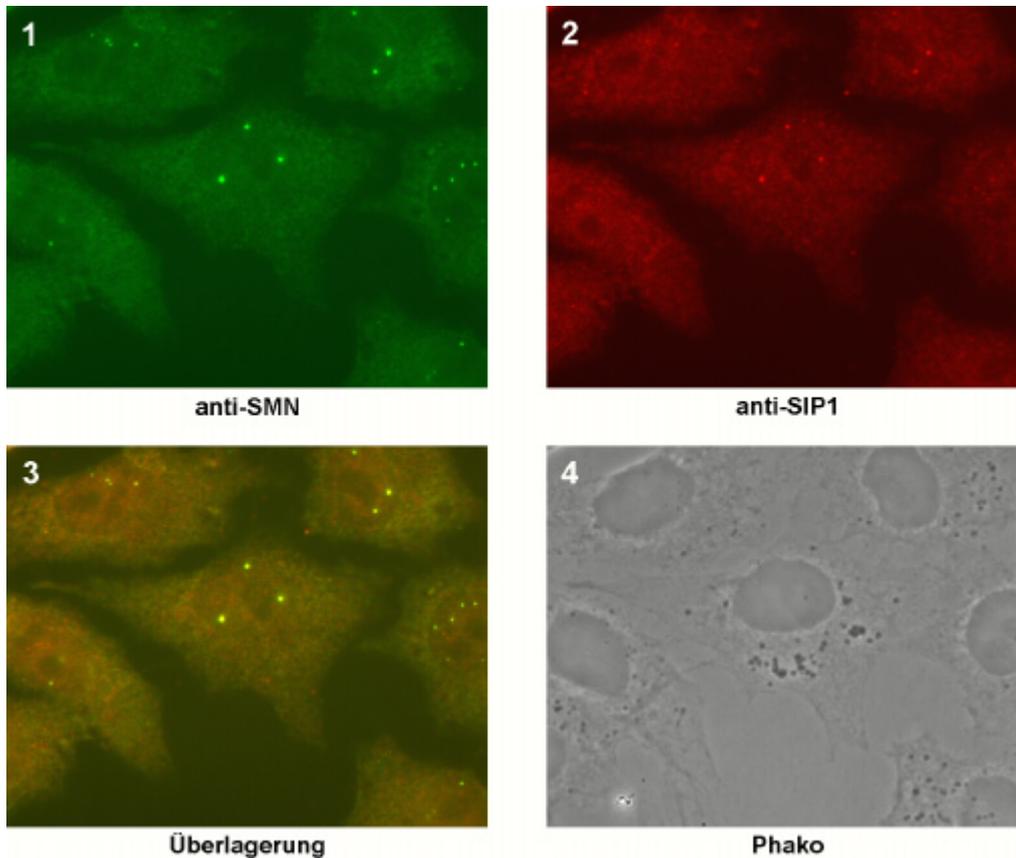
## 1.3 Aufbau und Funktion des SMN-Proteins

### 1.3.1 Initiale Charakterisierung des SMN-Proteins

Die Identifizierung von *SMN1* als Krankheitsgen der SMA ermöglichte die Analyse der zellulären Funktion des SMN-Proteins und damit der molekularen Ursachen der Erkrankung. Erste Experimente zur Charakterisierung ergaben, dass das Gen in allen humanen Zellen, ubiquitär exprimiert wird (Lefebvre *et al.*, 1995). Dies, wie auch der Befund, dass das Gen essentiell für das Überleben der Zellen ist (Schrank *et al.*, 1997), zeigten, dass *SMN* ein sogenanntes Haushaltsgen (*housekeeping gene*) ist, also eine grundsätzliche Funktion im Stoffwechsel aller Zellen erfüllt. *SMN1* codiert für ein Protein aus 294 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 32 kDa (Lefebvre *et al.*, 1995). Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass SMN in seinem mittleren Abschnitt (Aminosäure 90 bis 150) eine Tudor-Domäne trägt. Dabei handelt es sich um eine konservierte Proteindomäne von bislang nicht genau bekannter Funktion, die insbesondere in Proteinen gefunden wird, die an RNA binden oder in den RNA-Metabolismus der Zelle eingebunden sind (Ponting, 1997, siehe auch Kapitel 1.4). Ansonsten ließ die Sequenz keinerlei Schlüsse über eine mögliche Funktion des Proteins zu.

Erste Lokalisationsstudien in HeLa-Zellen ergaben, dass SMN sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern gefunden wird (siehe Abbildung 1-3, Bild 1). Interessanterweise ist es dabei im Zellkern in distinkten Strukturen, sogenannten *gems* (für: *gemini of coiled bodies*) konzentriert, die in unmittelbarer Nachbarschaft von *coiled bodies* gefunden wurden (Liu und Dreyfuss, 1996). Letztere sind ebenfalls intranukleäre Strukturen, die einen hohen Gehalt an snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) aufweisen, und für die eine Funktion bei der

Reifung und als Speicherort dieser Spleißosom-Komponenten diskutiert wird. Inzwischen wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass es in den meisten Zelltypen keinen Unterschied zwischen *coiled bodies* und *gems* gibt (Matera und Frey, 1998; Carvalho *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2000).



**Abbildung 1-3: SMN und SIP1 colokalisieren im Cytoplasma und im Zellkern von HeLa-Zellen.** Die Abbildung zeigt die intrazelluläre Verteilung von SMN (Bild 1) und SIP1 (Bild 2) in HeLa-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie (siehe Kapitel 3.3.5) in Falschfarbendarstellung. Die Überlagerung der beiden Aufnahmen (Bild 3) zeigt, dass beide Proteine im Cytoplasma und in *coiled bodies* / *gems* im Zellkern colokalisieren. Bild 4 zeigt eine Phasenkontrastaufnahme der Zellen.

### 1.3.2 SMN ist Teil makromolekularer Proteinkomplexe

Die Analyse von Punktmutationen in der SMN-Sequenz von SMA-Patienten zeigte, dass das Protein über seinen C-terminalen Abschnitt mit sich selbst interagiert und dass diese Di- oder Oligomerisierung essentiell für die Funktion des Proteins ist (Lorson *et al.*, 1998; Pellizzoni *et al.*, 1999). Durch *Two-Hybrid-Screen* wurde 1997 das Protein SIP1 entdeckt, das *in vitro* und *in vivo* an SMN bindet (Liu *et al.*, 1997). Beide Proteine colokalisieren in *coiled bodies* / *gems* und im Cytoplasma (siehe Abbildung 1-3). Sedimentationsanalysen legten nahe, dass SMN und SIP1 Teil großer Komplexe sind. In der gleichen Arbeit wurde auch gezeigt, dass der SMN-SIP1-Komplex mit verschiedenen Sm-Proteinen, den gemeinsamen Bestandteilen der vier spleißosomalen snRNPs, assoziiert ist. Inzwischen wurden einige weitere Komponenten

des SMN-Komplexes identifiziert (siehe Tabelle 1-2): Die putative RNA-Helikase dp103/Gemin3 und das WD-Domänen-Protein p175/Gemin5 interagieren direkt mit SMN und einigen Sm-Proteinen (Charroux *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000; Meister *et al.*, 2001a; Gubitz *et al.*, 2002). GIP1/Gemin4 bindet nicht direkt an SMN, interagiert aber mit dp103/Gemin3 und den Sm-Proteinen im Komplex (Charroux *et al.*, 2000; Meister *et al.*, 2000). Für das Protein Gemin6 wurde ebenfalls eine Interaktion mit Sm-Proteinen nachgewiesen (Pellizzoni *et al.*, 2001b). Wie zuvor für SIP1 konnte auch für die genannten Proteine gezeigt werden, dass sie mit SMN in *coiled bodies / gems* und zum Teil auch im Cytoplasma koloalisieren. Verschiedene biochemische Aufreinigungen legen dabei nahe, dass sich die SMN-Komplexe im Cytoplasma und im Zellkern teilweise in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, was auf unterschiedliche Funktionen in den beiden Kompartimenten hindeutet (Meister *et al.*, 2000; Bühler, 2001; Meister *et al.*, 2001a). Während nach und nach die einzelnen Komponenten der SMN-Komplexe identifiziert werden, liegt deren genaue Funktion bisher allerdings noch größtenteils im Dunkeln.

Protein	Direkte Interaktion mit SMN	Referenz
SIP1 (Gemin2)	+	(Liu <i>et al.</i> , 1997)
dp103 / Gemin3	+	(Charroux <i>et al.</i> , 1999; Campbell <i>et al.</i> , 2000)
GIP1 / Gemin4	-	(Charroux <i>et al.</i> , 2000; Meister <i>et al.</i> , 2000)
p175 / Gemin5	+	(Meister <i>et al.</i> , 2001a; Gubitz <i>et al.</i> , 2002)
Gemin6	-	(Pellizzoni <i>et al.</i> , 2001b)
Hsc70	?	(Meister <i>et al.</i> , 2001a)
unrip	?	(Meister <i>et al.</i> , 2001a)
Sm- und Lsm-Proteine	+	(Liu <i>et al.</i> , 1997; Friesen und Dreyfuss, 2000)
Profilin	+	(Giesemann <i>et al.</i> , 1999)
E2 (Papillomavirus)	+	(Strasswimmer <i>et al.</i> , 1999)
Coilin	+	(Hebert <i>et al.</i> , 2001)
Fibrillarin	+	(Jones <i>et al.</i> , 2001; Pellizzoni <i>et al.</i> , 2001a)
GAR1	+	(Pellizzoni <i>et al.</i> , 2001a)
hnRNP-Q, -R	+	(Mourelatos <i>et al.</i> , 2001; Rossoll <i>et al.</i> , 2002)
RHA / RNA-Polymerase II	+	(Pellizzoni <i>et al.</i> , 2001c)
ZPR1	+	(Gangwani <i>et al.</i> , 2001)

**Tabelle 1-2: SMN ist Teil makromolekularer Proteinkomplexe.** Die Tabelle zeigt die bisher bekannten direkten Bindungspartner von SMN oder Proteine, die als Komponenten des SMN-Komplexes isoliert wurden.

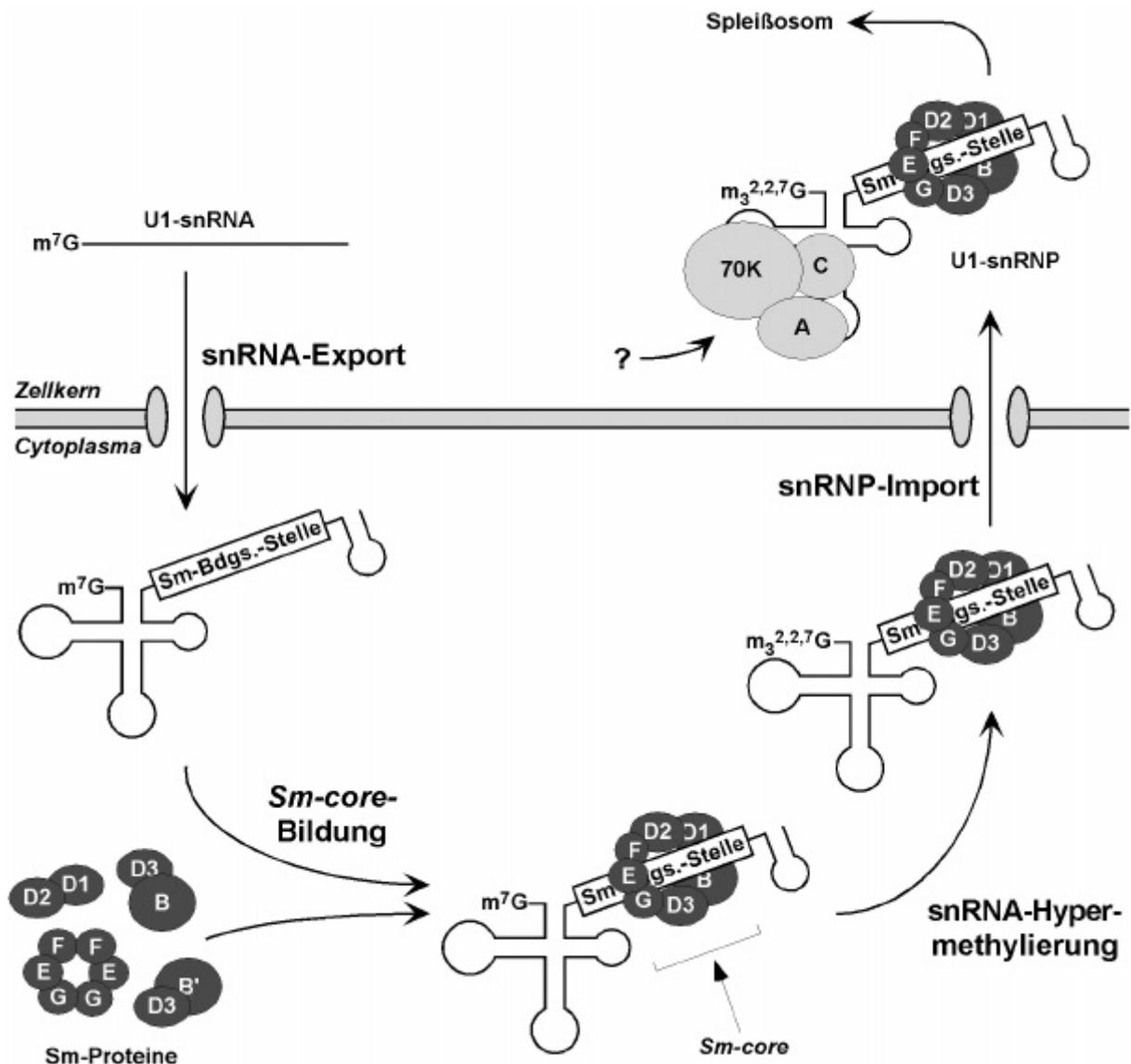
Neben SIP1, den spleißosomalen Sm-Proteinen und Gemin3 bis Gemin6, die als Komponenten von SMN-Komplexen identifiziert wurden, sind noch einige andere, mit SMN

interagierende Proteine beschrieben worden (siehe Tabelle 1-2). Gegenwärtig ist unklar, ob es sich dabei um weitere Komponenten von SMN-Komplexen handelt oder nur um transiente Interaktoren bei bestimmten metabolischen Prozessen wie der Transkription (Papillomavirus E2-Protein, RHA / RNA-Polymerase II) oder der RNA-Prozessierung (Fibrillarin, hnRNP-Q und -R). Insgesamt lässt die Vielzahl der Bindungspartner vermuten, dass SMN keine singuläre Funktion in der Zelle hat, sondern an mehreren, unterschiedlichen Prozessen im Cytoplasma und im Zellkern beteiligt ist.

### **1.3.3 SMN ist an der Biogenese der spleißosomalen snRNPs im Cytoplasma beteiligt**

Ein wesentlicher Schritt bei der Expression genetischer Information ist die Prozessierung der bei der Transkription synthetisierten prä-mRNA zu reifer mRNA im Zellkern. Eine zentrale Stellung nimmt dabei das sogenannte Spleißen ein: In den meisten Fällen besteht die prä-mRNA aus Protein-codierenden Abschnitten, Exons, und nicht-codierenden Abschnitten, den Introns. Beim Spleißen werden jeweils in zwei aufeinander folgenden Transesterifizierungsreaktionen die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die übrig bleibenden Exons miteinander ligiert. Dieser Prozess wird vom Spleißosom, einem mehrere Megadalton großen, dynamischen Komplex aus RNA und etwa 100 Proteinen, katalysiert (zusammengefasst in Krämer, 1996; Burge *et al.*, 1999).

Hauptbestandteile des Spleißosoms sind vier verschiedene RNA-Protein-Partikel, die snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), die nach ihrem RNA-Anteil als U1-, U2-, U5- und U4/U6-snRNP bezeichnet werden. Neben der jeweiligen snRNA („small nuclear RNA“) enthält jedes snRNP einen Satz von sieben gemeinsamen Proteinen: die Sm-Proteine SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF und SmG. Sie sind benannt nach ihrer Reaktivität mit Autoantikörpern des Sm-Serotyps von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses. Alle snRNAs haben ausgeprägte Sekundärstrukturen und tragen (mit Ausnahme der U6-snRNA) einen etwa 10 Nucleotide langen, einzelsträngigen und Uridyl-reichen Abschnitt, der als Bindungsstelle für die Sm-Proteine dient. Aus elektronenmikroskopischen und biochemischen Untersuchungen weiß man, dass die Sm-Proteine als heptamerer Ring an die snRNAs gebunden sind (Kastner *et al.*, 1990; Raker *et al.*, 1996; Kambach *et al.*, 1999; Stark *et al.*, 2001). Zusammen mit der snRNA bilden sie den sogenannten *Sm-core* aus, das strukturelle Grundgerüst, das allen spleißosomalen snRNPs gemeinsam ist (siehe Abbildung 1-4). Darüberhinaus werden in jedem der vier snRNPs jeweils noch mehrere, partikelspezifische Proteine gefunden (Will und Lührmann, 2001).



**Abbildung 1-4: Die Biogenese von snRNPs verläuft in mehreren Schritten.** Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der snRNP-Biogenese am Beispiel des U1-snRNPs. Die im Zellkern transkribierte snRNA wird mit einem einfach methylierten Guanosinrest am 5'-Ende ( $m^7G$ ) zunächst ins Cytoplasma transportiert. Hier binden die Sm-Proteine als heptamerer Ring an die Sm-Bindungsstelle und bilden so die *Sm-core*-Struktur aus, die bei allen spleißosomalen snRNPs gefunden wird. Anschließend erfolgt eine Hypermethylierung der snRNA am 5'-Ende ( $m_3^{2,2,7}G$ ) und der Import des snRNP-Partikels in den Zellkern. Wann die partikelspezifischen Proteine gebunden werden, im Falle des U1-snRNPs das 70K-, das A- und das C-Protein, ist noch nicht bekannt. Die snRNPs und zahlreiche andere Faktoren lagern sich schließlich an prä-mRNA zum Spleißosom zusammen und katalysieren den Spleißprozess.

Untersuchungen in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* haben gezeigt, dass die Biogenese der spleißosomalen snRNPs in mehreren Schritten im Zellkern und im Cytoplasma erfolgt (siehe Abbildung 1-4; Will und Lührmann, 2001): Alle spleißosomalen snRNAs außer U6 werden von der RNA-Polymerase-II transkribiert und verlassen zunächst den Zellkern. Dabei tragen sie am 5'-Ende einen einfach methylierten Guanosinrest ( $m^7G$ -Kappe). Im Cytoplasma assoziieren sie mit den im Überschuss vorliegenden Sm-Proteinen und bilden die

*Sm-core*-Struktur aus (Zeller *et al.*, 1983). Dies ist die Voraussetzung für die anschließende Prozessierung und Modifikation der snRNA, einschließlich einer Hypermethylierung, die zur Bildung einer Trimethylguanosa-Kappe ( $m_3^{2,2,7}$ G-Kappe) am 5'-Ende führt (Mattaj, 1986; Yang *et al.*, 1992). Erst nach diesen cytoplasmatischen Modifikationen wird das snRNP in den Zellkern transportiert (Fischer und Lührmann, 1990; Hamm, 1990). Zur Zeit ist noch unklar, zu welchem Zeitpunkt während der Biogenese die Assoziation mit den partikelspezifischen Proteinen erfolgt.

Erste Hinweise auf eine Funktion von SMN bei der Biogenese der snRNPs ergaben sich aus dem Befund, dass SMN direkt an verschiedene Sm-Proteine bindet (Liu *et al.*, 1997). Interaktionen mit Sm-Proteinen sind inzwischen auch für mehrere andere Komponenten des SMN-Komplexes nachgewiesen worden (vgl. Kapitel 1.3.2). Durch Co-Immunpräzipitationen konnte außerdem gezeigt werden, dass der SMN-Komplex spezifisch mit verschiedenen snRNAs im Cytoplasma von *X. laevis* Oocyten assoziiert ist (Fischer *et al.*, 1997). Diese Interaktion ist transient, bevor das zusammengelagerte snRNP-Partikel in den Zellkern transportiert wird, dissoziieren SMN und SIP1 wieder ab. Bedeutende Auswirkungen auf die snRNP-Zusammenlagerung in Oocyten hat die Mikroinjektion von Antikörpern (Fischer *et al.*, 1997). So wird die snRNP-Biogenese durch anti-SIP1-Antikörper komplett inhibiert. Damit konnte mit SIP1 erstmals ein Faktor identifiziert werden, der direkt an der Zusammenlagerung von snRNPs im Cytoplasma beteiligt ist. Interessanterweise wurde die Bildung der *Sm-core*-Struktur durch einen SMN-spezifischen Antikörper stimuliert. Inzwischen konnte in einem zellfreien experimentellen System nachgewiesen werden, dass ein makromolekularer Komplex aus SMN, SIP1 und mindestens 14 weiteren Proteinen die Zusammenlagerung des U1-snRNPs aus der U1-snRNA und den Sm-Proteinen vermitteln kann (Meister *et al.*, 2001a).

#### **1.3.4 Die Funktion von SMN im Zellkern**

Während man die Funktion von SMN im Cytoplasma inzwischen gut versteht, ist die Aufgabe des Proteins im Zellkern noch weitgehend unklar. Es mehren sich aber die Hinweise, dass SMN auch hier für die Zusammenlagerung von RNA-Protein-Partikeln benötigt wird. So wird z. B. die U6-snRNA, im Gegensatz zu den anderen spleißosomalen snRNAs, von der RNA-Polymerase-III transkribiert und verlässt den Zellkern nicht. Sie besitzt keine Sm-Bindungsstelle und interagiert demzufolge nicht mit Sm-Proteinen. Stattdessen ist sie mit den Sm-homologen Lsm-Proteinen (für *Like Sm*) Lsm2 bis Lsm8 assoziiert, die eine ähnliche, heptamere Ringstruktur ausbilden (Achsel *et al.*, 1999). Für Lsm4 und Lsm6 konnte bereits

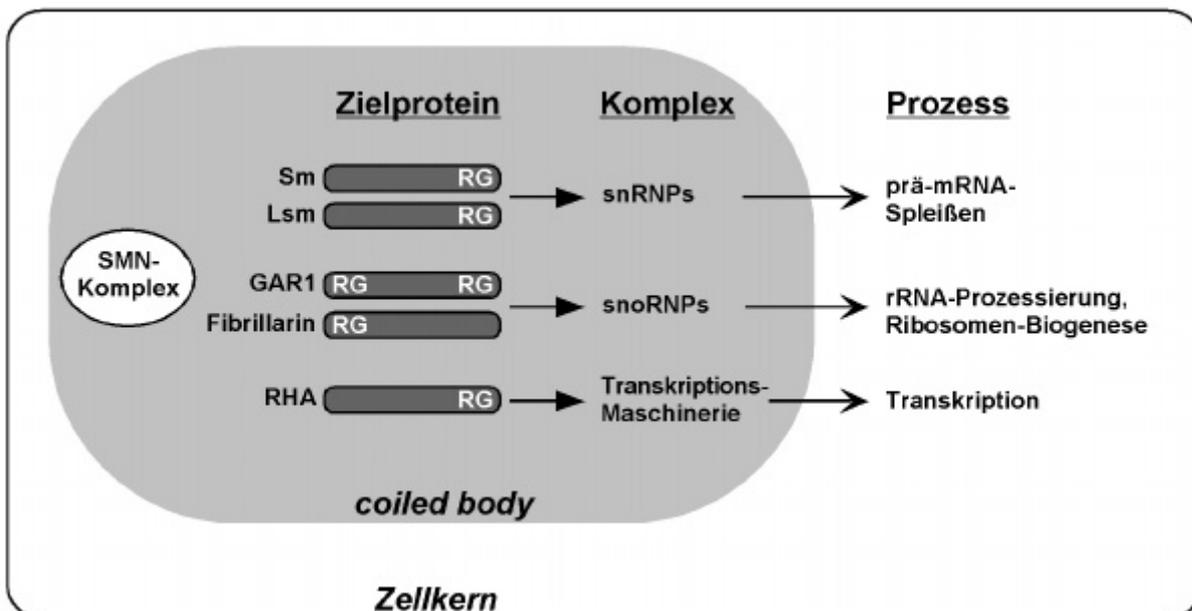
eine Interaktion mit SMN gezeigt werden, was vermuten lässt, dass SMN im Zellkern, ähnlich wie im Cytoplasma, an der Zusammenlagerung des U6-snRNPs beteiligt ist (Friesen und Dreyfuss, 2000).

Inzwischen spricht einiges dafür, dass das nukleäre SMN auch direkt in den Spleißprozess involviert ist. So konnte nachgewiesen werden, dass der SMN-Komplex auch im Zellkern mit Sm-Proteinen assoziiert ist (Meister *et al.*, 2000). Die Expression einer dominant-negativen Mutante von SMN (SMN $\Delta$ N27) führt in HeLa-Zellen zu einer deutlichen Umverteilung von snRNPs im Zellkern (Pellizzoni *et al.*, 1998). Außerdem kann mit dieser Mutante, wie auch mit SMN-spezifischen Antikörpern, das prä-mRNA-Spleißen *in vitro* inhibiert werden (Pellizzoni *et al.*, 1998; Meister *et al.*, 2000). Es wird diskutiert, dass SMN für die Regeneration der snRNPs nach einer Spleißreaktion, aber auch direkt beim Spleißprozess selbst benötigt wird. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass SMN mit hnRNP-Q und hnRNP-R interagiert, zwei im Zellkern gefundene RNA-Protein-Partikel, die mit dem Spleißprozess in Verbindung gebracht werden (Mourelatos *et al.*, 2001; Rossoll *et al.*, 2002). Untersuchungen in der Hefe haben eine Rolle von SMN beim Spleißen bestätigt. Während es in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kein SMN-homologes Protein gibt, konnte in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* das SMN-Homolog YAB8 identifiziert werden, ein für das Überleben der Zellen essentielles Gen (Talbot *et al.*, 1997; Hannus *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000). Ähnlich wie SMN interagiert das Genprodukt von YAB8 (Yap8p) mit Yip1p, einem SIP1-homologen Protein in der Hefe. Es wurde gezeigt, dass die Depletion von Yap8p in *S. pombe* zu einer Akkumulation von poly(A)-RNA im Zellkern und zu einer Inhibition des Spleißens führt (Hannus *et al.*, 2000).

Eine weitere Klasse von RNA-Protein-Partikeln im Zellkern sind die *small nucleolar ribonucleoproteins* (snoRNPs). Sie sind an der Prozessierung und Modifikation ribosomaler RNA während der Biogenese von Ribosomen in den Nucleoli beteiligt (Weinstein und Steitz, 1999; Kiss, 2001). Kürzlich wurde entdeckt, dass SMN *in vitro* und *in vivo* mit den snoRNP-Proteinen Fibrillarin und GAR1 interagiert (Jones *et al.*, 2001; Pellizzoni *et al.*, 2001a). Die Daten implizieren, dass der SMN-Komplex im Zellkern an der Zusammenlagerung der snRNP-ähnlichen snoRNPs beteiligt ist. Andere Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass SMN auch in die Zusammenlagerung der Transkriptionsmaschinerie im Zellkern involviert ist. So interagiert SMN mit der RNA-Helikase-A (RHA), einer Komponente des RNA-Polymerase-II-Komplexes (Pellizzoni *et al.*, 2001c). Co-Immunpräzipitationen deuten an, dass der SMN-Komplex auch *in vivo* mit dem RNA-Polymerase-II-Komplex assoziiert ist.

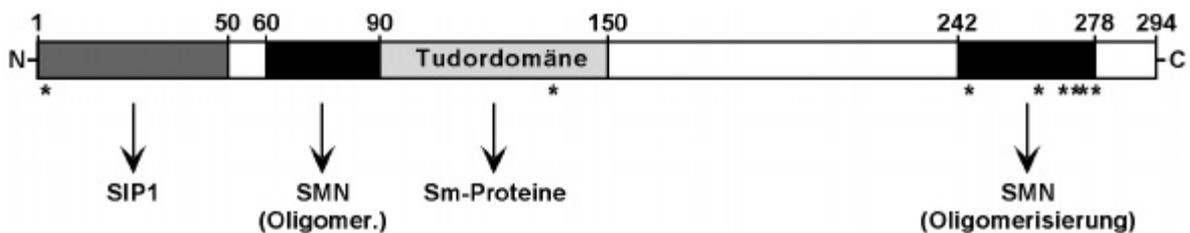
Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression einer dominant-negativen Mutante von SMN (SMN $\Delta$ N27) die Transkription durch die RNA-Polymerase-I und -II hemmt (Pellizzoni *et al.*, 2001c).

In begleitenden Untersuchungen der oben geschilderten Interaktionen wurde in einigen Fällen festgestellt, dass SMN an Arginin/Glycin-reiche Domänen seiner Interaktionspartner bindet (siehe Abbildung 1-5; Terns und Terns, 2001). Im Fall der spleißosomalen Sm- und Lsm-Proteine wird die Bindung durch eine symmetrische Dimethylierung der Arginin-Reste in solchen Domänen deutlich verstärkt (Brahms *et al.*, 2001; Friesen *et al.*, 2001; Meister *et al.*, 2001b). Lokalisationsstudien zeigen, dass SMN im Zellkern in *coiled bodies* konzentriert ist (vgl. Kapitel 1.3.1). Dabei colokalisiert es mit Coilin, dem Markerprotein dieser Struktur (Andrade *et al.*, 1991). Inzwischen wurde auch eine direkte Interaktion von SMN mit Coilin nachgewiesen. Die Untersuchungen legen nahe, dass Coilin für die Rekrutierung des SMN-Komplexes in *coiled bodies* verantwortlich ist (Hebert *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2001). Inzwischen deutet vieles darauf hin, dass *coiled bodies* die nukleären Substrukturen sind, in denen der SMN-Komplex, gleichsam als „*master assembler*“, die Zusammenlagerung der verschiedenen geschilderten Komplexe katalysiert (Terns und Terns, 2001, siehe Abbildung 1-5). Es bleibt daher spannend, die genauen Funktionen von SMN und den anderen Komponenten des SMN-Komplexes bei diesen Vorgängen aufzudecken.



**Abbildung 1-5: SMN ist an der Zusammenlagerung verschiedener Komplexe im Zellkern beteiligt.** SMN interagiert im Zellkern vermutlich mit verschiedenen Zielproteinen über Arg/Gly-reiche Domänen (RG). Die Zielproteine sind Komponenten verschiedener Komplexe, die an wichtigen zellulären Prozessen wie Spleißen, Ribosomen-Biogenese oder Transkription beteiligt sind. Man nimmt an, dass der SMN-Komplex in *coiled bodies* die Zusammenlagerung dieser Komplexe katalysiert (schematische Darstellung nach Terns und Terns, 2001).

Trotz des inzwischen fortgeschrittenen Verständnisses der Funktion von SMN ist es nach wie vor nicht klar, wieso es bei SMA-Patienten scheinbar selektiv zum Absterben spinaler Motoneuronen kommt, obwohl alle Körperzellen von der *SMN1*-Mutation, und damit der reduzierten Menge an funktionellem SMN-Protein, betroffen sind. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass es durch SMN-Mangel zu Störungen bei der Zusammenlagerung der beschriebenen makromolekularen Komplexe im Cytoplasma und im Zellkern kommt (Terns und Terns, 2001). Schon früh wurde diskutiert, ob der SMN-Mangel zu Defekten beim Spleißen führt, die das Absterben der sehr stoffwechselaktiven Motoneuronen zur Folge haben. Es konnte allerdings nicht erklärt werden, warum andere Nervenzellen mit einem hohem Spleißbedarf, aber auch andere Körperzellen wie z. B. Hepatocyten von einem solchen Spleißdefekt nicht betroffen sind (Mattaj, 1998; Matera, 1999; Jablonka *et al.*, 2000a). Ebenso ist bislang unklar, ob es neben den allgemeinen noch eine Motoneuron-spezifische Funktion von SMN gibt, die der Erkrankung zu Grunde liegen könnte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das Sm-Protein SmB/B' in Nervenzellen nur schwach exprimiert und stattdessen von einem Neuron-spezifischen Sm-Protein, SmN, ersetzt wird (McAllister *et al.*, 1988).



**Abbildung 1-6: Verschiedene Regionen in SMN vermitteln die Interaktionen mit anderen Proteinen.** Der Balken stellt schematisch die Primärstruktur des SMN-Proteins dar. Die Zahlen darüber geben Aminosäure-Positionen wieder. Verschiedene Regionen von SMN, die für Interaktionen mit sich selbst, mit SIP1 oder mit den Sm-Proteinen verantwortlich sind, sind hervorgehoben. Die Sternchen unter dem Balken zeigen die Positionen von Punktmutationen an, die in SMA-Patienten gefunden wurden (nach Wirth, 2000).

### 1.3.5 Die Domänenstruktur des SMN-Proteins

Das SMN-Protein besteht aus 294 Aminosäuren und kann mit sich selbst interagieren. Für diese Di- oder Oligomerisierung ist der C-terminale Abschnitt des Proteins, zwischen Aminosäure 242 und 278, verantwortlich (Lorson *et al.*, 1998; Pellizzoni *et al.*, 1999). Interessanterweise liegen in diesem Bereich viele der bisher gefundenen, SMA-verursachenden Punktmutationen (siehe Abbildung 1-6). Daneben deuten Bindungsexperimente darauf hin, dass eine weitere Region, zwischen Aminosäure 60 und 90, an der Selbstinteraktion von SMN beteiligt ist (Bühler, 2001). Im N-terminalen Abschnitt, zwischen

Aminosäure 1 und 50, liegt die für die Bindung an SIP1 verantwortliche Domäne von SMN (Liu *et al.*, 1997; Bühler, 2001). Eine Deletionsmutante von SMN, der die N-terminalen 27 Aminosäuren fehlen (SMN $\Delta$ N27) kann noch an SIP1 binden, zeigt aber einen dominant-negativen Phänotyp (siehe Kapitel 1.3.4; Pellizzoni *et al.*, 1998). Aus Sequenzvergleichen weiß man, dass SMN zwischen Aminosäure 90 und 150 eine Tudor-Domäne trägt (Ponting, 1997). Sie ist für die direkte Interaktion von SMN mit den Sm-Proteinen verantwortlich (Bühler *et al.*, 1999). Eine Aminosäure-Austauschmutation innerhalb dieser Domäne (SMN-E134K), die in einem SMA-Patienten gefunden wurde, führt dazu, dass das mutierte Protein diese Funktion nicht mehr ausüben kann. Über die inzwischen aufgedeckte Struktur der Tudor-Domäne wird im nächsten Kapitel berichtet.

## 1.4 Die Tudor-Domäne

Bei der Tudor-Domäne handelt es sich um eine evolutionär konservierte Proteindomäne mit bisher nicht genau bekannter Funktion. Sie ist benannt nach dem Tudor-Protein der Taufliege *Drosophila melanogaster*, das aus insgesamt 10 solcher Domänen besteht (Callebaut und Mornon, 1997; Ponting, 1997). Das codierende Gen, *tudor*, gehört zu den Entwicklungsgenen der posterioren Gruppe und ist an der Ausbildung der primordialen Keimzellen (Polzellen) während der frühen Embryonalentwicklung beteiligt (Golumbeski *et al.*, 1991; Bardsley *et al.*, 1993). Seine genaue Funktion ist dabei noch nicht bekannt, neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass das Tudor-Protein in den Transport mitochondrialer rRNA zum posterioren Pol des Embryos involviert ist (Amikura *et al.*, 2001). Ein weiteres *Drosophila*-Entwicklungsgen, *homeless*, codiert für ein Protein mit einer Tudor-Domäne, das zur DE-H-Familie RNA-abhängiger ATPasen und RNA-Helikasen gehört. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Lokalisation von RNA während der Oogenese. Mutationen im *homeless*-Gen führen zu einer Störung im Transport und in der Lokalisation spezifischer mRNAs bei der Oogenese, die mit Veränderungen in der Mikrotubuli-Organisation der Zellen einher gehen (Gillespie und Berg, 1995).

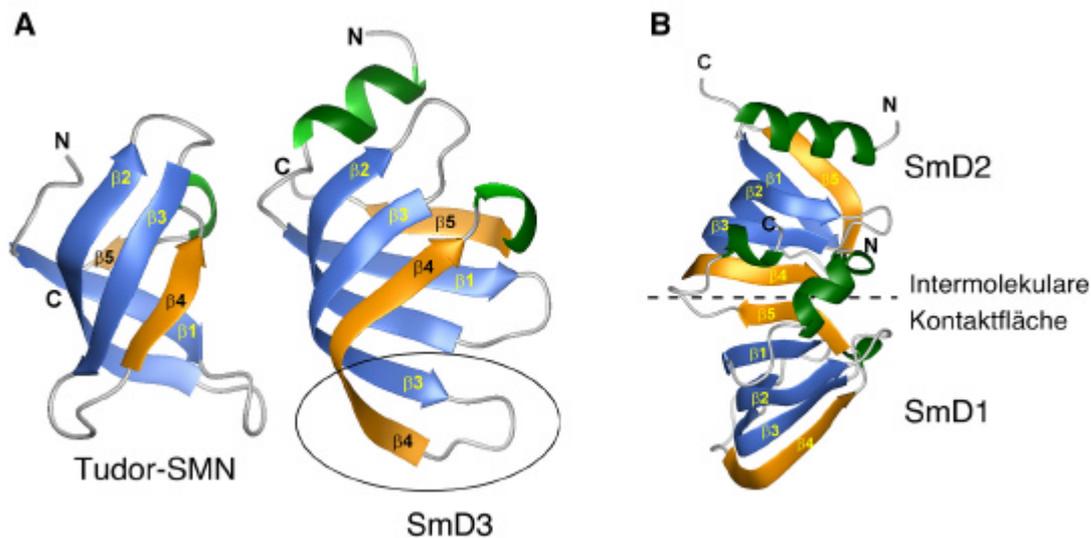
Auch im Menschen sind, neben SMN, inzwischen einige Proteine mit Tudor-Domäne gefunden worden, so z. B. das Kernprotein p100 (Callebaut und Mornon, 1997). P100 interagiert mit dem Virus-Protein EBNA-2 und dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIE und ist an der Aktivierung der Transkription durch das Epstein-Barr-Virus beteiligt (Tong *et al.*, 1995). Ein weiteres Beispiel ist das Protein AKAP149. Es gehört zur Familie der *A-kinase anchor proteins*, einer Klasse von Proteinen, die die zelluläre Lokalisation der cAMP-

abhängigen Proteinkinase PKA regulieren (Trendelenburg *et al.*, 1996). Inzwischen wurde gezeigt, dass AKAP149 auch an der Rekrutierung von Proteinphosphatase-1 an der Kernhülle beteiligt ist (Steen *et al.*, 2000). Interessanterweise findet man in AKAP149 neben der Tudor-Domäne auch ein konserviertes RNA-Bindungsmotiv, eine sogenannte KH-Domäne (Burd und Dreyfuss, 1994). Mit TDRKH wurde inzwischen ein weiteres humanes Protein beschrieben, das neben einer Tudor-Domäne auch KH-Domänen besitzt (Lamb *et al.*, 2000). Die Funktion von TDRKH ist noch unbekannt. Ebenfalls unbekannt ist die Funktion des Proteins Trap. Es trägt insgesamt fünf Tudor-Domänen und ist als Interaktor der neuron-spezifischen Kinase PCTAIRE-2 beschrieben worden (Hirose *et al.*, 2000).

Tudor-Domänen lassen sich nicht nur in humanen und *Drosophila*-Proteinen finden. Durch Sequenzvergleiche konnten solche Proteine auch im Nematoden *Caenorhabditis elegans* gefunden werden, darunter ein p100-Homolog (Ponting, 1997). Ein weiteres p100-Homolog mit Tudor-Domäne wurde in *Histoplasma capsulatum* entdeckt, einem zu den Deuteromyceten gehörenden Pilz (Porta *et al.*, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und der Spaltheife *S. pombe* Proteine mit Tudor-Domänen identifiziert werden können (vgl. Kapitel 4.1.1.2, Seite 62). Das Vorkommen in weit verwandten Species deutet darauf hin, dass die Tudor-Domäne entwicklungs-geschichtlich alt ist. Erstaunlicherweise trägt Yab8p, das oben beschriebenen SMN-Homolog in *S. pombe*, keine Tudor-Domäne (Talbot *et al.*, 1997; Hannus *et al.*, 2000). Ebenso gibt die Analyse des Genoms von *S. cerevisiae* keine Hinweise auf die Existenz von Tudor-Domänen in der Bäckerhefe.

Der Vergleich der verschiedenen Tudor-Domänen-Proteine zeigt, soweit deren Funktionen überhaupt bekannt sind, dass sie in ganz unterschiedliche Stoffwechselwege involviert sind. Offenbar scheinen aber viele der Proteine direkt an RNA zu binden oder zumindest, wie auch SMN, in den Transport oder Metabolismus von RNAs verwickelt zu sein. Man vermutet, dass die Tudor-Domänen hierbei Plattformen für Protein-Protein-Interaktionen darstellen (Ponting, 1997; Selenko *et al.*, 2001). Für die Tudor-Domäne von SMN war biochemisch gezeigt worden, dass sie die Interaktion des Proteins mit Sm-Proteinen vermittelt (Bühler *et al.*, 1999). Durch die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur konnte diese Funktion eindrucksvoll bestätigt werden. Die NMR-Strukturanalyse der Tudor-Domäne von SMN zeigt eine fassförmige  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus fünf anti-parallelen Strängen (Selenko *et al.*, 2001). Erstaunlicherweise hat sie dabei eine große Ähnlichkeit mit der Grundstruktur der Sm-Proteine, dem sogenannten *Sm-fold* (siehe Abbildung 1-7). An der Oberfläche der Tudor-

Domäne wurden außerdem mehrere konservierte, negativ geladene Aminosäurereste identifiziert, die die Interaktion mit den Arginin/Glycin-reichen Regionen von Sm-Proteinen vermitteln. Die Sm-bindungsdefekte Austauschmutation SMN-E134K verändert nicht die Struktur der Domäne, wohl aber die Ladungsverteilung an der für die Sm-Bindung verantwortlichen Oberfläche (Selenko *et al.*, 2001). In der Untersuchung wurde für SMN zum ersten Mal die dreidimensionale Struktur einer Tudor-Domäne aufgeklärt. Die Daten sprechen dafür, dass auch die Tudor-Domänen in anderen Proteinen an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind.



**Abbildung 1-7: Die Tudor-Domäne von SMN gleicht strukturell einem verkürzten „Sm-fold“ von Sm-Proteinen.** A: Vergleich der dreidimensionalen Struktur der Tudor-Domäne von SMN (links) mit dem Sm-Protein D3 (rechts). Die Bändermodelle zeigen, dass beide Proteine eine ähnliche Struktur aus fünf stark gebogenen, anti-parallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strängen aufweisen. Der Kreis zeigt die im Vergleich mit Tudor-SMN bei SmD3 verlängerten  $\beta 3$ - und  $\beta 4$ -Stränge. B: Kristallstruktur des SmD1-SmD2-Heterodimers. Die  $\beta$ -Stränge, die die Proteinbindung an der intermolekularen Kontaktfläche vermitteln, sind orange hervorgehoben. In der heptameren Sm-core-Struktur interagiert SmD2 über den  $\beta 5$ - und SmD1 über den  $\beta 4$ -Strang (ebenfalls orange) in analoger Weise mit benachbarten Sm-Proteinen. (Die Abbildungen wurden übernommen aus Selenko *et al.*, 2001)

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

SMN trägt eine Tudor-Domäne, die, wie im letzten Kapitel dargestellt ist, erst vor kurzem als konservierte Proteindomäne beschrieben wurde. Die Funktionen der bisher entdeckten Proteine mit einer solchen Domäne sind noch weitgehend unbekannt. Da man wusste, dass ein Mangel an SMN für die Entstehung der spinalen Muskelatrophie verantwortlich ist, bestand ein großes Interesse daran, die genaue Funktion dieses Proteins in der Zelle zu verstehen. Die Analyse zeigte dann, dass es sich bei SMN um ein Protein mit einer neuartigen Funktion handelt. Im Cytoplasma wird es für die Zusammenlagerung von snRNPs aus Sm-Proteinen

und snRNA benötigt. Seine genaue Funktion im Zellkern ist weniger gut verstanden, dennoch deuten auch hier die Daten auf eine Rolle des Proteins bei der Zusammenlagerung makromolekularer Komplexe aus RNA und Proteinen hin. Dadurch wurde deutlich, dass sich solche RNA-Protein-Partikel in der Zelle offenbar nicht spontan, also durch *self assembly* ausbilden, sondern dazu spezifische Zusammenlagerungsfaktoren benötigen. Mit SMN wurde zum ersten Mal ein Protein mit einer solchen Funktion beschrieben. Es bestand Grund zu der Annahme, dass es im Menschen weitere Faktoren mit vergleichbarer Funktion gibt.

In diesem Zusammenhang stand am Anfang dieser Arbeit die Suche nach verwandten Proteinen von SMN im Menschen. Es wurde dabei angenommen, dass über strukturelle Gemeinsamkeiten mit SMN Proteine mit möglicherweise ähnlicher Funktion gefunden werden können. Bei der Suche nach SMN-homologen Sequenzen in Datenbanken wurden so Fragmente von zwei bisher unbekanntem Genen entdeckt. Beide codierten jeweils für ein Protein mit einer Tudor-Domäne und waren vor allem über diesen Abschnitt mit SMN verwandt. Das Ziel dieser Arbeit bestand nun darin, diese beiden neuen Gene zu klonieren und über verschiedene experimentelle Strategien zu charakterisieren. Der erste Teil befasst sich mit der Erforschung von SMNrp, dem Produkt des einen der beiden Gene, der zweite Teil mit TUBA, dem anderen, neuentdeckten Protein. Zunächst sollten Northernblot-Analysen Aufschluss über die Expression der beiden Gene in verschiedenen Geweben geben, durch Immunlokalisationen wurde die intrazelluläre Verteilung von SMNrp und TUBA untersucht.

Für SMN waren bereits einige Interaktionspartner bekannt und konnten Hinweise auf die Funktion des Proteins geben. Ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Suche nach Bindungspartnern von SMNrp und TUBA durch hefe-genetische und immunbiochemische Verfahren. Dabei wurde herausgefunden, dass SMNrp mit der Histon-Acetyltransferase GCN5-S interagiert, was auf eine Funktion des Proteins bei der Aktivierung der Transkription hindeutete. Durch Histon-Acetylierungsexperimente wurde daher die Bedeutung dieser Interaktion näher untersucht. Außerdem wurde nachgewiesen, dass SMNrp in der Zelle mit spleißosomalen snRNPs assoziiert ist. Daher wurde versucht, durch *in-vitro*-Spleißexperimente eine mögliche Beteiligung des Proteins am Spleißprozess aufzudecken.

In TUBA wurde, neben der Tudor-Domäne, auch eine „Ubiquitin-assoziierte Domäne“ gefunden, für die eine Funktion als Ubiquitin-Bindungsdomäne diskutiert wird. Durch Bindungsstudien sollten diese Hypothese erhärtet und die Spezifität einer möglichen Ubiquitin-Interaktion näher eingegrenzt werden. Durch Immunpräzipitationen konnte für

TUBA außerdem eine Assoziation mit DNA-Topoisomerase-III-beta gezeigt werden. Daher wurde der Einfluss von TUBA auf die Aktivität des Enzyms näher untersucht. Schließlich wurde herausgefunden, dass TUBA mit dem *Fragile-X Mental Retardation Protein* interagiert, was vermuten ließ, dass das Protein eine Rolle bei der Entstehung des Fragilen-X-Syndroms spielen könnte. Verschiedenen Studien sollten daher die Bedeutung dieser Interaktion näher beleuchten.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Immunlokalisationsstudien wurden an einem Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2“ und einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop „LSM410“ (beide Fa. Carl Zeiss) durchgeführt. Für Mikroinjektionsexperimente in *X. laevis* Oocyten wurde ein Kapillarzyehgerät „P97“ (Fa. Sutter Instruments) und eine Mikroinjektionsapparatur „PLI100“ (Fa. Medical Systems) verwendet. Gradienten für die Ultrazentrifugation wurden mit dem Gradientenmischer der Fa. Biocomp hergestellt. Alle weiteren, zur Standardausstattung eines molekular- und zellbiologischen Labors gehörenden Geräte sind nicht im einzelnen aufgeführt.

### 2.2 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Analyse-Qualität von den Firmen Biorad, Roche, Fluka, Gibco BRL, Merck, Roth und Sigma bezogen. Radiochemikalien stammten von der Firma Amersham-Pharmacia, Enzyme und Nucleotide von den Firmen MBI, New England Biolabs, und Promega. Oligonucleotide wurden bei der Firma Metabion synthetisiert.

### 2.3 Puffer und Kulturmedien

#### Häufig verwendete Puffer:

**IP-Puffer:** 150 mM KCl  
 25 mM HEPES-KOH (pH 7,9)  
 20 mM NaF  
 2 mM EDTA  
 0,5 mM DTT  
 0,5 % Igepal (v/v)

**PBS:** 137 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 7,4

**P150:** 150 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,02 % Igepal (v/v)

**P300:** 300 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,02 % Igepal (v/v)

**P500:** 500 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,02 % Igepal (v/v)

**P750:** 750 mM NaCl  
 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,02 % Igepal (v/v)

**4´ Probenpuffer für SDS-PAGE:** 400 mM Tris-HCl pH 8,8  
50 mM DTE  
5 mM EDTA  
50 % Glycerin (v/v)  
1 % SDS (w/v)  
0,01 % Bromphenolblau (w/v)

**Medium zur Kultivierung von *E. coli*:**

**2YT:** 16 g/l Bacto-Trypton (Fa. Difco)  
10 g/l Bacto-Yeast-Extrakt (Fa. Difco)  
5 g/l NaCl  
pH 7,4

**Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*:**

Die verschiedenen Stämme der Bäckerhefe werden entweder in YPD-Vollmedium oder, zur Selektion auf Auxotrophiemarker, in synthetischem Medium (SDC) kultiviert:

**YPD:** 10 g/l Bakto-Yeast-Extract (Fa. Difco)  
20 g/l Bacto-Pepton (Fa. Difco)  
20 g/l Dextrose

**SDC:** 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)  
20 g/l Dextrose  
20 mg/l Adenin  
20 mg/l Histidin  
20 mg/l Methionin  
20 mg/l Tryptophan  
20 mg/l Uracil  
30 mg/l Lysin  
30 mg/l Tyrosin  
50 mg/l Phenylalanin  
60 mg/l Leucin  
200 mg/l Threonin

Durch Weglassen einzelner Aminosäuren oder Nucleotidbasen im SDC-Medium kann auf die Fähigkeit zur selbständigen Biosynthese selektioniert werden. Synthetische Medien werden durch Filtration sterilisiert.

Für Plattenmedien werden zur Verfestigung 20g/l Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

## 2.4 Genbanken

Im *Two-Hybrid-Screen* nach SMNr<sub>p</sub>-Interaktionspartnern wurde eine humane, aus Gehirngewebe stammende, in den Vektor pACT2 konstruierte cDNA-Bank („Matchmaker“-System, Fa. Clontech) verwendet. Für den *Two-Hybrid-Screen* nach TUBA-Interaktionspartnern wurde ebenfalls eine in pACT2 konstruierte humane Gehirn-cDNA-Bank verwendet, die in den *S. cerevisiae*-Stamm Y187 vortransformiert war („Pretransformed Matchmaker Library“-System, Fa. Clontech). Die PCR-Amplifikation verschiedener cDNAs zur Klonierung erfolgte mit „Marathon human brain cDNA“ (Fa. Clontech) als Matrizen-DNA.

## 2.5 Plasmide

Tabelle 2-1 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Vektoren zusammen, Tabelle 2-2 listet die verwendeten cDNA-Konstrukte auf.

*Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Plasmid-Vektoren.*

Vektor	Hersteller / Referenz	Organismus	Eigenschaften
pACT2	Fa. Clontech	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>prey</i> -Vektor für <i>Two-Hybrid-Screen</i> , <i>LEU2</i> -Auxotrophiemarker
pAS2-1	Fa. Clontech	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>bait</i> -Vektor für <i>Two-Hybrid-Screen</i> , <i>TRP1</i> -Auxotrophiemarker
pEGFP-C1	Fa. Clontech	<i>E. coli</i> , Mammalia	eukaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem EGFP- <i>tag</i>
pET21a	Fa. Novagen	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N- und C-terminalem His- <i>tag</i>
pET21a-zz	(Bühler <i>et al.</i> , 1999)	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem ZZ- <i>tag</i> und C- terminalem His- <i>tag</i>
pET28a	Fa. Novagen	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit C-terminalem His- <i>tag</i>
pGBKT7	Fa. Clontech	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>bait</i> -Vektor für <i>Two-Hybrid-Screen</i> , <i>TRP1</i> -Auxotrophiemarker
pGEX-5X-1	Fa. Amersham-Pharmacia	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem GST- <i>tag</i>
pGEX-6X-1	Fa. Amersham-Pharmacia	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem GST- <i>tag</i>
pHA	eigene Klonierung	<i>E. coli</i> , Mammalia	eukaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem HA- <i>tag</i>
p3Myc	A. Pause	<i>E. coli</i> , Mammalia	eukaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem c-Myc- <i>tag</i>

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten cDNA-Konstrukte.

Protein (cDNA)	Aminosäuren	Plasmid	Konstrukt
FMRP	1-632	pHA	pHA-FMRP
		pET21a-zz	pZZ-FMRP
	1-215	pET21a	p21-FMRP1-215
	1-227	pET21a	p21-FMRP1-227
	1-332	pET21a	p21-FMRP1-332
	1-430	pET21a	p21-FMRP1-430
	1-486	pET21a	p21-FMRP1-486
	216-430	pET21a	p21-FMRP216-430
	216-632	pET21a	p21-FMRP216-632
	332-632	pET21a	p21-FMRP332-632
	430-632	pET21a	p21-FMRP430-632
486-632	pET21a	p21-FMRP486-632	
430-486	pET21a	p21-FMRP430-486	
FMRP-I304N	1-632	pET21a-zz	pZZ-FMRP-I304N
		pET21a	p21-FMRP-I304N
FXR1	1-621	pHA	pHA-FXR1
		pET21a-zz	pZZ-FXR1
FXR2	1-673	pHA	pHA-FXR2
		pET21a-zz	pZZ-FXR2
GCN5-L	1-837	pET28a	p28-GCN5-L
GCN5-S	1-476	pET28a	p28-GCN5-S
		pET21a-zz	pZZ-GCN5-S
SMN	1-294	pHA	pHA-SMN
SMNrp	1-238	p28a	p28-SMNrp
		pGEX-5X-1	pGEX-SMNrp
		pET21a-zz	pZZ-SMNrp
		pAS2-1	pAS2-SMNrp
	1-134	pET28a	p28-SMNrp $\Delta$ C
		pET21a-zz	pZZ-SMNrp $\Delta$ C
	70-238	pET28a	p28-SMNrp $\Delta$ N
		pET21a-zz	pZZ-SMNrp $\Delta$ N
TOP3 $\beta$	1-862	pHA	pHA-TOP3 $\beta$
		pGEX-5X-1	pGEX-TOP3 $\beta$
		pEGFP-C1	pEGFP-TOP3 $\beta$
TUBA	1-744	pET28a	p28-TUBA
		pGEX-5X-1	pGEX-TUBA
		pET21a-zz	pZZ-TUBA
		p3Myc	p3Myc-TUBA
		pEGFP-C1	pEGFP-TUBA
		pHA	pHA-TUBA
		pGBKT7	pGBKT7-TUBA
	1-561	pHA	pHA-TUBA1-561
	1-375	pHA	pHA-TUBA1-375
	186-744	pHA	pHA-TUBA186-744
	374-744	pHA	pHA-TUBA374-744
	558-744	pHA	pHA-TUBA558-744
	558-744 $\Delta$ 647-702	pHA	pHA-TUBA558-744 $\Delta$ Tu
	558-723	pHA	pHA-TUBA558-723
	558-703	pHA	pHA-TUBA558-703
	647-744	pHA	pHA-TUBA647-744
	1-744 $\Delta$ 286-324	pGEX-6X-1	pGEX-TUBA $\Delta$ UBA
286-325	pGEX-6X-1	pGEX-UBA	

## 2.6 Antikörper

Die folgende Tabelle gibt die verwendeten Antikörper und -seren wieder. Sekundäre Antikörper für Westernblot waren mit Peroxidase, solche für Immunfluoreszenzmikroskopie mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugiert.

*Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Antikörper und -seren.*

Name (Klon)	Antigen	Herkunft, Typ	Hersteller / Referenz	Zustand
<b>primäre Antikörper:</b>				
anti-c-Myc (9E10)	Peptid von c-Myc	Maus, monoklonal	Fa. Sigma	Aszites-Flüssigkeit
anti-FMRP(36.1)	FMRP	Maus, monoklonal	E. Keidel (MPI für Biochemie, Martinsried)	affinitätsgereinigte Aszites-Flüssigkeit
anti-HA (12CA5)	Peptid von X47-Hämagglutinin1	Maus, monoklonal	Fa. Roche	Aszites-Flüssigkeit
anti-Hsp47 (M16.10A1)	Hsp47 (Colligin)	Maus, monoklonal	Fa. StressGen	affinitätsgereinigt
anti-SMN (7B10)	SMN	Maus, monoklonal	(Meister <i>et al.</i> , 2000)	affinitätsgereinigt
anti-SMNrp	His-SMNrp	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit (s. Kapitel 4.1.2.2)	affinitätsgereinigt
anti-TUBA	His-TUBA	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit (s. Kapitel 4.2.2.1)	affinitätsgereinigt
<b>sekundäre Antikörper:</b>				
anti-mouse IgG FITC conjugate	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-mouse IgG TRITC conjugate	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-mouse IgG peroxidase conjugate	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt
anti-rabbit IgG FITC conjugate	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-rabbit IgG TRITC conjugate	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-rabbit IgG peroxidase conjugate	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt

## 2.7 Organismen

### Bakterien:

Für Klonierungen und zur prokaryontischen Proteinexpression wurden die *Escherichia coli* Stämme DH5 $\alpha$  (Fa. Gibco BRL) und BL-21(DE3) (Fa. Stratagen) verwendet.

Genotypen:

DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>,  $\lambda^-$ , hsdR17, deoR, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96,  
 $\Delta(\text{argF-lacZYA})169$ ,  $\Phi 80d(\text{lacZ}\Delta M15)$

BL21(DE3): F<sup>-</sup>, dcm, ompT, hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>), gal, (DE3)

### Hefen:

Im *Two-Hybrid-Screen* wurden die von der Firma Clontech bezogenen *Saccharomyces cerevisiae* Stämme GC1945, Y187 und PJ69-2A eingesetzt.

Genotypen:

GC1945: MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4D*, *met<sup>-</sup>*, *gal80D*,  
*cyh<sup>r</sup>2*, *LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *URA3::GAL417<sub>mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-LacZ*

Y187: MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4D*, *met<sup>-</sup>*, *gal80D*,  
*cyh<sup>r</sup>2*, *URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-LacZ*

PJ69-2A: MAT $\alpha$ , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4D*, *gal80D*,  
*LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*

### Zell-Linien:

Zur transienten Transfektion, Extrakterstellung, und für Lokalisationsstudien fanden die Zell-Linien COS-1 (SV40-transformierte Fibroblasten der Grünen Meerkatze *Cercopithecus aethiops*), HeLa (humane Zervixkarzinom-Zellen), 293 (humane, embryonale, Ad5-transformierte Nierenzellen) und 3T3 (immortale Maus-Fibroblasten) Verwendung. Bei allen handelt es sich um adhärent wachsende Säugerzellen.

### Tiere:

Spleißexperimente wurden u. a. in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt. Die Herstellung von Antiseren erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*).

## **3 Methoden**

### **3.1 Molekular- und zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Standardmethoden der Molekularbiologie**

Standardmethoden der Molekularbiologie wie die Extraktion, Präzipitation und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, die *in-vitro*-Rekombination und Klonierung von DNA-Fragmenten, oder Agarose- und Polyacrylamidgel-Elektrophoresen werden nach den Versuchsvorschriften in Sambrook *et al.* (1989) oder nach den Herstellerangaben der verwendeten Enzyme durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der nicht näher beschriebenen Puffer und Lösungen. Die Transformation von *E. coli* erfolgt nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode. Plasmid-DNA wird mit dem „Mini -“ oder „Maxi Plasmid Purification Kit“ (Fa. Qiagen) aus den Bakterien isoliert. Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Fa. Qiagen) verwendet. Alle DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit werden von der Abteilung Oesterhelt, Max-Planck-Institut (MPI) für Biochemie in Martinsried, durchgeführt.

#### **3.1.2 Klonierung von cDNA-Fragmenten**

Wenn nicht anders angegeben werden alle in dieser Arbeit verwendeten cDNAs durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach den Protokollen in Innis und Gelfand (1990) amplifiziert. Als Matrize (*template*) hierfür dienen die in Kapitel 2.4 genannten Genbanken oder bereits klonierte cDNAs. Als Primer werden im einzelnen nicht aufgeführte, spezifische Oligonucleotide verwendet, über die an den 5'-und 3'-Enden der cDNAs geeignete Restriktionsschnittstellen für die Ligation in Plasmidvektoren eingeführt werden. Für alle PCR-Reaktionen wird der „HiFi“ Polymerase-Mix der Fa. Roche verwendet. 5'- und 3'-RACE-PCRs werden mit dem „Marathon RACE Kit“ (Fa. Clontech) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Tabelle 2-2 (Seite 34) listet alle so klonierten Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, auf.

#### **3.1.3 Northernblot-Hybridisierung**

Für die Expressionsanalyse von SMNrp und TUBA wird eine Northernblot-Membran verwendet, auf der je 2 µg poly(A)-RNA aufgetragen sind, die aus acht verschiedenen menschlichen Geweben isoliert wurden („Multiple Tissue Northern Blot“, Fa. Clontech). Die cDNAs von SMNrp und TUBA werden nach der „Random Priming“-Methode durch Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP über eine Klenow-Reaktion radioaktiv markiert. Dazu wird das

„Megaprime DNA labeling system“ (Fa. Amersham-Pharmacia) verwendet. Eine typischer Reaktionsansatz enthält:

50 ng	cDNA (hitzenaturiert)
10 µl	Labeling-Puffer ( <i>Megaprime-System</i> , Fa. Amersham)
5 µl	Primer-Lösung ( <i>Megaprime-System</i> )
2 µl	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP (3000 Ci/mol, 10 mCi/ml)
2 µl	Klenow-Enzym (1u/µl, <i>Megaprime-System</i> )
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden nichteingebaute Nucleotide durch Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Von der Probe wird ein Aliquot von 1 µl entnommen und die spezifische Aktivität durch Messung der Cherenkov-Strahlung mit einem Szintillationsmessgerät bestimmt. Vor der Verwendung zur Hybridisierung wird die Probe 2 min bei 95 °C denaturiert.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wird die Northernblot-Membran in einer Glasröhre zunächst für 3 h bei 42 °C in 10 ml Prähybridisierungslösung (s. u.) in einem Rollinkubator inkubiert. Danach wird die denaturierte DNA-Sonde zugegeben und der Ansatz bei 42 °C über Nacht weiterinkubiert. Zum Abwaschen unspezifisch gebundener Probe wird die Membran nacheinander für je 30 min in folgenden Lösungen und bei folgenden Temperaturen inkubiert:

- 1) 2× SSC (s. u.) mit 0,1 % (w/v) SDS bei 42 °C
- 2) 1× SSC mit 0,1 % SDS bei 42 °C
- 3) 1× SSC mit 0,1 % SDS bei 50 °C
- 4) 0,5× SSC mit 0,1 % SDS bei 50 °C
- 5) 0,5× SSC mit 0,1 % SDS bei 60 °C
- 6) 0,2× SSC mit 0,1 % SDS bei 60 °C
- 7) 0,1× SSC mit 0,1 % SDS bei 60 °C

Die Waschbedingungen richten sich jeweils nach der Restaktivität der Membran nach einem Waschschrift. Zum Schluss wird die Membran in Kunststoff-Folie eingeschweißt und autoradiographiert. Eine hybridisierte Probe kann wieder entfernt werden, indem die Membran mit kochendem H<sub>2</sub>O mit 0,1 % (w/v) SDS überschüttet und dann für 15 min auf einem Schüttler geschwenkt wird.

**Prähybridisierungslösung:**

900 mM	NaCl
50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 mM	EDTA (pH 7,7)
50 %	deionisiertes Formamid (v/v)
0,1 %	Natriumdodecylsulfat (SDS, w/v)
0,04 %	Ficoll 400 (w/v)
0,04 %	Polyvinylpyrrolidon (w/v)
0,04 %	bovines Serumalbumin (BSA, w/v)
100 µg/ml	Heringssperma-DNA (denaturiert und geschert)

**20´ SSC:**

3 M	NaCl
300 mM	Trinatriumcitrat
pH 7,0	

**3.1.4 Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen**

Säugerzellen werden bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit auf Kunststoff-Gewebekulturschalen kultiviert. Als Kulturmedium (Vollmedium) wird *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Fa. Gibco BRL) mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS, Fa. Gibco BRL), 2 mM L-Alanyl-L-glutamin (Gibco BRL) und 0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Sigma) verwendet. Vor dem Erreichen 100-prozentiger Konfluenz werden die Zellen passagiert. Dazu werden sie nach Entfernen des Mediums mit PBS (37 °C) gewaschen, dann mit 1 % Trypsin in PBS von der Kulturschale abgelöst. Es wird frisches Vollmedium zugegeben und die Zellen in geeigneter Verdünnung (1:2 bis 1:10) auf neuen Kulturschalen ausgesät. Alle Zellkulturarbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen.

Zur transienten Transfektion der Zellen mit Plasmid-Konstrukten werden pro 10cm-Kulturschale 9 µg DNA in 210 µl H<sub>2</sub>O gelöst, mit 90 µl Lipofectamin (Fa. Gibco BRL) vermischt und zur Komplexbildung 20 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In der Zwischenzeit werden die Zellen mit DMEM ohne FCS und Antibiotika (DMEM<sup>-</sup>) gewaschen, dann wird die Lipofectamin-DNA-Mischung in 10 ml DMEM<sup>-</sup> aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Nach 8-stündiger Inkubation unter Kulturbedingungen werden die Zellen mit PBS gewaschen, dann mit Vollmedium weiterkultiviert. Die Zellen haben zur Transfektion idealerweise eine etwa 40- bis 60-prozentige Konfluenz.

### 3.1.5 *Two-Hybrid-Screen*

#### 3.1.5.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

Alle verwendeten Hefe-Stämme werden für optimales Wachstum bei 30 °C kultiviert. Suspensionskulturen werden dabei mit 150 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Wildtypzellen werden in YPD-Vollmedium (siehe Kapitel 2.3) kultiviert. Nach der Transformation von Hefezellen mit Plasmiden, die einen Auxotrophiemarker tragen, wird auf diesen Marker selektioniert, indem die Zellen in synthetischem SDC-Medium (Kapitel 2.3) kultiviert werden, bei dem je nach Marker die jeweilige Aminosäure oder Nucleotidbase weggelassen wird.

#### 3.1.5.2 Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode

Hefezellen werden nach der Lithiumacetat-Methode nach (Gietz und Woods, 1994) mit Plasmid-DNA transformiert. Dazu werden 50 ml Medium mit einer einzelnen Hefe-Kolonie angeimpft und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,7 bis 1,0 kultiviert. Durch Zentrifugation bei 3000 rpm werden die Zellen geerntet und mit 25 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 10 ml LiT-Puffer (100 mM LiAc in 10 mM Tris-HCl pH 7,4) mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) resuspendiert, 40 min auf einem Drehrad inkubiert, erneut geerntet und zuletzt in 1 ml LiT mit 10 mM DTT aufgeschwämmt. 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension werden nacheinander mit 5  $\mu$ l Heringssperma-DNA (Fa. Sigma, 10 mg/ml in TE-Puffer, bei 96 °C denaturiert und durch Pipettieren geschert), 1  $\mu$ g der Plasmid-DNA und 50  $\mu$ l LiT durch Pipettieren gemischt und für 10 min auf dem Drehrad inkubiert. Dem Ansatz werden 300  $\mu$ l PEG/LiT (50 % [v/v] Polyethylenglycol (PEG) 4000 in LiT) zugegeben und die Zellsuspension für weitere 10 min auf dem Drehrad gemischt. Nach Zugabe von 15  $\mu$ l DMSO wird der Ansatz für 3 min einem Hitzschock bei 42 °C unterzogen und im Anschluss bei Zentrifugieren in der Tischzentrifuge wiederholt mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Zuletzt werden die Zellen für 30 min in YPD-Vollmedium inkubiert, dann auf selektivem Medium ausplattiert.

#### 3.1.5.3 Prinzip des *Two-Hybrid-Screens*

Das Prinzip eines Hefe-*Two-Hybrid-Screens* beruht auf der Möglichkeit, Transkriptions-Aktivatoren in ihre zwei funktionell unabhängigen Untereinheiten, die DNA-bindende und die Transkription-aktivierende Domäne, zu zerlegen. Die so getrennten Domänen sind in der Lage, eine *upstream activating site* (UAS) in der Promotorregion eines Gens zu binden und die Transkription des Gens zu veranlassen, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gebracht

werden. Werden die beiden Domänen durch rekombinante DNA-Technologie an zwei miteinander interagierende Proteine fusioniert und zusammen in einer Hefezelle exprimiert, geraten die beiden Domänen des Transkriptions-Aktivators in die notwendige Proximität, um das Ablesen eines Gens zu erlauben. Kann nun die Transkription dieses (Reporter-) Gens gemessen werden, liegt ein experimentelles System zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen vor (Fields und Song, 1989).

Für den *Two-Hybrid-Screen* nach SMNr<sub>p</sub>-Interaktionspartnern wird SMNr<sub>p</sub> in den Vektor pAS-1 kloniert und so mit der DNA-bindenden Domäne des Transkriptions-Aktivators GAL4 fusioniert. Dieses *bait*-Konstrukt wird in den Hefe-Stamm CG1945 transformiert, in dem die endogenen *GAL4*-, *HIS3*- und *LacZ*-Gene deletiert sind. Der *bait*-Stamm trägt *HIS3* und *LacZ* als Reportergene, deren Expression durch die *GAL1*-UAS kontrolliert wird. Um Interaktionspartner zu finden, wird der *bait*-Stamm mit einer cDNA-Bank, die in den Vektor pACT2 konstruiert ist, transformiert. Die einzelnen cDNAs sind dadurch mit der Transkription-aktivierenden Domäne von GAL4 fusioniert (*prey*-Konstrukte). Bei einer Interaktion zwischen dem *bait*- und einem *prey*-Konstrukt können die *GAL1*-UAS-kontrollierten Reportergene in der Hefe transkribiert werden. Dadurch sind die Zellen in der Lage auf Histidin-freiem Medium zu wachsen. Außerdem kann die Aktivität der exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen werden.

Für den *Two-Hybrid-Screen* nach TUBA-Interaktionspartnern ist die TUBA-Sequenz als *bait*-Konstrukt in den Vektor pGBKT7 kloniert und wird, nach Transformation in den *bait*-Stamm PJ69-2A (*Mating*-Typ  $\alpha$ ), ebenfalls als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne von GAL4 exprimiert. Die cDNA-Bank in pACT2 (*prey*-Konstrukte, wie oben) ist in diesem Fall in den Hefe-Stamm Y187 (*Mating*-Typ  $\alpha$ ) vortransformiert (*prey*-Stamm). Um Interaktoren zu finden werden *bait*- und *prey*-Stamm miteinander gekreuzt (*mating*). Neben *HIS3* und *LacZ* enthalten sie zusätzlich *ADE2* als Reportergen. Bei einer Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Konstrukt können die Hefezellen daher auf Histidin und Adenin-freiem Medium wachsen und sind  $\beta$ -Galaktosidase-positiv.

#### **3.1.5.4 *Two-Hybrid-Screen* nach SMNr<sub>p</sub>-Interaktionspartnern**

Für den *Two-Hybrid-Screen* nach SMNr<sub>p</sub>-Interaktionspartnern wird das „Matchmaker“ *Two-Hybrid*-System nach den Herstellerangaben (Fa. Clontech) verwendet. Zunächst wird die codierende Sequenz von SMNr<sub>p</sub> in den Vektor pAS2-1 kloniert und in den Hefe-Stamm CG1945 transformiert (*bait*-Stamm). Die transformierten Zellen werden auf SDC-Medium

ohne Tryptophan selektioniert. Dieser *bait*-Stamm wird nun mit einer in den Vektor pACT2 konstruierten humanen cDNA-Bank aus Gehirngewebe (Fa. Clontech) transformiert. Die Doppeltransformanten werden auf SDC-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin in Anwesenheit von 10 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT, Fa. Sigma) selektioniert.

Alle unter diesen Bedingungen wachsenden Klone werden durch „ $\beta$ -Gal-Filter-Lift-Assay“ untersucht. Dazu werden die Kolonien von einer Agarplatte auf Nitrozellulosefilter übertragen und zur Permeabilisierung für 15 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend werden die Filter auf einem Whatman-Papier aufgetaut, das mit 5 ml Z-Puffer (s. u.), 13,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 83,5  $\mu$ l X-Gal-Lösung (20 mg/ml 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid [X-Gal] in Dimethylformamid) getränkt ist. Nach 30 min bis 2 h kann bei positiven Kolonien eine Blaufärbung beobachtet werden.

**Z-Puffer:**

16,1 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
5,5 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
0,75 g	KCl
0,246 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
ad 1 l	H <sub>2</sub> O
pH 7,0	

**3.1.5.5 Two-Hybrid-Screen nach TUBA-Interaktionspartnern**

Für den *Two-Hybrid-Screen* nach TUBA-Interaktionspartnern wird das „Pretransformed Matchmaker Library“-System nach den Herstellerangaben (Fa. Clontech) verwendet. Zunächst wird die codierende Sequenz von TUBA in den Vektor pGBKT7 kloniert (*bait*-Konstrukt) und in den Hefe-Stamm PJ69-2A transformiert. Die transformierten Zellen werden auf SDC-Medium ohne Tryptophan selektioniert. Dieser *bait*-Stamm wird mit einem vortransformierten *prey*-Stamm (humane cDNA-Bank aus Gehirngewebe, konstruiert in pACT2, transformiert in Hefe-Stamm Y187, Fa. Clontech) gekreuzt und auf SDC-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin selektioniert. Kolonien, die unter diesen Bedingungen wachsen, werden durch „ $\beta$ -Gal-Filter-Lift-Assay“ (siehe Kapitel 3.1.5.4) auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität untersucht.

**3.1.5.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen**

Die cDNAs der *prey*-Konstrukte in Hefe-Klonen, die unter den Selektionsbedingungen im jeweiligen *Two-Hybrid-Screen* wachsen und die  $\beta$ -Galaktosidase-positiv sind, codieren für putative Interaktionspartner von SMNrp oder TUBA. Zur Sequenzierung und weiteren

Analyse muss die Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert und in *E. coli* weiterpropagiert werden.

Dazu werden die Klone in 10 ml SDC-Medium ohne Leucin kultiviert, so dass ein Selektionsdruck nur auf das *prey*-Plasmid ausgeübt wird. Die Zellen werden bis zur stationären Phase bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Ernte durch Zentrifugation wird das Zellpellet in 150 µl Zymolyase-SCE (s. u.) resuspendiert und für 30 min bei 30 °C inkubiert, um die Zellwände zu aufzubrechen. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 500 µl TES-Puffer (1 M Tris-HCl [pH 9,7], 0,5 M EDTA, 0,5 % [w/v] SDS) und Inkubation bei 65 °C für 30 min. Nach Zugabe von 150 µl 5 M Kaliumacetat und Inkubation für 1 h auf Eis werden die ausgefallenen Proteine und die genomische DNA für 10 min bei 14000 g und 4 °C abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wird nach Standardmethoden mit Isopropanol präzipitiert, RNaseA verdaut, Ethanol-präzipitiert und zuletzt in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Je 5 µl werden hiervon zur Transformation von *E. coli* verwendet.

**Zymolyase-SCE:**

5 ml SCE (1,2 M Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat, 75 mM EDTA, pH 7,0)

50 µl β-Mercaptoethanol

2 mg Zymolyase-100T (Fa. IVN)

## 3.2 Biochemische Methoden

### 3.2.1 Standardmethoden der Proteinbiochemie

Alle proteinbiochemischen Standardmethoden wurden nach den Versuchsvorschriften in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der hier nicht aufgeführten Puffer.

### 3.2.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (1970). Dafür wird zwischen zwei abgedichtete Glasplatten zunächst ein Trenngel (s. u.), nach der Polymerisation darauf dann ein Sammelgel (s. u.) gegossen. Die genaue Vorgehensweise hierzu ist in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Nach der Polymerisation wird das Gel in eine mit Laufpuffer (s. u.) gefüllte Elektrophorese-apparatur eingespannt. Die Proteinproben (bis 20 µl) werden mit einem Drittel Volumen Probenpuffer (siehe Kapitel 2.3) versetzt und bei 96 °C für 5 min denaturiert. Anschließend werden sie in die Probenaschen des Gels pipettiert und bei einer Stromstärke von 50 bis 65 mA aufgetrennt.

Zur Coomassie-Färbung der aufgetrennten Proteine wird das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in Färbelösung (0,1 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250, 30 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure), danach mehrfach in Entfärbelösung (30 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure) geschwenkt. Zum immunologischen Nachweis werden die Proteine nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Westernblot-Verfahren, siehe Kapitel 3.3.3). Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine wird das Gel zur Fixierung für 30 min in 30 % Essigsäure geschwenkt, in einem Gelrockner getrocknet und autoradiographiert.

**Trenngel-Lösung (12 % Acrylamid):**

4 ml 30 %-Acrylamid-Lösung (Acrylamid / N,N'-Methylen-bisacrylamid, 37,5:1 [w/w])  
2 ml 2 M Tris-HCl pH 8,0  
3,85 ml H<sub>2</sub>O  
50 µl 20 % (w/v) SDS  
4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)  
100 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

**Sammelgel-Lösung (4,5 % Acrylamid):**

1,5 ml 30 %-Acrylamid-Lösung (Acrylamid / N,N'-Methylen-bisacrylamid, 37,5:1 [w/w])  
1,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8  
6,8 ml H<sub>2</sub>O  
50 µl 20 % (w/v) SDS  
5 µl TEMED  
100 µl 10 % (w/v) APS

**Elektrophorese-Laufpuffer:**

150 g Glycin  
30 g Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan  
10 g SDS  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

### 3.2.3 Rekombinante Expression von Proteinen

#### 3.2.3.1 Expression in *E. coli*

Für die Expression eines rekombinanten Proteins wird das entsprechende Plasmid-Konstrukt in *E. coli* transformiert (pET-Konstrukte in den Stamm BL21(DE3), pGEX-Konstrukte in DH5α) und eine Übernachtskultur in 500 ml 2YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C angelegt. Am nächsten Morgen wird 1 l frisches Medium zugegeben, die Expression der Konstrukte durch Zugabe von 1 mM IPTG (pET-Konstrukte) oder 0,2 mM IPTG (pGEX-Konstrukte) induziert und die Kultur bei 26 °C für 4-5 h weiterinkubiert. Danach werden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 min mit 5000 g bei 4 °C geerntet. Die Bakterien (Pellets) werden in P500 mit 0,5 mM

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der Zellreste (25000 g, 1 h, 4 °C) werden die Überstände in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (ZZ-Fusionsproteine) oder durch Affinitätsreinigung (GST- und His-Fusionsproteine, s. u.) weiter aufgearbeitet.

### 3.2.3.2 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen

Zur Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen werden die wie oben beschrieben hergestellten Bakterienlysate mit 1 ml Glutathion-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wird fünfmal mit einem zehnfachen Volumen P300 gewaschen, dann die gebundenen GST-Fusionsproteine mit 10 mM Glutathion in P300 eluiert. Die Proteine werden anschließend für 2 h gegen P300 dialysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Reinigung von His-Fusionsproteinen werden die Bakterienlysate mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Fa. Qiagen) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen mit P300 werden die gebundenen Proteine mit 150 mM Imidazol in P300 eluiert, gegen P300 dialysiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Aliquots der Elutionsfraktionen werden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

### 3.2.4 Radioaktive Markierung von Proteinen durch gekoppelte *in-vitro*-Transkription und -Translation

Zur gekoppelten *in-vitro*-Transkription und -Translation von cDNAs wird das „TNT-T7 coupled Transcription/Translation Assay“ (Fa. Promega) verwendet. Die hierfür eingesetzten cDNA-Konstrukte enthalten einen T7-Promoter und leiten sich von den Vektoren pET21a, pET28a und pHA ab. Zur radioaktiven Markierung der Proteine bei der Translation wird [<sup>35</sup>S]-Methionin verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

1 µl	Plasmid-DNA (1 µg/µl)
1 µl	[ <sup>35</sup> S]-Methionin (10 µCi/µl)
0,5 µl	RNasin (RNase-Inhibitor, Fa. Promega)
7,5 µl	TNT-T7 Quick Reticulocyten-Lysat (Fa. Promega)

Die Ansätze werden für 2 h bei 30 °C inkubiert, anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren. Ein Aliquot der Reaktion wird durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

### 3.2.5 Herstellung von Zellextrakten

#### 3.2.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus transfizierten 293-Zellen

Die Zellen werden 24 bis 48 h nach Zugabe der Lipofectamin-DNA-Mischung bei der Transfektion (siehe Kapitel 3.1.4) mit PBS (37 °C) gewaschen. Dann werden pro 10cm-Kulturschale 1 ml IP-Puffer (siehe Kapitel 2.3) zugegeben und die Zellen zur Lyse 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden mit einem Zellspachtel von der Kulturschale gekratzt und das Lysat für 10 min mit 15000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Die Gesamtzellextrakte erhält man als Überstand der Zentrifugation. Sie werden für Immunpräzipitationen und Westernblots verwendet.

#### 3.2.5.2 Herstellung von HeLa-Zellextrakten

Kern- und Cytoplasmaextrakte aus HeLa-Zellen werden in Anlehnung an ein Protokoll von Dignam *et al.* (1983) hergestellt. Alle Schritte erfolgen bei 4 °C mit vorgekühlten Lösungen und Geräten.

##### **Kernextrakt:**

Zunächst werden  $5 \cdot 10^{10}$  HeLa-Zellen (Fa. Celltech) in PBS gewaschen und bei 1000 g pelletiert. Nach Resuspension im fünffachen Pelletvolumen Roeder-A-Puffer (10 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH [pH 7,9], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) werden die Zellen für 10 min gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im zweifachen Volumen Roeder-A-Puffer erfolgt der Zellaufschluss durch 10 Pistillstöße in einem Glashomogenisator (*Douncer*). Die Zellkerne werden vom Cytoplasma durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 g in einem Ausschwingrotor getrennt. Der cytosolische Überstand wird wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die pelletierten Kerne werden in 150 ml Roeder-C-Puffer (420 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH [pH 7,9], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 5 % [v/v] Glycerin, 0,5 mM PMSF) resuspendiert und durch 15 Pistillstöße im *Douncer* aufgeschlossen. Die Suspension wird für 30 min auf Eis gerührt, danach für 30 min bei 25000 g abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird zum Schluss für 2,5 h gegen Roeder-D-Puffer (100 mM KCl, 20 mM HEPES/KOH [pH 7,9], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 20 % [v/v] Glycerin, 0,5 mM PMSF) dialysiert. Die so hergestellten Kernextrakte werden für Dichtegradienten-Ultrazentrifugationen und für *in-vitro*-Spleißexperimente verwendet.

**Cytoplasmaextrakt:**

Der wie oben beschrieben gewonnene cytoplasmatische Überstand wird durch Zugabe von 5 M NaCl auf eine Endkonzentration von 300 mM NaCl gebracht, zur Entfernung von Lipiden mit n-Heptan überschichtet und für 15 min bei 10000 g abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird als Cytoplasmaextrakt abgenommen. Zur Verwendung für Immunpräzipitationen wird Igepal auf eine Endkonzentration von 0,5 % zugegeben und der Extrakt durch einen Microfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert.

**Gesamtzellextrakte:**

Gesamtzellextrakt von HeLa-Zellen wird durch Lyse mit IP-Puffer, wie für 293-Zellen beschrieben, hergestellt (siehe Kapitel 3.2.5.1). Alternativ werden HeLa-Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 10 min auf Eis lysiert, für 15 min mit 15000 g bei 4 °C pelletiert und der Überstand als Extrakt gewonnen.

**3.2.6 Bindungsexperimente**

Zur Analyse der Interaktion zwischen zwei Proteinen wird eines der beiden in *E. coli* als GST- oder ZZ-Fusionsprotein exprimiert und an einer geeigneten Matrix immobilisiert. Das andere wird als *in-vitro*-translatiertes oder ebenfalls rekombinant exprimiertes Protein zugegeben.

Bei ZZ-Fusionsproteinen werden Bakterienlysate, die 1-2 µg des rekombinanten Proteins enthalten, mit 30 µl IgG-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) für 1 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Bei GST-Fusionsproteinen werden 1-2 µg des gereinigten Proteins mit 30 µl Glutathion-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) ebenfalls für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit einem zehnfachen Volumen P300 werden 1-5 µl eines *in-vitro*-Translationsansatzes (siehe Kapitel 3.2.4) oder 1-2 µg rekombinant exprimiertes und gereinigtes Protein zugegeben und zur Proteinbindung für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wird erneut fünfmal mit dem jeweils angegebenen Puffer gewaschen, das Reaktionsgefäßes gewechselt und schließlich die gebundenen Proteine mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgt durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie bei *in-vitro*-Translaten oder durch Coomassie-Färbung bzw. Westernblot bei rekombinanten Proteinen.

**3.2.7 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation**

Die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation dient der analytischen Fraktionierung von Zell-extrakten. Mit einem Gradientenmischer (Fa. Biocomp) werden dazu lineare, 15- bis 45-

prozentige (w/v) Saccharosegradienten in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub> mit einem Volumen von 11 ml hergestellt. Die Gradienten werden mit je 500 µl des zu fraktionierenden Extrakts beladen und für 18 h mit 41000 rpm bei 4 °C in einem „SW41-Ti“-Ausschwingrotor (Fa. Beckman) bei ausgeschalteter Rotorbremse zentrifugiert. Nach Beendigung des Laufes werden 500µl-Fractionen gesammelt, die Proteine mit TCA präzipitiert und in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgt durch SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot. Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wird ein Referenzgradient gefahren, der mit 300 µl einer Proteinmischung aus Cytochrom-C (2S), IgG (7S), Katalase (11S), und β-Galaktosidase (20S) beladen ist. Der Referenzgradient wird durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert.

Zur Analyse der snRNA-Sedimentation in HeLa-Kernextrakten wird die RNA in den Fraktionen nach Standardmethoden Phenol-extrahiert, Ethanol-präzipitiert, durch denaturierende PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung nach Merril *et al.* (1983) sichtbar gemacht.

### **3.2.8 Identifikation von Proteinen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

Zur Identifikation eines Proteins wird die entsprechende Bande aus Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen ausgeschnitten und noch im Gel mit Trypsin verdaut (Eckerskorn und Lottspeich, 1989). Anschließend werden die tryptischen Protein-Fragmente an einem „Bruker Reflex III MALDI – time of flight“ Massen-Spektrometer (Fa. Bruker-Franzen) analysiert. Die ermittelten Peptidmassen werden dann für Datenbank-Vergleiche mit dem Programm „MSFIT“ (<http://prospector.ucsf.edu>) verwendet. Massenspektroskopische Analysen in dieser Arbeit werden von der Abteilung Lottspeich, MPI für Biochemie in Martinsried, durchgeführt.

## **3.3 Immunologische Methoden**

### **3.3.1 Immunologische Standardmethoden**

Sämtliche nicht näher beschriebenen immunologischen Standardmethoden wurden wie in Harlow und Lane (1988) beschrieben durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der hier nicht im einzelnen aufgeführten Puffer und Lösungen. Die Grundlagen und Details der Herstellung von Antisera sind ebenfalls in Harlow und Lane (1988) beschrieben.

### 3.3.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Spezifische, polyklonale Antikörper werden durch Immunisierung von Kaninchen mit dem jeweiligen Antigen gewonnen. Dazu wird das Antigen wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben in *E. coli* exprimiert und affinitätsgereinigt. Für die Erstimmunisierung werden 500 µg des gereinigten Proteins (etwa 1mg/ml) in einem 1:1-Verhältnis mit komplettem Freundschens Adjuvans (Fa. Sigma) gemischt, durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und subkutan in ein Kaninchen injiziert. Im Abstand von 14 Tagen erfolgen 3 bis 4 weitere (*Booster*-) Injektionen mit einer 1:1-Suspension aus dem Antigen und inkomplettem Freundschens Adjuvans (Fa. Sigma). Durch Punktion der Ohrarterie wird dem Kaninchen Testblut entnommen und das Serum im Westernblot auf seine Spezifität getestet. Gegebenenfalls erfolgen weitere *Booster*-Injektionen. Bei ausreichender Spezifität wird das Tier narkotisiert und durch Herzpunktion getötet. Das aufgefangene Blut wird zur Gerinnung für 2 h bei 37 °C inkubiert, dann für 30 min bei 10000 g abzentrifugiert.

Zur Affinitätsreinigung des Antiserums werden 1-2 mg des Antigens als rekombinant exprimiertes, gereinigtes Protein gemäß der Herstellerangaben kovalent an NHS-aktivierte Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) gekoppelt. Zur Bindung spezifischer Antikörper wird das Serum in einer Chromatographie-Säule mehrfach über diese Affinitätsmatrix geladen. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit P300 werden die gebundenen Antikörper durch pH-Schock mit 0,1 M Glycin pH 2,3 eluiert, die Eluate durch Zugabe von 10 % (v/v) 2 M Tris-HCl (pH 8,8) sofort neutralisiert und schließlich gegen PBS dialysiert. Die gereinigten Antiseren werden im Westernblot auf ihre Spezifität getestet. Alle Antikörper werden bei -20 °C gelagert.

Der in dieser Arbeit beschriebene anti-SMNrp-Antikörper (siehe Kapitel 4.1.2.2) wird durch Immunisierung mit His-SMNrp und Affinitätsreinigung an GST-SMNrp hergestellt, der anti-TUBA-Antikörper (Kapitel 4.2.2.1) durch Immunisierung und Affinitätsreinigung mit His-TUBA.

### 3.3.3 Proteinnachweis durch Westernblot

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wird das Westernblot-Verfahren verwendet. Dazu werden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, dann in einer *Semi-dry*-Blotapparatur bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 2 h auf eine Nitrozellulose-Membran (Fa. Amersham) übertragen. Als Transferpuffer dient 20 % (v/v) Methanol in Laufpuffer für SDS-PAGE (siehe Kapitel

3.2.2). Nach dem Proteintransfer werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Schwenken in 5 % Magermilchpulver in TBT-Puffer (s. u.) blockiert. Anschließend wird die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper in TBT inkubiert. Die hierfür geeignete Verdünnung wird in Vorversuchen empirisch ermittelt. Nach fünfmaligem Waschen für 10 min mit TBT wird die Membran für 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper, 1:1000 in TBT verdünnt, inkubiert, danach erneut fünfmal gewaschen. Die Peroxidase-Aktivität gebundener Sekundärantikörper wird durch Chemilumineszenz unter Verwendung von „Enhanced Chemical Luminescens“-Reagenz (ECL, Fa. Amersham-Pharmacia) nach den Herstellerangaben nachgewiesen.

**10´ TBT-Puffer:**

175,2 g	NaCl
14,5 g	Tris-Base
60 g	Tris-HCl
100 ml	Tween-20
ad 2 l	H <sub>2</sub> O

### **3.3.4 Immunpräzipitation**

Immunpräzipitationen dienen der spezifischen, selektiven Isolierung eines Antigens und seiner Komplexpartner aus Zellextrakten. Alle Arbeiten finden bei 4 °C statt.

Zur Präzipitation des TUBA-TOP3 $\beta$ -Komplexes (Kapitel 4.2.3.1) werden 50  $\mu$ g affinitätsgereinigte anti-TUBA-Antikörper durch Inkubation für 2 h an Protein-G-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) immobilisiert. Nach Waschen mit P300 werden die Antikörper für 3 h mit 10 ml HeLa-Cytoplasmaextrakt (siehe Kapitel 3.2.5.2) inkubiert. Anschließend wird fünfmal mit P300 mit 0,5 % Igepal gewaschen und das Reaktionsgefäß gewechselt. Die gebundenen Proteine werden mit insgesamt 4 ml 0,1 M Glycin (pH 2,3) eluiert, TCA-präzipitiert und in Probenpuffer aufgenommen. Sie werden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Durch Westernblot wird parallel dazu die TUBA-Präzipitation aus dem Extrakt nachgewiesen.

Für die Präzipitation von TUBA und FMRP aus 293-Extrakten (siehe Kapitel 3.2.5.1) werden je 25  $\mu$ g anti-TUBA oder anti-FMRP an Protein-G-Sepharose immobilisiert und mit 2,5 ml 293-Gesamtzellextrakt inkubiert. Es wird fünfmal mit IP-Puffer-Puffer gewaschen und mit 1,6 ml Glycin (0,1 M, pH 2,3) eluiert. Nach TCA-Präzipitation und SDS-PAGE werden die Proteine durch Westernblot wechselseitig nachgewiesen. HA-Fusionsproteine werden mit je 20  $\mu$ g immobilisiertem anti-HA aus 1 ml Extrakt transfizierter 293-Zellen präzipitiert, nach

Waschen mit IP-Puffer mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und eine TUBA-Copräzipitation durch Westernblot nachgewiesen.

Als Spezifitätskontrolle der Immunpräzipitationen werden in allen Fällen parallel zum eigentlichen Ansatz auf gleiche Weise behandelte Kontrollpräzipitationen mit unspezifischen Antikörpern oder -seren durchgeführt.

### **3.3.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen kann durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden. Dazu werden COS-1-, HeLa- oder 3T3-Zellen auf sterilen Deckgläschen in 24-*well*-Platten unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.1.4) kultiviert. Bei etwa 50 % Konfluenz werden die Zellen mit PBS (37 °C) gewaschen, in 3,7 % Formaldehyd in PBS (frisch angesetzt) für 7 min bei RT fixiert, dann mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS (RT) gewaschen und zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in 3 % (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBP-Puffer (0,1 % [v/v] Tween-20 und 0,2 % [w/v] BSA in PBS) werden die Zellen für 2 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBP, inkubiert. Anschließend werden die Zellen fünfmal mit TBP gewaschen, dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper in TBP für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die geeignete Verdünnung wird für jeden Antikörper in Vorversuchen empirisch ermittelt. Nach Bindung der Sekundärantikörper wird erneut fünfmal mit TBP, dann zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Dann werden die Deckgläschen mit den Zellen auf einem Objektträger in einem Tropfen PVA-DABCO (Polyvinylalkohol-Einbettmedium mit DABCO, Fa. Fluka) eingebettet und bis zum Mikroskopieren bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zellen, die nach Transfektion GFP-Fusionsproteine exprimieren, werden nur wie oben beschrieben fixiert und in PVA-DABCO eingebettet.

Die Präparate werden unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop („Axioplan 2“, Fa. Zeiss) oder einem Laser-Scanning-Mikroskop („LSM410“, Fa. Zeiss) mit einem 40×/1,3 Neofluar- oder 100×/1,3 Neofluar-Öl-immersionsobjektiv betrachtet. FITC- und GFP-Fluoreszenzen werden bei 488 nm angeregt, die Emission mit einem 510-525nm-Bandpassfilter gefiltert, TRITC-Fluoreszenzen werden bei 543 nm angeregt und mit einem 570nm-Langpassfilter betrachtet. Die Fluoreszenzen werden über eine gekoppelte CCD-Kamera dokumentiert.

## 3.4 Spezielle Experimente

### 3.4.1 Acetylierung von Histonen

Die *in-vitro*-Acetylierung von Histonen dient der Analyse der enzymatischen Aktivität einer Histon-Acetyltransferase, in diesem Fall GCN5-S (Kapitel 4.1.3.4). Als Substrat dienen freie Histone aus Kalbsthymus (TypII-A, Fa. Sigma) oder durch Oktamertransfer an DNA *in vitro* rekonstituierte Nucleosomen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Keiko Ikeda, Genzentrum der LMU München).

Es werden zunächst 2 µg gereinigtes His-GCN5-S zur Komplexbildung mit 2 bis 20 µg His-SMNrp, His-SMNrpΔN, His-SMNrpΔC oder BSA als Kontrolle auf Eis präinkubiert. Anschließend werden 10 µg freie Histone oder 100 ng Nucleosomen und Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM Isobuttersäure, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 10 % [v/v] Glycerin) zu einem Gesamtvolumen von 23 µl pro Ansatz zugegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl [<sup>14</sup>C]-Acetyl-CoA (59 mCi/mmol) gestartet und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung oder Autoradiographie analysiert.

### 3.4.2 Spleißen einer prä-mRNA

#### 3.4.2.1 Radioaktive Markierung von RNA

##### Markierung am 3'-Ende durch pCp:

Für den Nachweis von snRNAs in Immunpräzipitationen werden die RNAs aus den Elutionen Phenol-extrahiert und mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (Sambrook *et al.*, 1989). Anschließend wird die RNA in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und am 3'-Ende mit [<sup>32</sup>P]-pCp (Cytidin-3'-5'-bisphosphat) markiert. Folgender Ansatz wird dafür verwendet:

100 ng	RNA
2,5 µl	Dimethylsulfoxid (DMSO)
1 µl	10×-Puffer für T4-RNA-Ligase (MBI)
1 µl	[ <sup>32</sup> P]-pCp (10mCi/ml, Fa. Amersham-Pharmacia)
1 µl	T4-RNA-Ligase (10U/µl, MBI)
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Die Ansätze werden für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird die RNA mit Ethanol präzipitiert, in 50 µl RNA-Probenpuffer (90 % [v/v] Formamid, 0,025 % [w/v] Xylencyanol, 0,025 % [w/v] Bromphenolblau) aufgenommen, durch denaturierende PAGE in einem 4%-

Gel (4 % Polyacrylamid [Acrylamid / N,N'-Methylen-Bisacrylamid, 19:1 (w/w)], 8 M Harnstoff in 0,5× TBE) aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### Markierung durch *in-vitro*-Transkription:

Als Substrat für Spleißreaktionen wird eine prä-mRNA verwendet, die durch *Run-off*-Transkription des pAd48-Konstrukts erhalten wird (Fischer *et al.*, 1995). Die RNA wird dabei durch Einbau von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-UTP radioaktiv markiert. Zunächst wird hierfür das pAd48-Plasmid durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI linearisiert. Die DNA wird durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Für die *in-vitro*-Transkription wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

2 $\mu$ l	pAd48-DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l, linearisiertes Plasmid)
3 $\mu$ l	10×-Reaktionspuffer für RNA-Polymerase
5 $\mu$ l	NTP-Mix (je 5 mM ATP,CTP,GTP und UTP)
1 $\mu$ l	m <sup>7</sup> GpppG (25 mM)
2,5 $\mu$ l	DTE (0,1 M)
8 $\mu$ l	RNase-freies H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	BSA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l, RNase-frei)
3 $\mu$ l	$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-UTP (3000 Ci/mmol)
2 $\mu$ l	RNA-Polymerase (10 u/ $\mu$ l)

Die Reaktion wird für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Reinigung der *in-vitro*-transkribierten RNA wird der gesamte Reaktionsansatz mit 1 Volumen RNA-Probenpuffer (s. o.) gemischt und durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 4%-Polyacrylamidgel (s. o.) aufgetrennt. Die durch Autoradiographie sichtbar gemachte Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten, mit 400  $\mu$ l AES-Puffer (300 mM NaAc [pH 5,2], 2 mM EDTA, 0,1 % [w/v] SDS) versetzt und über Nacht bei 4 °C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wird die extrahierte RNA Ethanol-präzipitiert, in RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und ihre spezifische Radioaktivität durch Messung der Cherenkov-Strahlung im Szintillationsmessgerät ermittelt.

#### 3.4.2.2 Herstellung von SMNrp-depletiertem Kernextrakt

Für *in-vitro*-Spleißreaktionen wird Kernextrakt aus HeLa-Zellen, wie in Kapitel 3.2.5.2 (Seite 46) beschrieben, verwendet. Zur Depletion von SMNrp aus dem Kernextrakt wird 200  $\mu$ g anti-SMNrp in Absättigungspuffer (0,1 mg/ml BSA, 0,1  $\mu$ g/ml tRNA und 0,1  $\mu$ g/ml Glycogen in PBS) an Protein-G-Sepharose gebunden (2 h, 4 °C). Für die Kontrolldepletion (*mock*-Depletion) wird die Protein-G-Sepharose nur mit Absättigungspuffer inkubiert. Anschließend wird je 500  $\mu$ l Kernextrakt in Roeder-C-Puffer (nach dem letzten Zentrifugationsschritt, siehe Kapitel 3.2.5.2) für 1 h bei 4 °C mit der Sepharose inkubiert. Die Sepharose wird

abzentrifugiert und der Überstand zum Schluss gegen Roeder-D-Puffer (siehe Kapitel 3.2.5.2) dialysiert. Je 10 und 20 µl des Extrakt werden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die SMNrp-Depletion durch Westernblot überprüft.

### 3.4.2.3 Spleißreaktion *in vitro*

*In-vitro*-Spleißreaktionen werden nach Segault *et al.* (1995) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthält 30 % (v/v) HeLa-Kernextrakt (siehe Kapitel 3.2.5.2),  $2 \cdot 10^4$  cpm  $^{32}\text{P}$ -markierte pAd48-prä-mRNA (siehe Kapitel 3.4.2.1), 40 mM KCl, 10 mM Creatinphosphat, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 12,5 µl. Die Ansätze werden für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird die RNA durch Phenolextraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt, in RNA-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.4.2.1) aufgenommen und durch denaturierende PAGE in einem 5%-Gel (5 % Polyacrylamid [Acrylamid / N,N'-Methylen-Bisacrylamid, 19:1 (w/w)], 8 M Harnstoff in 0,5× TBE) aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Für Antikörper-Inhibitionsstudien wird 12,5 µl Kernextrakt vor der Spleißreaktion für 30 min mit 1 bis 5 µg anti-SMNrp oder Kontrollantikörper bei 37 °C präinkubiert.

Die Herstellung von SMNrp-depletiertem Kernextrakt ist in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben. Für die Rekonstitution der Spleißaktivität werden vor der Spleißreaktion 1 oder 5 µg rekombinant exprimiertes, affinitätsgereinigtes His-SMNrp zugegeben.

### 3.4.2.4 Das *Xenopus laevis* Oocytensystem

Oocyten des afrikanischen Krallenfrosches *X. laevis* sind aufgrund ihrer Größe, Stabilität und leichten Zugänglichkeit zur *in-vivo*-Analyse zellulärer Prozesse besonders geeignet.

#### Präparation von Oocyten:

Zur Entnahme der Oocyten werden weibliche Frösche durch Unterkühlung auf Eis für 45 min narkotisiert. Dann werden nacheinander die Bauchhaut und die darunter liegende Muskelschicht durch zwei etwa 0,5 bis 1 cm lange Schnitte durchtrennt und der Bauchraum geöffnet. Das freiliegende Ovar kann mit einer Pinzette aus dem Bauchraum gezogen werden und wird an gewünschter Stelle mit einer Schere abgeschnitten. Die Operationswunde wird zum Schluss mit 2 bis 3 Stichen vernäht.

Für Injektionsstudien ist es notwendig, dass das Bindegewebe, das die Oocyten im Ovar umgibt, entfernt wird. Dazu wird das entnommene Ovar in einer Kollagenase-Lösung (0,5 mg Kollagenase/ml OR-Puffer [s. u.] ohne  $\text{CaCl}_2$ ) für 2 h im Dunkeln leicht geschwenkt.

Anschließend werden die Oocyten einmal mit OR-Puffer (82,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM HEPES-KOH [pH 7,6], 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen.

### **Mikroinjektion:**

Für die Mikroinjektion werden mit Hilfe eines Kapillarziehgeräts (Fa. Sutter Instruments, Modell P97) Injektionskapillaren (Fa. Blaubrand) gezogen. Die geschlossene Kapillare wird durch Abbrechen eines kleinen Stücks ihrer Spitze geöffnet. Anschließend wird die Kapillare in die Kapillarhalterung einer Mikroinjektionsapparatur (Fa. Medical Systems, Modell PLI100) eingespannt. Die genaue Funktionsweise dieses Gerätes ist vom Hersteller beschrieben. Für den Injektionsvorgang werden die Oozyten auf einer rautenförmigen Schuhsohle (Fa. Woolworth) o. ä. fixiert und mit OR-Puffer (s. o.) bedeckt. Die Injektion der Oocyten erfolgt unter einer Binokularlupe bei einem Anstechwinkel von 40°.

Für die Injektion in den Zellkern wird die animale (dunkle) Seite der Oocyten angestochen und ein Volumen von etwa 20 nl injiziert. Nach Ende des Experiments werden die Zellkerne mit einer Pinzette mechanisch aus den Zellen isoliert.

#### **3.4.2.5 Spleißreaktion in *Xenopus laevis* Oocyten**

Das Spleißen von prä-mRNA wird wie in Fischer *et al.* (1995) beschrieben analysiert. Zunächst werden je 200 ng anti-SMNrp oder Kontrollantikörper in den Zellkern mehrerer Oocyten injiziert und die Zellen für 30 min bei 20 °C präinkubiert. Anschließend werden je 20 nl <sup>32</sup>P-markierte pAd48-prä-mRNA (250000 cpm/μl, siehe Kapitel 3.4.2.1) in den Kern injiziert. Nach Inkubation für 1 h bei 20 °C werden die Zellkerne mechanisch aus den Oocyten isoliert. Die RNA wird Phenol-extrahiert, Ethanol-präzipitiert und in RNA-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.4.2.1) aufgenommen. Sie wird durch denaturierende PAGE in einem 5%-Gel (siehe Kapitel 3.4.2.3) aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### **3.4.3 Decatenierung von Kinetoplast-DNA**

Decatenierungsexperimente dienen dem Nachweis der enzymatischen Aktivität von Topoisomerasen, in diesem Fall von TOP3β (Kapitel 4.2.3.3). Als Catenane werden ringförmige DNA-Moleküle bezeichnet, die wie Glieder einer Kette miteinander verknüpft sind. Als Substrat wird die catenane Kinetoplast-DNA des Insekten-Trypanosomiden *Crithidia fasciculata* (Fa. TopoGen, Columbus, Ohio, USA) verwendet. Bei Decatenierung dieser hochmolekularen DNA werden kleine ringförmige DNA-Moleküle freigesetzt die durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen werden können.

Zunächst werden 20 ng GST-TOP3 $\beta$  zur Komplexbildung mit 20 ng His-TUBA oder 120 ng GST-TUBA für 30 min auf Eis präinkubiert. Anschließend werden 150 ng Kinetoplast-DNA, 2  $\mu$ l 10 $\times$ -Reaktionspuffer für DNA-Topoisomerase-II (Fa. USB) und H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l zugegeben. Die Ansätze werden für 1 h bei 30 °C inkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe von 1 % (w/v) SDS gestoppt und die DNA durch Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung analysiert. Als Positivkontrolle werden 150 ng Kinetoplast-DNA unter den gleichen Bedingungen mit humaner DNA-Topoisomerase-II (Fa. USB) decateniert.

### 3.4.4 Inhibition der *in-vitro*-Translation einer mRNA

Zur Analyse der Aktivität von FMRP werden Translations-Inhibitions-Studien nach Lagerbauer *et al.* (2001) durchgeführt. Als Substrat der Reaktion dient SMN-mRNA, die durch *Run-off*-Transkription *in vitro* hergestellt wird.

#### 3.4.4.1 *Run-off*-Transkription der SMN-cDNA

Zunächst wird pHA-SMN durch *Pvu*II-Restriktionsverdau linearisiert. Die *Pvu*II-Schnittstelle liegt dabei jenseits des 3'-Endes der SMN-cDNA im Konstrukt. Die DNA wird durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Danach werden typischerweise zusammengegeben:

5 $\mu$ l	pHA-SMN (1 $\mu$ g/ $\mu$ l, <i>Pvu</i> II-linearisierte DNA)
5 $\mu$ l	DTT (0,1 M)
5 $\mu$ l	RNasin (Fa. Promega)
10 $\mu$ l	m <sup>7</sup> GpppG (25 mM, Fa. Amersham-Pharmacia)
10 $\mu$ l	NTP-Mix (je 5 mM ATP,CTP,GTP und UTP)
10 $\mu$ l	5 $\times$ -Reaktionspuffer für T7-RNA-Polymerase
2 $\mu$ l	RNase-freies H <sub>2</sub> O
3 $\mu$ l	T7-RNA-Polymerase (10 u/ $\mu$ l)

Der Ansatz wird zur Transkription für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die neusynthetisierte SMN-mRNA durch Phenolextraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt und in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Kontrolle der Synthese wird ein Aliquot der Reaktion durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

#### 3.4.4.2 Translations-Assay

Für die Translationsexperimente werden affinitätsgereinigtes His-FMRP, His-TUBA und His-TUBA<sub>558-744</sub> oder RNase-freies BSA (Fa. Promega) verwendet. Alle Proteine werden gegen

PBS250-G (PBS mit insgesamt 250 mM NaCl und 5 % Glycerin) dialysiert und durch Ultrafiltration auf 0,1 bis 1 µg/µl eingeeengt. Vor der *in-vitro*-Translation werden die Proteine zur Komplexbildung in den angegebenen Mengen für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend werden je 15 µg SMN-mRNA (s.o.) und PBS-250-G zu einem Gesamtvolumen von 2 µl pro Ansatz zugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert.

Für die *in-vitro*-Translation wird das „Rabbit reticulocyte lysate system“ der Fa. Amersham-Pharmacia verwendet. Pro 2µl-Ansatz der präinkubierten Proteine mit SMN-mRNA werden je 10,5 µl Translations-Mix zugegeben:

0,25 µl	MgAc (25 mM)
0,5 µl	KAc (2,5 M)
0,5 µl	RNase-Inhibitor (Fa. MBI)
0,5 µl	[ <sup>35</sup> S]-Methionin (10 µCi/µl)
1 µl	Aminosäure-Mix ohne Methionin
2,75 µl	RNase-freies H <sub>2</sub> O
5 µl	Reticulocyten-Lysat

Die Ansätze werden für 1 h bei 30 °C inkubiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das SMN-homologe Protein SMNrp

#### 4.1.1 Identifizierung und Klonierung von SMNrp

##### 4.1.1.1 Entdeckung von SMNrp und Klonierung der cDNA

Am Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob es beim Menschen bisher noch unbekannte Homologe von *SMN*, dem Krankheitsgen der spinalen Muskelatrophie, gibt. Damit verband sich die Hoffnung, durch die Analyse solcher verwandten Proteine nicht nur Erkenntnisse über bisher unerforschte Gene zu erhalten, sondern auch weitere Hinweise auf die Funktion von SMN selbst zu gewinnen.

Daher wurden mit der SMN-Sequenz Datenbanksuchen mit dem Sequenzvergleich-Programm „BLAST 2.0“ (Altschul *et al.*, 1997; <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) in verschiedenen *GenBank*-Sequenzdatenbanken beim *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), USA, durchgeführt. Dabei wurden Sequenzen von *expressed sequence tags* (ESTs, kurze cDNA-Fragmente exprimierter Gene) zweier verschiedener, bis dahin unbekannter Gene, gefunden, die nennenswerte Homologien zur SMN-Sequenz aufwiesen. Von diesen EST-Sequenzen wurden Oligonucleotide abgeleitet und als genspezifische Primer zur PCR-Amplifikation der cDNAs aus einer humanen, aus Gehirngewebe stammenden cDNA-Bank („Marathon human brain cDNA“, Fa. Clontech) verwendet. Die so zunächst amplifizierten Fragmente wurde anschließend durch 5'- und 3'-RACE mit der gleichen cDNA-Bank als Matrize vervollständigt, in verschiedene Vektoren kloniert und sequenziert. Kapitel 4.1 befasst sich im folgenden mit *SMNrp* (für *SMN-related protein*, Name übernommen von Talbot *et al.*, 1998), dem ersten der beiden isolierten Gene. Dem zweiten der beiden Gene, *TUBA*, ist Kapitel 4.2 gewidmet.

In Abbildung 4-1 ist die vollständige cDNA-Sequenz des humanen SMNrp gezeigt. Die 1735 bp lange Sequenz enthält ein offenes Leseraster, das für ein Protein aus 238 Aminosäuren codiert. Die Suche nach konservierten Domänen mit dem Programm „RPS-BLAST“ (NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) ergab, dass SMNrp wie SMN eine Tudor-Domäne in der Mitte des Proteins (von Aminosäure Trp<sub>73</sub> bis Lys<sub>130</sub>) besitzt. Eine weitere Analyse der Sequenz mit dem Programm „PSORT II“ (Human Genome Center, IMS,

Universität Tokio, <http://psort.nibb.ac.jp/>) zeigte, dass SMNr<sub>p</sub> ein putatives, zweiteiliges Kernlokalisierungssignal vom Nucleoplasmin-Typ enthält (Lys<sub>142</sub> bis Leu<sub>158</sub>).

1	G TTCCTCCCTTCCCTCGCCGCCGACCGAGTTCCTTTTCAGACCGGGTCGCCTTGC	60
61	TGTCGTCGCGGGTGAATTTTCCTGCTACTGCTACTGCTGCTGCTGCCACCGCCACTACCACT	120
121	GGGCTCATTTGCCCGACCCCTTCCCGCCGCCCGCCCCAGCCCCACACAAGATGTCAG	180
(1)		M S E (3)
181	AGGATTTAGCAAAGCAGCTGGCAAGCTACAAAGCTCAGCTCCAGCAAGTTGAAGCTGCAT	240
(4)	D L A K Q L A S Y K A Q L Q Q V E A A L	(23)
241	TATCTGGAAATGGAGAAAATGAAGATTTGCTAAAATTGAAGAAAGATTTACAAGAAGTTA	300
(24)	S G N G E N E D L L K L K K D L Q E V I	(43)
301	TAGAATAACCAAAGACCTTCTGTCAACTCAACCTTCTGAGACGCTTGAAGTTCAGACA	360
(44)	E L T K D L L S T Q P S E T L A S S D S	(63)
361	GTTTGTCTTCTACTCAACCTACTCATTTCATGGAAGTAGGAGACAAGTGTATGGCAGTCT	420
(64)	F A S T Q P T H S W K V G D K C M A V W	(83)
421	GGAGTGAAGATGGACAGTGTATGAAGCGGAGATTGAGGAGATAGATGAAGAAAATGGCA	480
(84)	S E D G Q C Y E A E I E E I D E E N G T	(103)
481	CCGCTGCAATCACCTTTGCTGGTTATGGCAATGCTGAAGTACTCCACTGTTGAACCTCA	540
(104)	A A I T F A G Y G N A E V T P L L N L K	(123)
541	AGCCTGTAGAAGAAGGAAGGAAGGCAAGGAGGACAGTGGCAACAAACCCATGTCAAAAA	600
(124)	P V E E G R K A K E D S G N K P M S K K	(143)
601	AAGAAATGATTGCCAGCAGCGTGAATATAAAAAGAAGAAAGCTTTGAAAAAGCTCAGA	660
(144)	E M I A Q Q R E Y K K K K A L K K A Q R	(163)
661	GAATAAAAGAACTTGAGCAGGAAAGAGAGGACCAGAAAGTGAATGGCAACAATTCAACA	720
(164)	I K E L E Q E R E D Q K V K W Q Q F N N	(183)
721	ACAGAGCCTATTCTAAAAACAAAAAGGCCAGGTAAGAGGAGTATTTTGTTCACCTG	780
(184)	R A Y S K N K K G Q V K R S I F A S P E	(203)
781	AGAGTGTGACTGGTAAAGTTGGAGTAGGAACCTGTGGAATTGCTGATAAACCTATGACAC	840
(204)	S V T G K V G V G T C G I A D K P M T Q	(223)
841	AATATCAAGATACCTCTAAATACAATGTCAGGCATTTGATGCCTCAATTAATCAGAAAAAC	900
(224)	Y Q D T S K Y N V R H L M P Q *	(238)
901	TGTTGGATTTTACCTCTCTGCAGGCTTTTACATTTACCTTTTATCCTTATATTTTCCTA	960
961	AAGGTAATTTGTTAGATGAGTAAGCAAGATACCATTGTCGTCATTGGTTGGCTTCA	1020
1021	GTAGAATGAAACGTGAAGAAATTCATTTGATAACTGCTATTCATTTAACTTTTCTCATT	1080
1081	ATCAGTACCACGGTTCCTCAAAGTTTGTGAATAAGCAACTTTTGTAGATGCTGTTTC	1140
1141	ATACAGCACTTAGATGAATTATTGATCTTCTTAATATCAGGCGCTACTTAACTATGGT	1200
1201	ATGTACTTTTTGTAAGTTGTAACCTGAAATTTTCAGATGCTTTGAACTTGACACATACTC	1260
1261	TAGCAATTCATTGGAACACCAAGGCAAAAACCAACCTGCTAAAAGAGATCTTTTCATT	1320
1321	TTTCTTATTTTCAGCTTTAAACTTAGCTGTCGTTTCAGTTAAGCTTAAAGATAGGTTAAT	1380
1381	TTGTAATGGCAAAGTTTGTGTTGAGGTTTTTCTCAATAACTGTTTCCCAGGCTATT	1440
1441	AGGCCATCTCTAAAATGATCTAGCTGTTTTATTTTTATGTACTCTTAGTTTTATGTAAG	1500
1501	AAACCTTAGGATGAGCTCCCTTTTCTAAGGTGTTTTGTTTTTGTATGTTTGTCTTTTTT	1560
1561	CCTGTTTTTTGTTTTTCCATTTACGGCAGTGTACCATGTTTTGGATGTTGATGTTTA	1620
1621	TATGGGAGAACAAAAGCTGATGTATAGCCCTGTATACAGTGTAGATACTATTTTGTAA	1680
1681	AAACACAAGGCTAAATTAATGAACAAGAATACTGAATATTTTCATCATTAAAAATT	1735

**Abbildung 4-1: Die cDNA-Sequenz von humanem SMNr<sub>p</sub>.** Unter der cDNA-Sequenz (Nucleotidpositionen: Zahlen am Rand) ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (Zahlen in Klammern) angegeben. Start- und Stopcodon sind grau hinterlegt. Das *in-frame*-Stopcodon in der 5'-UTR ist mit einer Wellenlinie gekennzeichnet. Die Position der Tudor-Domäne ist durch durchgezogene Unterstreichung, die des putativen Kernlokalisierungssignals durch unterbrochene Unterstreichung angegeben. Ein mögliches Polyadenylierungssignal in der 3'-UTR ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Zur genaueren Analyse der Homologie zwischen SMNr<sub>p</sub> und SMN wurden die Aminosäure-Sequenzen beider Proteine mit dem Programm „GAP“ (Genetics Computer Group, Inc.) verglichen. Dabei ergab sich, dass eine signifikante Ähnlichkeit im mittleren Abschnitt der

beiden Proteine, im Bereich der Tudor-Domänen, besteht (siehe Abbildung 4-2). Hier sind die beiden Proteine zu 41 % identisch und zu 47 % ähnlich im Sinne konservativer Aminosäure-Substitutionen (verglichen sind SMN<sub>70-127</sub> mit SMN<sub>90-148</sub>). Die N- und C-terminalen Abschnitte sind dagegen weniger stark konserviert. Über die komplette Länge beider Proteine beträgt die Aminosäure-Identität noch 20 %, die Ähnlichkeit 25 %.

SMNrp	1	MSEDLAKQLASYKAQLQQ	18
SMN	1	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRTGQSDSDIWDDTALIK	42
SMNrp	19	VEAALSGNGENEDLLKLLKDLQEVIELTKDLLSTQFSETLAS	60
SMN	43	YDKAVA---SFKHALK-NGDICTETSGKPKTTPKRKPAKKNKS	80
SMNrp	61	SDSFASTQPTHSWKVGDKCMVWSEDCQCYEAEIEEIDEENG	102
SMN	81	QKKNTAAS-LQQWKVGDKCSAIWSEDCIYPATIASIDFKRE	122
SMNrp	103	TAAITFAGYGNAEVTPLLN-LKPVEEGRKAKEDSGNKPMSSK	143
SMN	123	TCVVVYTYGYNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENES	164
SMNrp	144	EMIAQQREYKKKKALKKKAQRITKELEQEREDQKVKWQXFNNRA	185
SMN	165	QVSTDESENSRSPG-NKSDNIKPKSAPWNSFLPPPPMPGPR	205
SMNrp	186	YSKNKKGQVKRSIFASPEVSTGKVGVTCTGIADKPMYQYQDT	227
SMN	206	LGPGKPKGLKFNG--PPPPPPPPHLLSCWLPFPFSGPPIIP	245
SMNrp	228	SKYNVRLMPQ	238
SMN	246	PPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGYMGMF (+14)	295

Abbildung 4-2: SMNrp ist über die Tudor-Domäne homolog zu SMN. Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von humanem SMNrp und humanem SMN. Der Vergleich wurde mit dem Programm „GAP“ (Fa. Genetics Computer Group) erstellt. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt dargestellt.

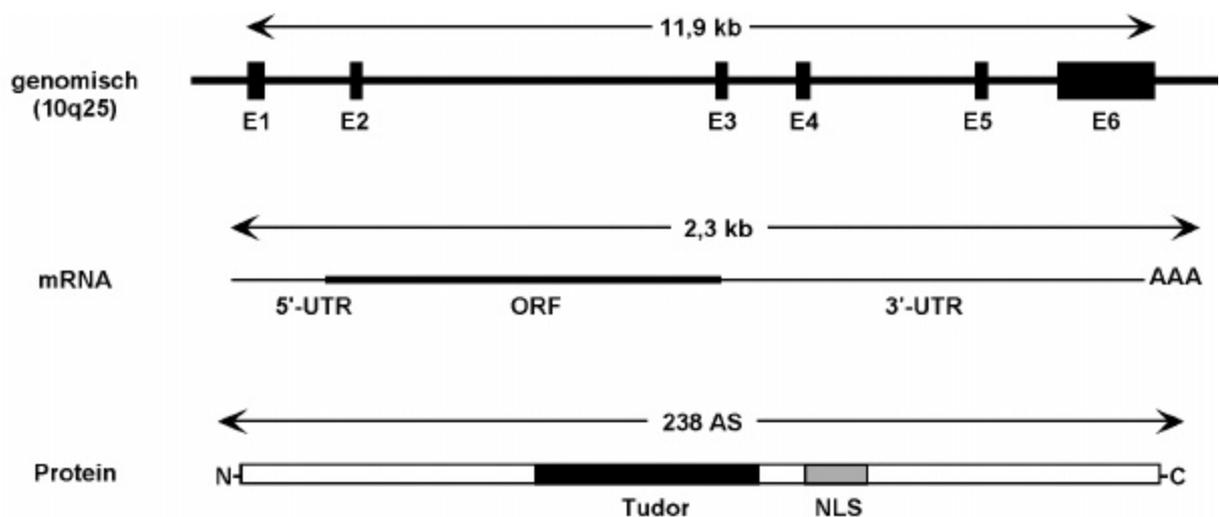


Abbildung 4-3: Genomische, mRNA- und Proteinstruktur von SMNrp. Der obere Balken zeigt schematisch die relativen Längen und die Verteilung der Exons (E1 bis E6) im humanen SMNrp-Gen. In der Mitte ist die SMNrp-mRNA mit 5'- und 3'-UTR und dem offen Leseraster (ORF) dargestellt. Der untere Balken zeigt die Primärstruktur des SMNrp-Proteins mit den relativen Positionen der Tudor-Domäne und des Kernlokalisierungssignals (NLS).

Weitere BLAST-Sequenzvergleiche in genomischen Datenbanken ergaben, dass SMNr<sub>p</sub> von sechs Exons codiert wird, die sich über einen knapp 12 kb langen genomischen Abschnitt auf Chromosom 10 im Abschnitt 10q25 verteilen (siehe Abbildung 4-3; Homo sapiens chromosome 10 working draft sequence segment, *GenBank-Accession*: NT\_030081.2). Die exonischen Sequenzen sind von unterschiedlich langen Introns mit klassischen Introngrenzen unterbrochen. Wie im Northernblot beobachtet, ist das Transkript nach Spleißen und Polyadenylierung noch 2,3 kb groß (vgl. Abbildung 4-5, Seite 63).

H.s.	1	MS-----EDIAKQIASYKAQLQC-----VEAALSCNGENEILLKLLKDLQEVITLTKDLLSTQPSK
D.m.	1	-----MADDLHNYKIQLOQC-----VEAALQTDPEEELLKLRSDLDEVITLTRDLIQIQLEK
C.e.	1	-----MEEELASYKIQLOQC-----VEAALLGDPTNVELLKLKEDLGEIISLQEDLAEITDKAE
A.t.	1	MVGGVEELSIEQLASSISTYKIQLEQNFVCGLEFRIGEELKLNVRQLLEDPRNSEYADMEKELKEVIALTEEVLAATAKQN
S.p.	1	-----MEKELFEYKSQLAL-----VQISLQKTEPQNEELQLIENDLKEIISLTENLLQESVEN
H.s.	57	TLASSSDS-----FAS-----TQETH--S-----WKVGDKCMVAVWSKEDGQCYE
D.m.	53	Q--NKSS-----VVE-----PSSTKRDSSNYFDEIEAALLEAEKLVSAAKIWKKGDKCOAKKEDRQYYD
C.e.	53	S--SERA-----VVA-----PQVTH--K-----WTVGERVLIAPHP--DGKKVF
A.t.	81	EISLSDAGVSAEATPGSPDLEGAWKGTGLRNDPTHEGK-----FPVGTKVQAVESDGDGEWYD
S.p.	53	DKNIFQNSQNGVAGFN-----SKPVHIDF-----TPGNLVMARWVSGDYLFYP
H.s.	92	ADIEEIDEENG--TAAITFAGYGNAEVTPILNLKPV-----EEGRKAKEKSGNKPMS-----KKEMIAQQR--
D.m.	111	ATLEDI--SSTG--EVNVIIDAYQNRSTTHVNELRERTIRNEVFPENKRHRPN-----QK-----
C.e.	85	ARTDSL--TPAG--VAITFTSTGKTIIVDPADLQLP-----PENQRKNYAFDNTKSAAGPSTQHGKKEWQA-EK--
A.t.	138	ATIEAH--TANG--YFVAYDEWGNKEEVDPPDNRVPI-----EONATVEAERLAQATK-----N-----
S.p.	97	SRTTAV--SGFCANKKYTVQFLDYVDIETVSLKHKAM-----PEEKROEIEGNKEILK-----KSTTIRSTPVRE
H.s.	151	-----EYKKKKALKKAQRI
D.m.	162	-----EYLLKRRKQKQKQRF
C.e.	149	-----ERRRQKALKKQKQKQ
A.t.	187	-----ALKRKIEKAASSDYQTKTLPKALKIDPNDPEDVKIAKRKKIHAFAKSKARF
S.p.	161	PTKAISVASMSTSPSNYASRASSPDMKSSAAVTANVSPIQNVAQHVSSTLPKISPIPPSNPPVPVSVSY-----SQKQKQKQ
H.s.	165	KELEQEEREDQKVKWQOQFNRRAYSKNKK---GQVKRSIFASPESVIGKVGVCCTGCIADKPMTOIQDTSKYNVRLMPQ--
D.m.	176	KDLEEEERESDKNKWLNFNKK--NQKKN---GNKARSIFASPDNVSGRVGVCCTGCTACKGMTDETIVGKRYRKL-----
C.e.	163	KELEDSIKDGEKKSQKFNFKANAKGLK---GLKKVSAICSSQDGSASSSSGGG---GKRRGTIVSSRSQFIFATRGAM
A.t.	237	EQLVQNKQNDWQOQFOTTKAKTKKVGFFTRKKESIFKSPEDPFGKVGVTG---SKRGLTDQKREKHLHLKSGNAEG
S.p.	236	LKPKAALFASONSQKQFAARGVKTGRVGRKKKIGESSIFKSTEDFPGRITNPKNFGNVARSGH---REKHIYNYREDEDS
H.s.	----	
D.m.	----	
C.e.	236	DSLFL
A.t.	314	TDE-
S.p.	312	----

**Abbildung 4-4: SMNr<sub>p</sub> ist ein bei Eukaryonten weit verbreitetes Protein.** Multipler Sequenzvergleich der SMNr<sub>p</sub>-Aminosäuresequenzen von Mensch (H.s., eigene Klonierung), *D. melanogaster* (D.m.: LD28068-Protein, *GenBank-Accession*: AAL28898), *C. elegans* (C.e.: hypothetisches Protein Y71D11A.2, *GenBank-Accession*: AAK85507), *A. thaliana* (A.t.: hypothetisches Protein, *GenBank-Accession*: NP\_178361) und *S. pombe* (S.p.: hypothetisches Protein SPCC1281.02c, *GenBank-Accession*: T40921). Der Vergleich wurde mit dem Programm „DIALIGN 2.1“ (Burkhard Morgenstern u.a., Universität Bielefeld, <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>) erstellt, die graphische Darstellung mit dem Programm „BOXSHADE 3.21“ (K. Hofmann und M. Baron, Swiss Institute of Bioinformatics, [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Identische Aminosäuren in drei oder mehr Sequenzen sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt.

#### 4.1.1.2 SMNr<sub>p</sub> ist ein entwicklungsgeschichtlich altes Protein

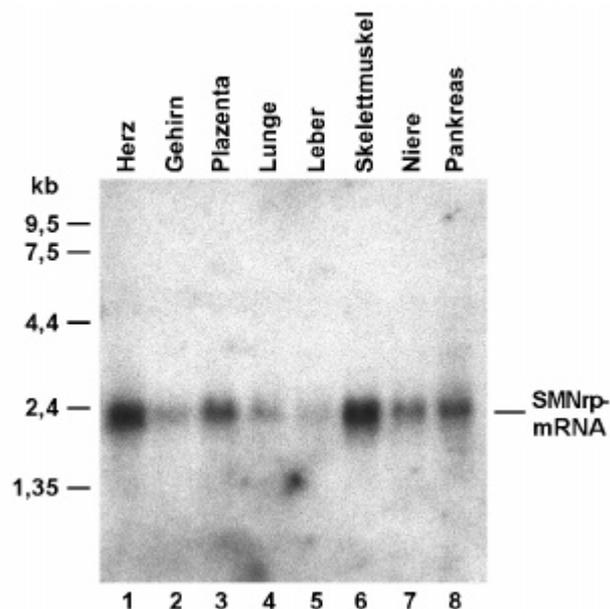
Um festzustellen, ob SMNr<sub>p</sub> ein rein humanes Protein ist, wurden weitere BLAST-Datenbanksuchen mit der Aminosäure-Sequenz durchgeführt. Dabei wurden nicht nur Homologe in *D. melanogaster* und *C. elegans* entdeckt, erstaunlicherweise kommt SMNr<sub>p</sub>

sogar in entwicklungsgeschichtlich weit entfernten Organismen wie in der Spaltheefe *S. pombe* oder der Pflanze *A. thaliana* vor. Die Aminosäure-Sequenz ist dabei über die gesamte Länge stark konserviert, alle Homologe besitzen eine Tudor-Domäne (siehe Abbildung 4-4). SMNrp ist demnach ein offenbar in der frühen Entwicklungsgeschichte der Eukaryonten, noch vor der Trennung von Pflanzen, Pilzen und Tieren entstandenes Gen. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* lassen sich dagegen, wie auch für SMN, keine SMNrp-homologen Sequenzen finden.

#### 4.1.2 SMNrp wird ubiquitär transkribiert und codiert für ein Kernprotein

##### 4.1.2.1 Das SMNrp-Gen wird in allen Geweben transkribiert

Bei der Analyse eines Gens kann das Expressionsmuster erste Hinweise auf eine mögliche gewebespezifische Funktion des codierten Proteins geben. Daher wurde nach den reinen Sequenzanalysen nun die Expression des SMNrp-Gens im Menschen untersucht. Es wurde eine Northernblot-Membran, auf der definierte Mengen poly(A)-RNA aus acht verschiedenen menschlichen Geweben aufgetragen sind (*Multiple Tissue Northern Blot*, Fa. Clontech), mit radioaktiv markierter SMNrp-cDNA als Sonde hybridisiert. Es zeigte sich, dass SMNrp in allen untersuchten Geweben als 2,3 kb große mRNA exprimiert wird (siehe Abbildung 4-5). Da in allen Fällen nur eine einzelne Bande beobachtet wurde, gibt es keine Hinweise auf alternativ gespleißte Varianten von SMNrp.



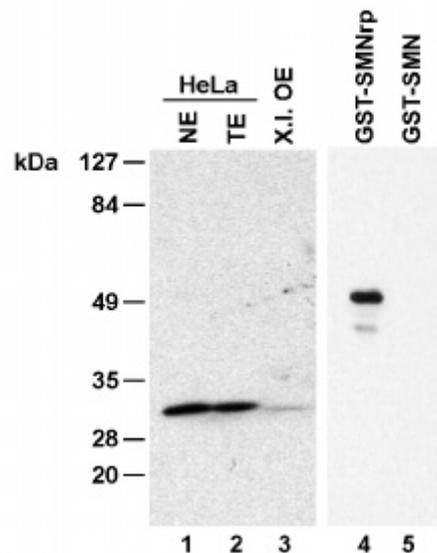
**Abbildung 4-5:** SMNrp ist ein ubiquitär exprimiertes Gen. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines *Multiple Tissue Northern Blots* (Fa. Clontech), der mit radioaktiv markierter SMNrp-cDNA als Sonde hybridisiert wurde. Jede Spur des Blots enthält 2 µg poly(A)-RNA der angegebenen humanen Gewebe. Ein RNA-Längenstandard ist an der Seite angegeben.

Vergleicht man die Intensitäten der SMNrp-Signale im Northernblot, erscheint die Expression in den Muskelgeweben (Herz und Skelettmuskel, Spur 1 und 6) am höchsten. SMNrp ist allerdings kein gewebespezifisch exprimiertes Gen. Das Expressionsmuster legt vielmehr nahe, dass es in allen Geweben, also ubiquitär exprimiert wird. Daraus, wie auch aus der Tatsache, dass SMNrp in weit verwandten Organismen vorkommt, kann man schließen, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit ein sog. *housekeeping*-Gen ist, also ein Gen, das eine grundsätzliche Funktion im Zellstoffwechsel erfüllt.

#### 4.1.2.2 Herstellung eines SMNrp-spezifischen Antiserums

Wie in der Einleitung beschrieben, zeigt SMN eine ungewöhnliche zelluläre Lokalisation. Das Protein ist einerseits diffus im Cytoplasma verteilt, andererseits ist es im Zellkern in diskreten Foci, sogenannten *coiled bodies / gems* konzentriert (vgl. Abbildung 1-3, Seite 18). Entsprechend werden auch unterschiedliche Aufgaben der beiden SMN-Pools in der Zelle diskutiert (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Aufgrund seiner Homologie zu SMN war es daher interessant zu untersuchen, ob auch für SMNrp eine ähnliche intrazelluläre Verteilung beobachtet werden kann. Für das Protein schien dabei zumindest eine Lokalisation im Zellkern wahrscheinlich, da bei den Sequenzanalysen ein putatives Kernlokalisierungssignal gefunden worden war.

Um seine Lokalisation durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestimmen zu können, wurde zunächst ein spezifisches Antiserum gegen SMNrp hergestellt. Dazu wurde die codierende Sequenz in den Vektor pET28a kloniert und das Protein in *E. coli* mit einem N-terminalen Histidin-tag exprimiert (His-SMNrp). Nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose wurde mit dem Protein ein Kaninchen immunisiert. Das Antiserum wurde durch Affinitätschromatographie an einer GST-SMNrp-Säule aufgereinigt und seine Spezifität im Westernblot bestimmt (siehe Abbildung 4-6): In Kern- und Gesamtzellextrakt aus HeLa-Zellen wird hochspezifisch ein etwa 30 kDa großes Protein detektiert. Die beobachtete Größe entspricht dem nach der Aminosäure-Sequenz errechneten Molekulargewicht von SMNrp. Darüberhinaus wird SMNrp auch in Extrakten aus *X. laevis* Oocyten erkannt. Das Antiserum ist spezifisch für SMNrp, das homologe SMN-Protein wird nicht detektiert (getestet mit GST-Fusionsproteinen, siehe Spur 4 und 5). Das so hergestellte, affinitätsgereinigte Kaninchen-Antiserum wird im folgenden nur noch mit „anti-SMNrp“ bezeichnet.

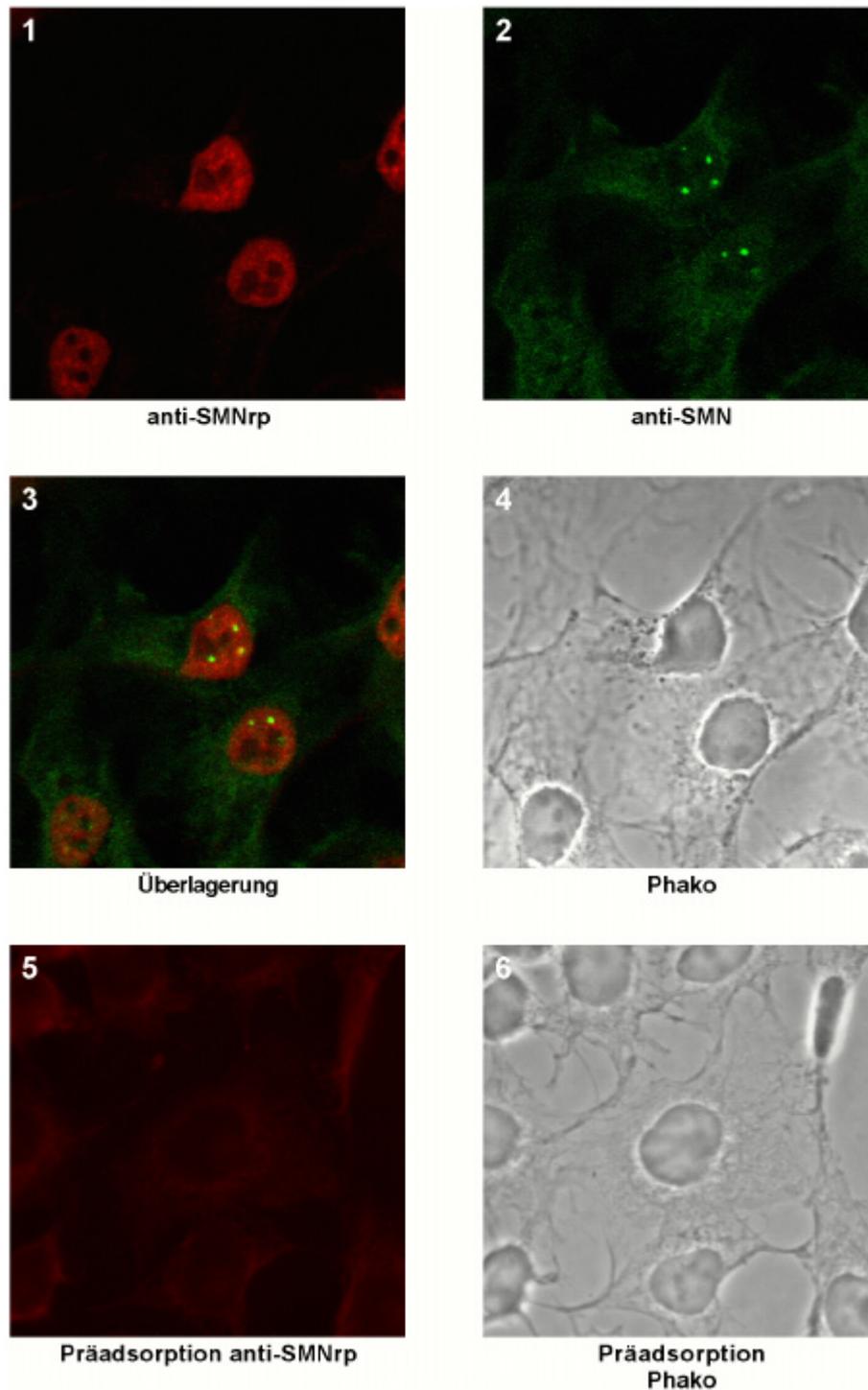


**Abbildung 4-6:** Ein Antiserum erkennt hochspezifisch SMNrp in Extrakten aus HeLa-Zellen und *Xenopus-Oocyten*. Westernblot mit einem SMNrp-spezifischem Kaninchen-Antiserum. 1: Kernextrakt aus HeLa-Zellen. 2: Gesamtzellextrakt aus HeLa-Zellen. 3: Gesamtzellextrakt aus *X. laevis* Oocyten. 4: rekombinant exprimiertes GST-SMNrp. 5: rekombinant exprimiertes GST-SMN. Ein Molekulargewichtstandard ist an der Seite angegeben.

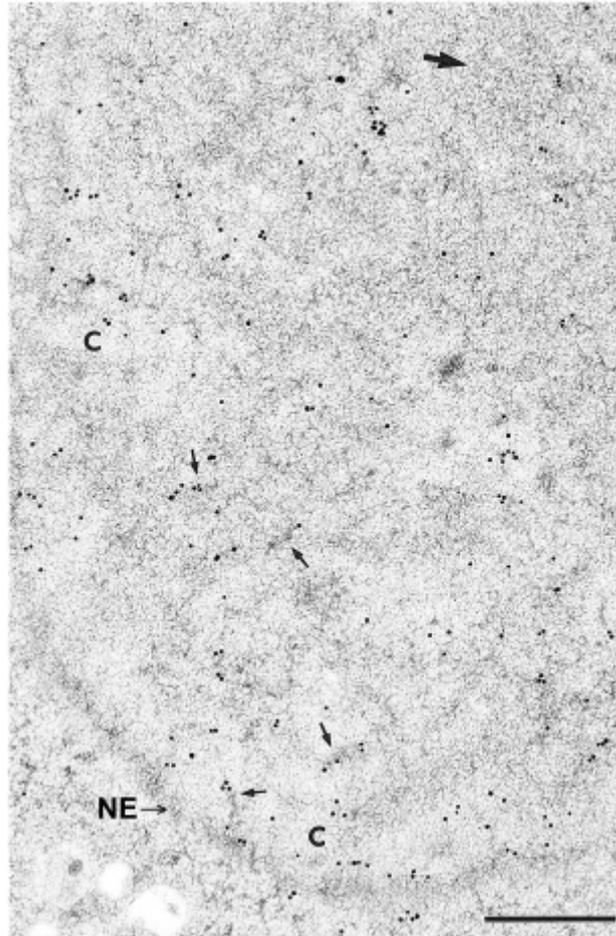
#### 4.1.2.3 SMNrp lokalisiert im Zellkern

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von SMNrp wurden COS-1-Zellen mit anti-SMNrp markiert und konfokal mikroskopiert. Zum Vergleich der intrazellulären Verteilung waren die Zellen gleichzeitig mit einem monoklonalen, SMN-spezifischen Antikörper markiert. Es wurde deutlich, dass SMNrp – im Gegensatz zu SMN – ein reines Zellkernprotein ist (siehe Abbildung 4-7, Bild 1 bis 3). Seine intranukleäre Verteilung ist dabei diffus und spart die Nucleoli aus. Als Spezifitätskontrolle wurde der Antikörper mit einem Überschuss an His-SMNrp vorinkubiert, was zu einer fast vollständigen Reduktion des beobachteten Signals führte (Bild 5).

Das diffuse SMNrp-Signal im Zellkern bei der Fluoreszenzmikroskopie konnte keine weiteren Hinweise auf eine Funktion des Proteins geben. Daher wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Stanislav Fakan (Universität Lausanne, Schweiz) die Ultrastruktur der intranukleären Verteilung von SMNrp analysiert. Ultradünnschnitte cryofixierter HTC-Zellen (Ratten-Hepatomezellen) wurden mit anti-SMNrp markiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Interessanterweise wurden SMNrp-Signale dabei hauptsächlich an Perichromatinfibrillen gefunden. Diese subnukleären Strukturen gelten als Bereiche, an denen Transkription und prä-mRNA-Spleißen stattfinden (Fakan, 1994; Puvion und Puvion-Dutilleul, 1996). Dagegen ist nur wenig SMNrp in Bereichen von kondensiertem Chromatin oder von Interchromatingranula-Clustern lokalisiert.



**Abbildung 4-7: SMNrp ist ein Kernprotein.** Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit COS-1-Zellen (Falschfarbendarstellung). 1: Markierung mit anti-SMNrp. 2: Markierung derselben Zellen mit anti-SMN. 3: Überlagerung der Bilder 1 und 2. 4: Phasenkontrastaufnahme zu Bild 1-3. 5: Markierung mit anti-SMNrp nach Präadsorption mit His-SMNrp. 6: Phasenkontrastaufnahme zu 5.



**Abbildung 4-8: SMNrp lokalisiert an Perichromatinfibrillen, den transkriptions- und spleißaktiven Bereichen im Nucleoplasma.** Immunlokalisierung von SMNrp im Zellkern eines Ultradünnschnitts aus HTC-Zellen durch Transmissions-Elektronenmikroskopie. Einige Perichromatinfibrillen sind mit kleinen Pfeilen markiert. Der große Pfeil zeigt ein Interchromatingranula-Cluster. C: kondensiertes Chromatin. NE: Kernmembran. Der Balken entspricht 0,5  $\mu\text{m}$ . (Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Prof. Stanislav Fakan, Universität Lausanne, Schweiz, zur Verfügung gestellt.)

### **4.1.3 SMNrp ist ein Aktivator der Histon-Acetyltransferase GCN5-S**

#### **4.1.3.1 Suche nach Interaktionspartnern durch *Two-Hybrid-Screen***

Die Lokalisation von SMNrp an Perichromatinfibrillen ließ vermuten, dass das Protein eine Funktion in Zellkernprozessen wie Transkription oder Spleißen besitzt. Um weitere Hinweise zu erhalten, wurde als Nächstes versucht, Interaktionspartner des Proteins zu finden. Dazu wurde das hefegenetische Screening-Verfahren *Two-Hybrid-Screen* verwendet. SMNrp wurde in den Vektor pAS2-1 kloniert und mit diesem *Bait*-Konstrukt eine humane, aus Gehirngewebe stammende cDNA-Bank nach Bindungspartnern durchsucht. Mit diesem Verfahren wurden 51 positive Klone isoliert, die cDNA-Sequenzen verschiedener potentieller Interaktionspartner von SMNrp enthielten (siehe Tabelle 4-1). Das stärkste Signal wurde für die Histon-Acetyltransferase GCN5-S (*Genbank-Accession*: U57316) gefunden. Das Protein

war im Screen von sechs unabhängigen cDNAs repräsentiert. Andere gefundene Bindungskandidaten von SMNrp waren TAXREB107 (*Genbank-Accession*: D17554), das *Jun activation domain binding protein* (*Genbank-Accession*: U65928) und das  *$\alpha$ -fetoprotein enhancer binding protein* (*Genbank-Accession*: A41948), denen eine Funktion bei der Transkriptionsaktivierung zugesprochen wird, sowie der Spleißregulator Transformer-2 $\alpha$  (*Genbank-Accession*: U53209).

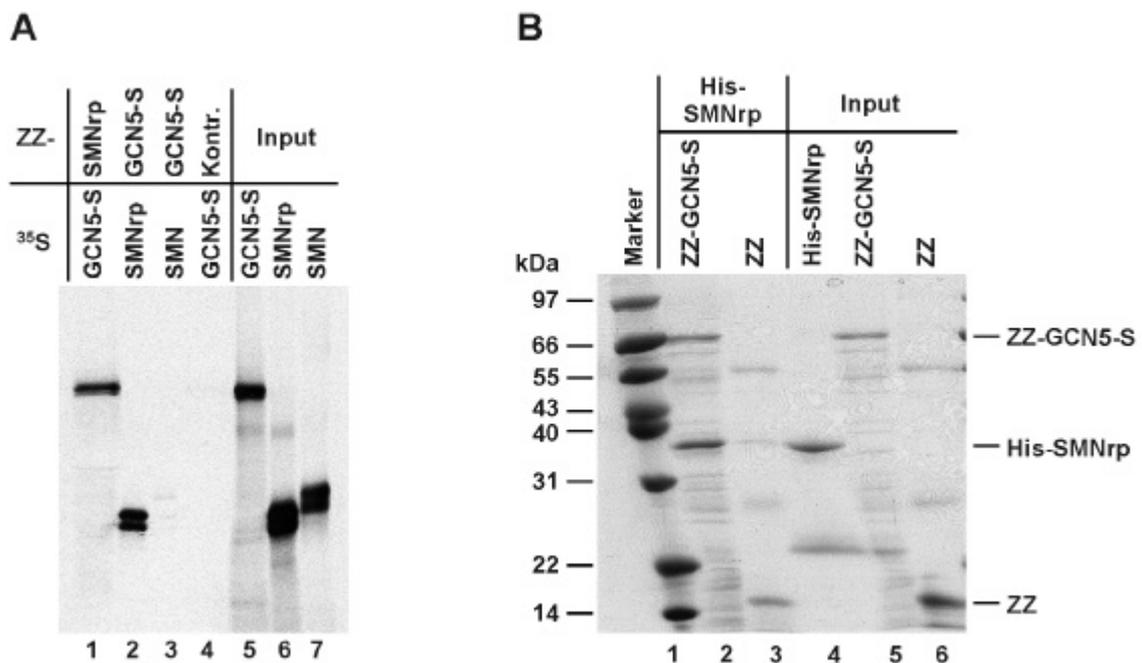
Interaktionspartner im <i>Two-Hybrid-Screen</i>	b-Galaktosidase-Test
GCN5-S (U57316)	++
TAXREB107 (D17554)	+
Jun activation domain binding protein (U65928)	+
$\alpha$ -Fetoprotein enhancer binding protein (A41948)	+
Transformer-2 $\alpha$ (U53209)	+
pACT2 (Vektorkontrolle)	-

**Tabelle 4-1: GCN5-S ist ein starker Interaktor von SMNrp im Two-Hybrid-Screen.** Die Tabelle fasst die im *Two-Hybrid-Screen* identifizierten, potentiellen Interaktionspartner von SMNrp zusammen. In Klammern sind die *Genbank-Accession*-Nummern der einzelnen Klone angegeben. Die rechte Spalte gibt die relative Stärke der Blaufärbung im „ $\beta$ -Gal-Filter-Lift-Assay“ als Maß für die Stärke der SMNrp-Interaktion wieder. pACT2 ist der leere Vektor, in den die im Screen verwendete cDNA-Bank konstruiert war (Negativkontrolle).

#### 4.1.3.2 SMNrp bindet direkt an GCN5-S

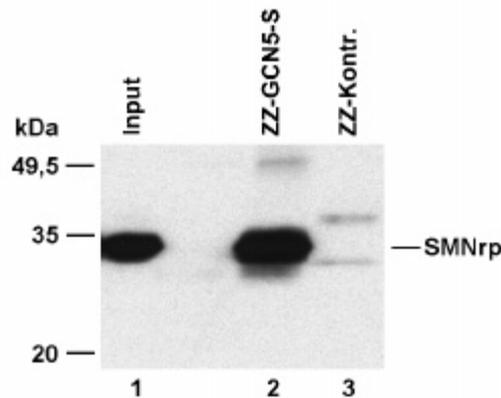
Im *Two-Hybrid-Screen* wurde die Histon-Acetyltransferase GCN5-S als putativer, starker Interaktor von SMNrp identifiziert. Durch PCR wurde daher die codierende Sequenz aus einer humanen cDNA-Bank („Marathon human fetal brain cDNA“, Fa. Clontech) amplifiziert und für weitere Studien in verschiedene Vektoren kloniert. Ein erstes Bindungsexperiment sollte *in vitro* die Interaktion von GCN5-S mit SMNrp bestätigen. Dazu waren die cDNAs beider Proteine zunächst in den Vektor pET21a-zz kloniert und in *E. coli* exprimiert worden. Die dadurch am N-Terminus jeweils mit einem ZZ-tag (zwei Ig-bindenden Domänen von Protein A aus *Staphylococcus aureus*) versehenen Proteine können an IgG-Sepharose immobilisiert werden. Zum Bindungstest wurden sie mit *in-vitro*-translatierten, radioaktiv markierten Proteinen inkubiert. In diesem Experiment konnte *in-vitro*-translatiertes GCN5-S an immobilisiertes ZZ-SMNrp gebunden werden und umgekehrt (siehe Abbildung 4-9A, Spur 1 und 2). Im Gegensatz dazu bindet SMN nicht an ZZ-GCN5-S (Spur 3), die SMNrp-GCN5-S-Interaktion ist also spezifisch. Ebenso binden SMNrp- (nicht gezeigt) oder GCN5-S-

Translat (Spur 4) nicht an das ZZ-Peptid alleine. Da für die Herstellung der Translate Reticulocytenslysate verwendet wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass darin enthaltenen (*Linker-*) Proteine die Bindung von SMNrp an GCN5-S vermitteln. Daher wurde nun die Wechselwirkung mit rekombinant exprimierten und gereinigten Proteinen untersucht. Auch hier konnte His-SMNrp an immobilisiertes ZZ-GCN5-S gebunden werden (siehe Abbildung 4-9B, Spur 2). Die Bindung der beiden Proteinen erfolgt also offensichtlich direkt.



**Abbildung 4-9: GCN5-S bindet in vitro direkt an SMNrp.** **A:** Autoradiographie eines Bindungsexperiments mit *in-vitro*-translatierten Proteinen. ZZ-SMNrp (Spur 1), ZZ-GCN5-S (Spur 2 und 3) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 4) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in-vitro*-translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten Proteinen inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde mit Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Spur 5, 6 und 7 zeigen 20% der jeweils eingesetzten Translate. **B:** Bindungsexperiment mit rekombinant exprimierten Proteinen. ZZ-GCN5-S (Spur 2) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 3) wurden immobilisiert und mit His-SMNrp inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Proteine mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Spur 4, 5 und 6 zeigen 10% der eingesetzten Proteine, Spur 1 einen Molekulargewichtstandard.

Das folgende Experiment sollte überprüfen, ob die *in vitro* beobachtete Interaktion auch *in vivo* relevant ist. Dazu wurde ZZ-GCN5-S immobilisiert und mit Gesamtzellextrakt aus HeLa-Zellen inkubiert. Durch Westernblot mit anti-SMNrp konnte nachgewiesen werden, dass das SMNrp aus dem Extrakt spezifisch an GCN5-S gebunden hatte (siehe Abbildung 4-10). Die Tatsache, dass beide Proteine im Zellextrakt aneinander binden, deutet darauf hin, dass eine Wechselwirkung auch real in der Zelle stattfindet.



**Abbildung 4-10:** SMNrp aus HeLa-Zellextrakt interagiert spezifisch mit GCN5-S. ZZ-GCN5-S (Spur 2) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 3) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit HeLa-Gesamtzellextrakt inkubiert. Nach Elution mit Probenpuffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. SMNrp ist durch Westernblot mit anti-SMNrp sichtbar gemacht. Spur 1 zeigt 10 % des eingesetzten Extrakts.

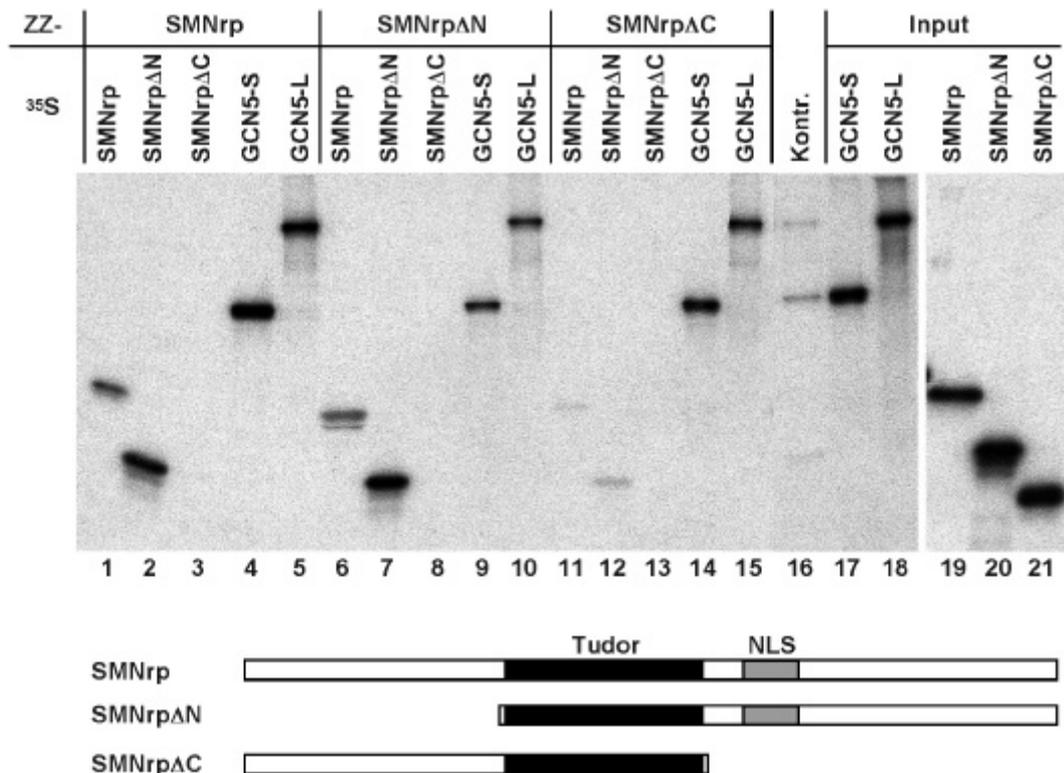
#### 4.1.3.3 Die Tudor-Domäne von SMNrp ist für die Bindung an GCN5-S wichtig

Als Nächstes wurde untersucht, welche Domäne von SMNrp die Bindung an GCN5-S vermittelt. Dazu wurden durch PCR zwei Deletionskonstrukte hergestellt: SMNrp $\Delta$ C, das aus dem N-terminalen Abschnitt und der Tudor-Domäne von SMNrp besteht (Met<sub>1</sub> bis Asp<sub>134</sub>), und SMNrp $\Delta$ N, das die Tudor-Domäne und den C-terminalen Abschnitt umfasst (Thr<sub>70</sub> bis Gln<sub>238</sub>).

Für die Histon-Acetyltransferase GCN5 sind zwei unterschiedlich große Spleiß-Isoformen im Menschen bekannt (Smith *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). Als SMNrp-interagierendes Protein wurde im *Two-Hybrid-Screen* GCN5-S, die kurze Variante, identifiziert und weiter untersucht. Für die folgende Bindungsstudie wurde nun auch GCN5-L, die am N-Terminus um 360 Aminosäuren längere Variante der Histon-Acetyltransferase, kloniert.

Alle Proteine wurden in *E. coli* mit ZZ-tag exprimiert oder durch *in-vitro*-Translation radioaktiv markiert. Damit wurden Bindungsexperimente, wie im letzten Kapitel beschrieben, durchgeführt (siehe Abbildung 4-11). Es zeigte sich erstens, dass SMNrp mit sich selbst interagiert. Dies konnte mit SMNrp voller Länge (Spur 1) und der Deletionsmutante SMNrp $\Delta$ N (Spur 2, 6 und 7), nicht aber mit SMNrp $\Delta$ C (Spur 3, 8 und 11-13) beobachtet werden. Demnach ist der C-terminale Abschnitt von SMNrp für die Di- oder Oligomerisierung des Proteins notwendig. Zum zweiten wurde gezeigt, dass nicht nur GCN5-S sondern auch die längere Isoform GCN5-L mit SMNrp interagieren kann (Spur 4 und 5). Da sowohl SMNrp $\Delta$ N (Spur 9 und 10) als auch SMNrp $\Delta$ C (Spur 14 und 15) an die

GCN5-Konstrukte binden können, wird diese Wechselwirkung mit GCN5 sehr wahrscheinlich über die Tudor-Domäne von SMNr<sub>p</sub> vermittelt.

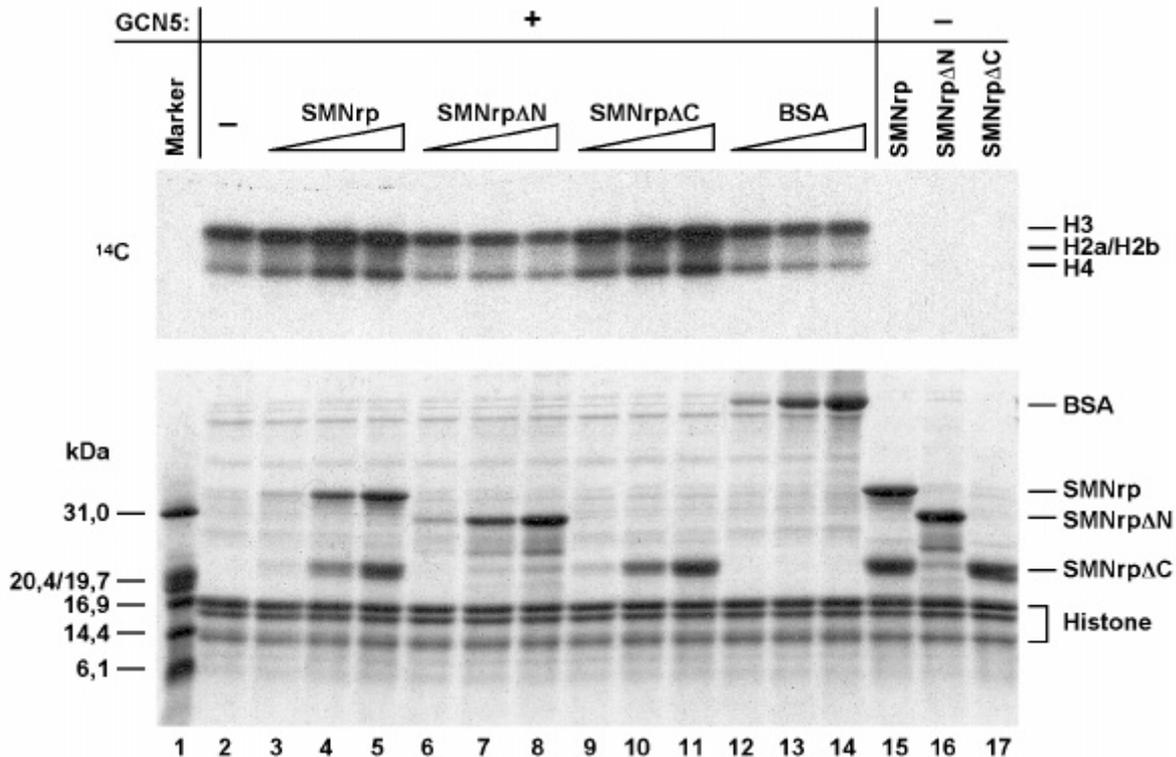


**Abbildung 4-11: Unterschiedliche Domänen von SMNr<sub>p</sub> vermitteln die Dimerisierung und GCN5-Bindung.**  
**Oben:** Autoradiographie eines Bindungsexperiments mit *in-vitro*-translatierten Proteinen. ZZ-SMNr<sub>p</sub> (Spur 1 bis 5), ZZ-SMNr<sub>p</sub>ΔN (Spur 6 bis 10) oder ZZ-SMNr<sub>p</sub>ΔC (Spur 11 bis 15) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit den angegebenen, *in-vitro*-translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten Proteinen inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde mit Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das ZZ-Peptid mit einem Gemisch aller Translate getestet (Spur 16). Die Spuren 17 bis 21 zeigen je 20% der eingesetzten Translate.  
**Unten:** Die Balkendiagramme zeigen schematisch die Primärstruktur der getesteten Deletionsmutanten von SMNr<sub>p</sub> mit den Positionen der Tudor-Domäne und des Kernlokalisationssignal (NLS).

#### 4.1.3.4 Der GCN5-S-SMNr<sub>p</sub>-Komplex kann Nucleosomen acetylieren

Die Histon-Acetyltransferase GCN5-S kann *in vitro* freie Histone acetylieren, wenn Acetyl-CoA als Cosubstrat zur Verfügung steht. Interessanterweise werden „verpackte“ Histone in Nucleosomen, das eigentliche physiologische Substrat, unter denselben Bedingungen nicht modifiziert (Yang *et al.*, 1996). Aus der Hefe weiß man, dass GCN5, wie andere Histon-Acetyltransferasen auch, *in vivo* Teil großer makromolekularer Proteinkomplexe ist. Diese Komplexe vermitteln effizient und kontrolliert die Acetylierung von Histonen in Promotorbereichen von Genen und sind so an der Kontrolle der Transkription beteiligt. Einige Komponenten dieser Komplexe haben dabei vermutlich die Aufgabe, die Chromatinstruktur zu öffnen und so die nucleosomalen Histone für GCN5, die katalytische Aktivität des Komplexes, zugänglich zu machen (Grant *et al.*, 1998b). Im Gegensatz zur Hefe ist die

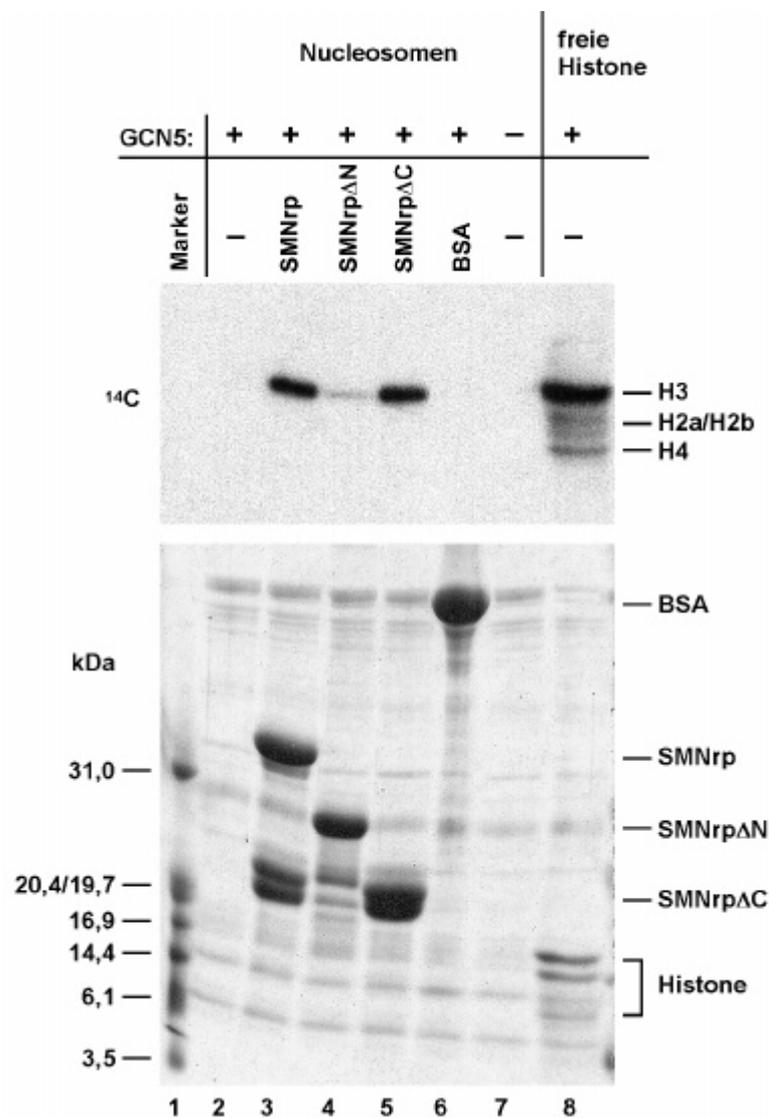
Zusammensetzung der humanen Histon-Acetyltransferase-Komplexe noch wenig bekannt. Aufgrund der Bindungsdaten schien es daher wahrscheinlich, dass das Kernprotein SMNr<sub>p</sub> Teil eines humanen GCN5-Komplexes ist.



**Abbildung 4-12: SMNr<sub>p</sub> stimuliert die Aktivität von GCN5-S an freien Histonen.** Es wurden 2 µg His-GCN5-S mit Reaktionspuffer (Spur 2) oder mit je 2, 10 und 20 µg His-SMNr<sub>p</sub> (Spur 3-5), His-SMNr<sub>p</sub>ΔN (Spur 6-8), His-SMNr<sub>p</sub>ΔC (Spur 9-11) oder BSA (Spur 12-14) präinkubiert. Zum Nachweis einer intrinsischen Histon-Acetyltransferase-Aktivität wurden 20 µg His-SMNr<sub>p</sub>, His-SMNr<sub>p</sub>ΔN oder His-SMNr<sub>p</sub>ΔC nur mit Reaktionspuffer präinkubiert (Spur 15-17). Anschließend wurden [<sup>14</sup>C]-Acetyl-CoA und freie Histone zugegeben. Nach Ende der Acetylierungsreaktion wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (unterer Teil). Der Nachweis acetylierter Histone erfolgte durch Autoradiographie (oberer Teil). Spur 1 zeigt einen Molekulargewichtsmarker.

Durch *in-vitro*-Acetylierungsexperimente sollte eine mögliche Funktion von SMNr<sub>p</sub> in diesem Zusammenhang untersucht werden. Zunächst wurde der Einfluss von SMNr<sub>p</sub> auf die katalytische Aktivität von GCN5-S an freien Histonen getestet. Dazu wurde gereinigtes His-GCN5-S zusammen mit freien Histonen aus Kalbsthymus und [<sup>14</sup>C]-Acetyl-CoA inkubiert. Die durch Acetylierung radioaktiv markierten Histone wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Wie erwartet, wurden die Histone H3 und H4, und schwächer auch H2a und H2b, effektiv durch GCN5-S modifiziert (siehe Abbildung 4-12, Spur 2). Bei einer Präinkubation von GCN5-S mit steigenden Mengen von His-SMNr<sub>p</sub> konnte eine bis zu zweifach verstärkte Histon-Acetylierung beobachtet werden (Spur 3-5). Dieser Effekt ist auf eine Stimulierung der Aktivität von GCN5-S zurückzuführen, da SMNr<sub>p</sub> alleine keine

intrinsische Histon-Acetyltransferase-Aktivität besitzt (Spur 15). Die Präinkubation von GCN5-S mit BSA in Kontrollreaktionen hatte keinen Effekt (Spur 12-14). Dies zeigt, dass die mit SMNr<sub>p</sub> beobachtete Aktivität spezifisch ist. Um die GCN5-stimulierende Aktivität von SMNr<sub>p</sub> genauer einzugrenzen, wurden auch die Deletionsmutanten SMNr<sub>p</sub> $\Delta$ N und SMNr<sub>p</sub> $\Delta$ C getestet. Hierbei zeigte sich, dass SMNr<sub>p</sub> $\Delta$ C den gleichen Effekt auf GCN5-S wie SMNr<sub>p</sub> voller Länge hatte (Spur 9-11). SMNr<sub>p</sub> $\Delta$ N verändert die Aktivität des Enzyms dagegen nicht (Spur 6-8). Offenbar ist also die N-terminale Domäne von SMNr<sub>p</sub> für die Stimulierung von GCN5-S verantwortlich.



**Abbildung 4-13: Der GCN5-S-SMNr<sub>p</sub>-Komplex kann Histon H3 in Nucleosomen acetylieren.** Es wurden 2  $\mu$ g His-GCN5-S mit Reaktionspuffer (Spur 2) oder mit je 20  $\mu$ g His-SMNr<sub>p</sub> (Spur 3), His-SMNr<sub>p</sub> $\Delta$ N (Spur 4), His-SMNr<sub>p</sub> $\Delta$ C (Spur 5) oder BSA (Spur 6) präinkubiert. Für die Acetylierungsreaktion wurden [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-CoA und *in-vitro*-rekonstituierte Nucleosomen (Spur 2-7) oder als Kontrolle freie Histone (Spur 8) zugegeben. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (unterer Teil). Der Nachweis acetylierter Histone erfolgte durch Autoradiographie (oberer Teil). Spur 1 zeigt einen Molekulargewichtsmarker.

Der Effekt von SMNrp auf die Aktivität von GCN5-S an freien Histonen ist zwar sichtbar, erscheint aber relativ gering, da schon das Enzym alleine die Acetylierung effizient katalysiert. Auf gleiche Art und Weise wurde nun die Reaktion an Histonen, die mit DNA in Nucleosomen eingebunden sind, untersucht. Dazu wurden statt freier Histone jetzt *in-vitro*-rekonstituierte Nucleosomen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Keiko Ikeda, Genzentrum der LMU München) als Substrat im Acetylierungsexperiment eingesetzt. Wie schon aus der Literatur bekannt war (Yang *et al.*, 1996), konnte GCN5-S alleine keine nucleosomalen Histone acetylieren (siehe Abbildung 4-13 oben, Spur 2). Erstaunlicherweise führte eine Präinkubation des Enzyms mit SMNrp dazu, dass eine Acetylierung nun sehr effizient stattfand (Spur 3). Im Gegensatz zur Reaktion an freien Histonen (Spur 8) wurde hier selektiv nur H3 acetyliert. Die Deletionsmutante SMNrp $\Delta$ C konnte die Reaktion in gleichem Maße wie SMNrp voller Länge aktivieren (Spur 5). SMNrp $\Delta$ N hat dagegen einen schwächeren, aber immer noch sichtbaren Effekt auf die katalytische Aktivität von GCN5-S (Spur 4). Dadurch wurde die schon mit freien Histonen gemachte Beobachtung bestätigt, dass die N-terminale Domäne von SMNrp eine wichtige Rolle bei der Stimulierung der GCN5-Aktivität spielt.

Die bisher gezeigten Daten lassen darauf schließen, dass das Kernprotein SMNrp ein Cofaktor der Histon-Acetyltransferase GCN5-S ist. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es die Aktivität des Enzyms deutlich moduliert. Während GCN5-S alleine nur freie Histone modifizieren kann, werden im Komplex mit SMNrp auch in Nucleosomen verpackte Histone, das natürlichen Substrat der Acetyltransferase, erkannt. SMNrp ist *in vivo* vermutlich eine für die Substraterkennung wichtige Komponente des humanen GCN5-Komplexes und damit an der Kontrolle der Transkription durch Histon-Acetylierung beteiligt. Im nun folgenden Kapitel wird eine weitere Funktion von SMNrp im Zellkern beschrieben.

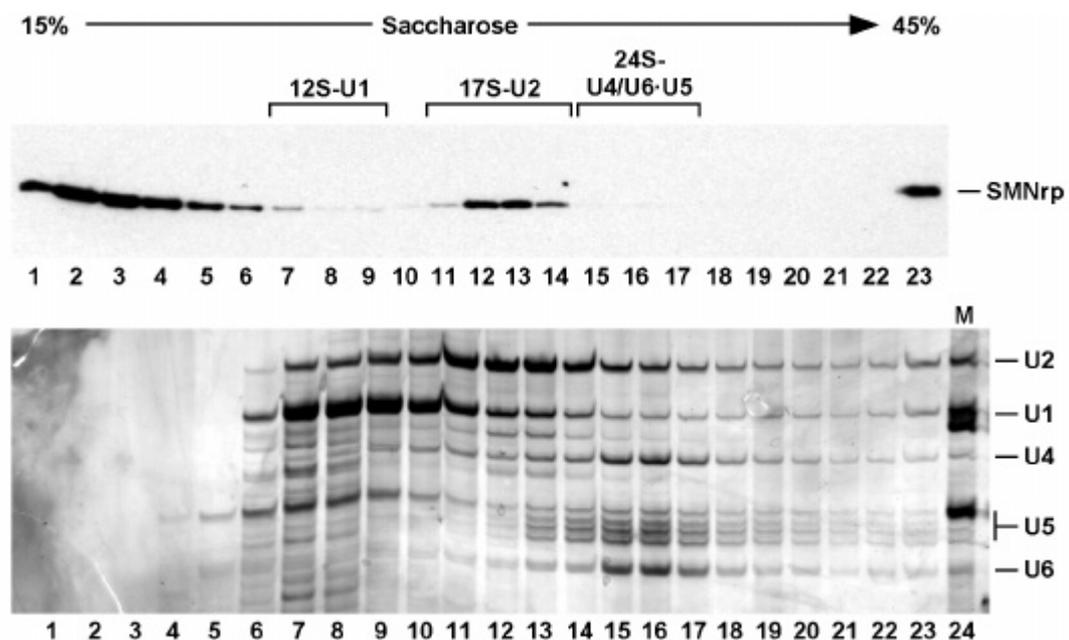
#### **4.1.4 SMNrp ist ein essentieller Spleißfaktor**

##### **4.1.4.1 SMNrp ist mit dem 17S-U2-snRNP assoziiert**

Während der Arbeit an diesem Projekt wurde SMNrp (bezeichnet als „SPF30“) bei der biochemischen Aufreinigung von Spleißosomen gefunden (Neubauer *et al.*, 1998). Dies war interessant, da SMNrp, wie oben gezeigt, im Zellkern an Perichromatinfibrillen gefunden wurde, also an Strukturen, die als aktive Bereiche der Transkription aber auch des Spleißprozesses gelten (Fakan, 1994; Puvion und Puvion-Dutilleul, 1996). Darüberhinaus scheint auch das verwandte Tudor-Domänen-Protein SMN eine wichtige Rolle beim

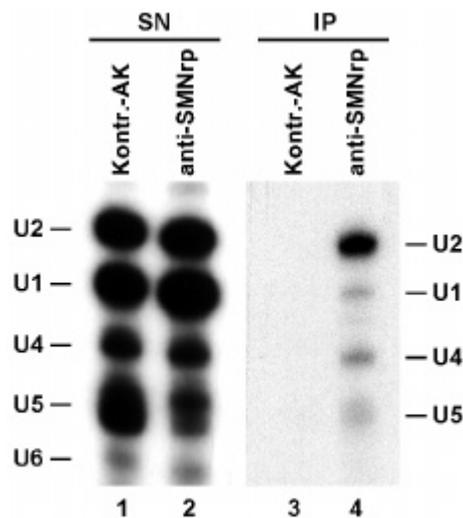
Spleißprozess zu spielen (siehe Kapitel 1.3.4). Im Folgenden wurde daher eine mögliche Beteiligung und Funktion von SMNrp beim prä-mRNA-Spleißen näher untersucht.

Zunächst sollte überprüft werden, ob SMNrp mit Spleißfaktoren wechselwirken kann. Sedimentationsanalysen gaben dabei erste Hinweise auf eine Assoziation des Proteins mit spleißosomalen snRNPs. In Kernextrakten aus HeLa-Zellen zeigen die verschiedenen snRNPs ein charakteristisches Sedimentationsverhalten. Durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation lassen sich das 12S-U1-snRNP, das 17S-U2-snRNP und das 24S-[U4/U6·U5]-tri-snRNP voneinander trennen (siehe Abbildung 4-14 unten). Die Untersuchung der Sedimentation von SMNrp bei dieser Ultrazentrifugation ergab, dass das Protein in drei verschiedenen Bereichen des Gradienten zu finden ist (siehe Abbildung 4-14 oben): im oberen Bereich, korrespondierend zu Sedimentationskoeffizienten von weniger als 6S (Spur 1-6), im 17S-Bereich (Spur 11-14) und in der Pellet-Fraktion am Boden des Gradienten (> 30S, Spur 23). Dieses Sedimentationsverhalten von SMNrp war sehr gut reproduzierbar, wobei die im 17S-Bereich gefundene Proteinmenge je nach Extraktpräparation zwischen 20 und 80 Prozent der Gesamtmenge an SMNrp betrug.



**Abbildung 4-14: SMNrp cosedimentiert mit dem 17S-U2-snRNP in HeLa-Zellkernextrakten.** Ein Kernextrakt aus HeLa-Zellen wurde durch Ultrazentrifugation über einen linearen 15- bis 45-prozentigen Saccharosegradienten aufgetrennt. **Oben:** Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und SMNrp durch Westernblot mit anti-SMNrp nachgewiesen. **Unten:** Die RNAs der Fraktionen wurden extrahiert, durch denaturierende PAGE aufgetrennt und über Silberfärbung sichtbar gemacht. Spur 24 zeigt einen snRNA-Größenstandard.

Die Sedimentation von SMNrp im 17S-Bereich der Gradienten ließ vermuten, dass das Protein mit dem U2-snRNP assoziiert sein könnte. Um genaueren Aufschluss darüber zu bekommen, wurde das Protein aus solchen, SMNrp-reichen 17S-Fractionen immunpräzipitiert. Zum Nachweis möglicherweise copräzipitierter snRNPs wurden die RNAs extrahiert und durch radioaktive Markierung am 3'-Ende sichtbar gemacht. Dabei wurde ein starkes U2-snRNA-Signal in der Immunpräzipitation mit anti-SMNrp gefunden, in einer Kontrollpräzipitation wurden dagegen keine RNAs markiert (siehe Abbildung 4-15). Durch diese Co-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass SMNrp in der Tat mit dem 17S-U2-snRNP assoziiert ist. Darüberhinaus wurden auch U1-, U4- und U5-snRNA schwach copräzipitiert.

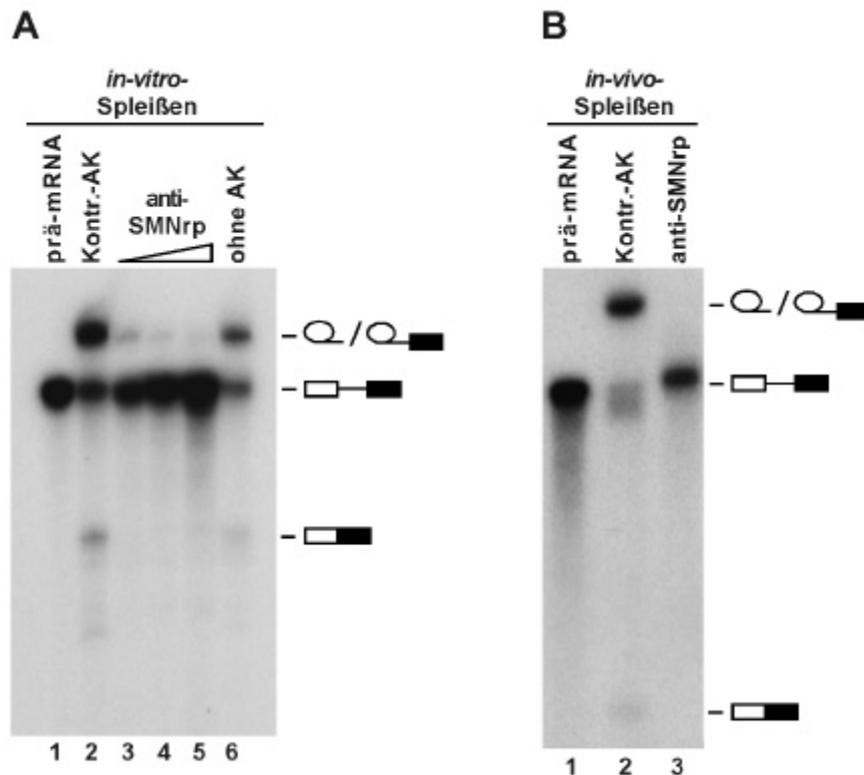


**Abbildung 4-15: SMNrp ist mit dem 17S-U2-snRNP assoziiert.** SMNrp-reiche Fractionen aus dem 17S-Bereich nach Dichtegradientenzentrifugation wie in Abbildung 4-14 wurden mit anti-SMNrp (Spur 4) oder einem Kontroll-Antikörper (Spur 3) immunpräzipitiert. Die RNAs aus den Präzipitaten (Spur 3 und 4) und aus 25 % der jeweiligen Überstände (Spur 1 und 2) wurden Phenol-extrahiert, mit [<sup>32</sup>P]-pCp radioaktiv markiert und durch denaturierende PAGE aufgetrennt. Sie wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### 4.1.4.2 Das Spleißen von prä-mRNA benötigt SMNrp

Die Bildung des Spleißosoms aus den snRNPs und der prä-mRNA ist ein schrittweise erfolgender Vorgang (siehe Abbildung 5-1, Seite 118). Hierbei wird zuerst das U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle (Exon1-Intron-Grenze) gebunden. Dies ist die Voraussetzung für die nachfolgende Bindung des U2-snRNPs an die Verzweigungsstelle im Intron, ein energieabhängiger Vorgang, der zur Bildung des sogenannten Prä-Spleißosoms führt. Als letzte Komponente wird das [U4/U6-U5]-tri-snRNP integriert und so das funktionelle „frühe Spleißosom“ gebildet, das nach Umlagerungen die zweischrittige Spleißreaktion katalysiert. In einer ersten Transesterifizierungsreaktion wird dabei die Verzweigungsstelle mit dem

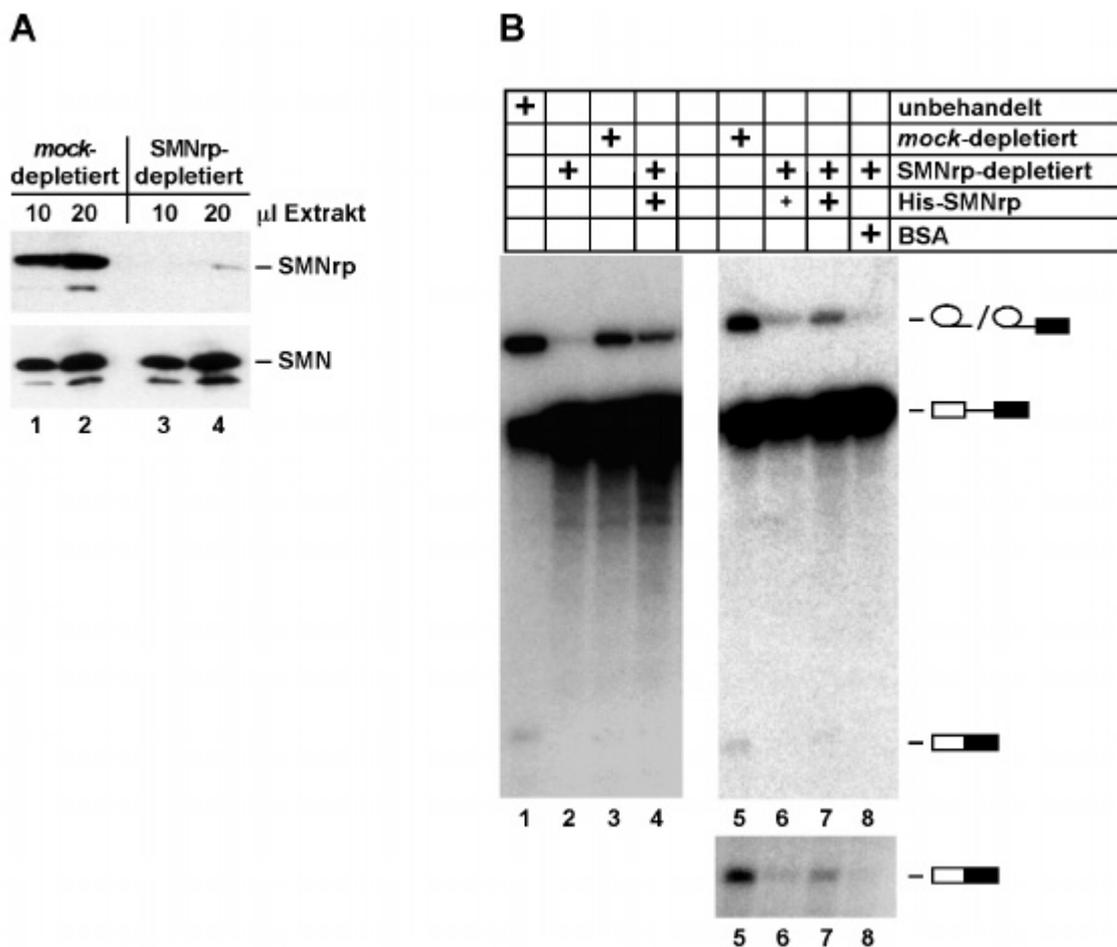
5'-Ende des Introns verknüpft. Dadurch entstehen das Exon1 und ein Intron-Exon2-Zwischenprodukt, die beide im „späten Spleißosom“ komplexiert bleiben. Im zweiten Trans-esterifizierungsschritt werden die beiden Exons miteinander ligiert. Nach dem Zerfall des Spleißosoms werden sie schließlich zusammen mit dem Lasso-förmigen Intron („Lariat“) freigesetzt (Burge *et al.*, 1999).



**Abbildung 4-16: Antikörper gegen SMNrp inhibieren das Spleißen von prä-mRNA in vitro und in vivo.** **A:** Autoradiographie eines *in-vitro*-Spleißexperiment. HeLa-Zellkernextrakt wurde mit 5 µg Kontroll-Antikörper (Spur 2) oder mit 1, 3 und 5 µg anti-SMNrp (Spur 3-5) präinkubiert. Zur Spleißreaktion wurde <sup>32</sup>P-markierte pAd48-prä-mRNA zugegeben. Die RNAs wurden extrahiert und durch denaturierende PAGE aufgetrennt. Spur 6 zeigt die Spleißreaktion in Abwesenheit von Antikörpern, Spur 1 das prä-mRNA-Transkript. Die Produkte der Spleißreaktionen sind am Rand schematisch wiedergegeben, von oben nach unten: Intron-Lariat / Intron-Exon2-Zwischenprodukt, prä-mRNA, gespleißte mRNA. **B:** Spleißexperiment in *X. laevis* Oocyten. <sup>32</sup>P-markierte pAd48-prä-mRNA wurde in Oocytenkerne injiziert, die mit 200 ng Kontroll-Antikörper (Spur 2) oder anti-SMNrp (Spur 3) präinjiziert waren. Nach 60 Minuten wurden die Kerne isoliert und die RNAs wie in A analysiert. Spur 1 zeigt die prä-mRNA.

Die Assoziation von SMNrp mit dem U2-snRNP deutete auf eine mögliche Funktion des Proteins beim prä-mRNA-Spleißen hin. Es war daher interessant zu untersuchen, ob SMNrp-spezifische Antikörper einen Einfluss auf die Spleißreaktion haben. In *in-vitro*-Experimenten wurden dazu spleißaktive HeLa-Zellkernextrakte mit radioaktiv markierter prä-mRNA inkubiert (siehe Abbildung 4-16A). Nach erfolgter Reaktion kann so neben der prä-mRNA das Auftreten der gespleißten mRNA, des Intron-Exon2-Zwischenprodukts und des Intron-Lariats beobachtet werden (Spur 6; die beiden letztgenannten RNAs laufen im verwendeten

Gelsystem auf gleicher Höhe, vgl. Fischer *et al.*, 1995). Die Zugabe steigender Mengen von anti-SMNrp in den Extrakt vor der Reaktion inhibierte die Bildung der Reaktionsprodukte (Spur 3-5). Das Fehlen des Intron-Exon2-Zwischenprodukts zeigt dabei an, dass schon der erste Transesterifizierungsschritt der Spleißreaktion nicht mehr stattfinden kann. Die Zugabe eines Kontroll-Antikörpers hatte dagegen keinen Effekt auf die Reaktion, die Inhibition durch anti-SMNrp ist also spezifisch (Spur 2). Als Nächstes wurde der Einfluss von anti-SMNrp auf das Spleißen *in vivo* untersucht. Dazu wurde die radiomarkierte prä-mRNA in Kerne von *X. laevis* Oocyten microinjiziert und das Spleißen wie vorher analysiert (siehe Abbildung 4-16B). Auch hier führte eine Präinjektion von anti-SMNrp in die Zellkerne zu einer Inhibition des Spleißvorgangs vor dem ersten Reaktionsschritt (Spur 3).



**Abbildung 4-17: Rekombinantes SMNrp rekonstituiert das Spleißen in immundepletierten Kernextrakten. A:** Westernblot-Analyse von SMNrp (oben) oder SMN als Kontrolle (unten) aus immundepletierten HeLa-Zellkernextrakten. Aufgetragen sind je 10 und 20 µl Extrakt nach Depletion mit anti-SMNrp (Spur 3 und 4) oder *mock*-Depletion (Spur 1 und 2). **B:** Autoradiographie von *in-vitro*-Spleißexperimenten. Mit Kernextrakten, die entweder anti-SMNrp-immundepletiert (Spur 2, 4 und 6-8), *mock*-depletiert (Spur 3 und 5) oder unbehandelt waren (Spur 1), wurde das Spleißen von pAd48-prä-mRNA wie in Abbildung 4-16A untersucht. Zur Rekonstitution der Spleißreaktion wurden den Ansätzen 1 µg (Spur 4 und 6) oder 5 µg (Spur 7) His-SMNrp oder als Kontrolle 5 µg BSA (Spur 8) zugegeben. Die Produkte der Spleißreaktionen sind am Rand wie in Abbildung 4-16 schematisch wiedergegeben. Der untere Teil von Spur 5-8 ist zusätzlich in einer längeren Exposition gezeigt, um das Produkt der Spleißreaktion besser sichtbar zu machen.

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mit anti-SMNrp legten nahe, dass SMNrp als U2-snRNP-assoziiertes Protein eine wichtige Funktion beim Spleißprozess erfüllt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Antikörper-Effekte indirekt sind (z.B. durch sterische Behinderung anderer Proteine in der Nähe von SMNrp) wurde das Spleißen in SMNrp-immundepletierten Extrakten untersucht. Dazu wurde HeLa-Kernextrakt über anti-SMNrp, gekoppelt an ProteinG-Sepharose, gegeben. Aus dem Extrakt wurden so über 95 % des endogenen SMNrp depletiert (gezeigt durch Westernblot, siehe Abbildung 4-17A). Die Spleißreaktion war in solchen Extrakten ähnlich stark inhibiert wie bei der Antikörper-Inhibition (siehe Abbildung 4-17B, Spur 2). Auch hier zeigte das stark verminderte Auftreten des Intron-Exon2-Zwischenprodukts, dass die Reaktion schon vor dem ersten Transesterifizierungsschritt blockiert war. Im Kontrollansatz mit *mock*-depletiertem Extrakt lief die Reaktion dagegen unverändert ab (Spur 3 und 5). Darüberhinaus war es in diesem Experiment sogar möglich, die Spleißaktivität des depletierten Extrakts durch nachträgliche Zugabe von gereinigtem, rekombinant exprimiertem SMNrp wiederherzustellen (Spur 4, 6 und 7). Die Zugabe von BSA als Kontrolle hatte dagegen keinen Effekt auf die Reaktion (Spur 8). Damit wurde eindeutig gezeigt, dass SMNrp ein essentieller Spleißfaktor ist, der für die erste Transesterifizierung in der Reaktionsfolge benötigt wird.

## 4.2 Das UBA- und Tudor-Domänen-Protein TUBA

### 4.2.1 Identifizierung und Klonierung eines weiteren Tudor-Domänen-Proteins

#### 4.2.1.1 Entdeckung von TUBA und Klonierung der cDNA

Wie am Anfang von Kapitel 4.1 beschrieben (siehe Seite 59), wurden bei der Datenbanksuche nach SMN-homologen Sequenzen neben SMNrp noch EST-Sequenzen eines weiteren verwandten und bisher unbekanntes Gens gefunden. Von diesen EST-Sequenzen wurden ebenso Oligonucleotide abgeleitet und damit die Sequenz aus einer humanen Gehirn-cDNA-Bank (*Marathon human brain cDNA*, Fa. Clontech) amplifiziert. Die so zunächst erhaltene cDNA wurde durch 5'- und 3'-RACE vervollständigt, in verschiedene Vektoren kloniert und sequenziert. Abbildung 4-18 zeigt die komplette, 2578 Nucleotide lange Sequenz der auf diese Weise klonierten cDNA. Sie enthält ein offenes Leseraster, das für ein Protein aus 744 Aminosäuren codiert. Die Lage des Startcodons gilt als sicher, da sich nur wenige Nucleotide in 5'-Richtung stromaufwärts ein Stopcodon im Leseraster (*in-frame*-Stopcodon) befindet und

da die Sequenzumgebung des Startcodons eine hohe Homologie mit der Kozak-Consensussequenz aufweist (Kozak, 1987). Die 3'-UTR enthält ein putatives Polyadenylierungssignal.

```

1 GGGGTCTCAAGTAGGAGGCCTCCCCATCACCCCCACCCAGCCCCACCACCCCGGCC 60
61 TAAGCAGCTACCATGGCCCCAGGTGGCCGGCGCGCGTGTGCCAGGCGGGTTGGTATCTT 120
(1) M A Q V A G A A L S Q A G W | Y L (16)
121 TCAGATGAAGGCATTGAGGCTTGCACAAGCTCTCCAGACAAAGTCAATGTAAATGACATC 180
(17) S D E G I E A C T S S P D K V N V N D I (36)
181 ATCCTGATTGCTCTCAATACAGATCTGAGAACAATTGGCAAGAAATCTCCCCAGTGAC 240
(37) I L I A L N T D L R T I | G K K F L P S D (56)
241 ATCAATAGTGGAAAGGTAGAAAAGCTCGAAGGTCCATGTGTTTTGCAAATTCAAAAAATT 300
(57) I N S G K V E K | L E G P C V L Q I Q K I (76)
301 CGCAATGTTGCTGCACCAAAGGATAATGAAGAATCTCAGGCTGCACCAAGGATGCTGCGA 360
(77) R N V A A P K D N E E S Q A A P R M L R (96)
361 TTACAGATGACTGATGGTCATATAAGTTGCACAGCAGTAGAATTTAGTTATATGTCAAAA 420
(97) L Q M T D G H I S C T A V E F S Y M S K (116)
421 ATAAGCCTGAACACACCACCTGGAACATAAGTTAAGCTCTCAGGCATTGTTGACATAAAA 480
(117) I S | L N T P P G T K V K L S G I V D I K (136)
481 AATGGATTCTCTGCTCTTGAATGACTCTAACACCACAGTCTTGGTGGTGAAGTGAACAC 540
(137) N G F L L L N D S N T T V L G G E V E H (156)
541 CTTATTGAGAAATGGGAGTTACAGAGAAGCTTATCAAAACACAATAGAAGCAATATTGGA 600
(157) L I E K W E L Q R S | L S K H N R S N I G (176)
601 ACTGAAGGTGGACCACCGCCTTTTGTGCCTTTTGGACAGAAGTGTGTATCTCATGTCCAA 660
(177) T E G G P P P F V P F G Q | K C V S H V Q (196)
661 GTGGATAGCAGAGAACTTGATCGAAGAAAACATTGCAAGTTACAATGCCTGTCAAACCT 720
(197) V D S R E L D R R K T L Q V T M P V K P (216)
721 ACAAATGATAATGATGAATTTGAAAAGCAAAGGACGGCTGCTATTGCTGAAGTTGCAAAG 780
(217) T N D N D E F E K Q R T A A I A E V A K (236)
781 AGCAAGGAAACCAAGACATTTGGAGGAGGTGGTGGTGGTGTAGAAAGTAATCTCAATATG 840
(237) S K E | T K T F G G G G G A R S N L N M (256)
841 AATGCTGCTGGTAACCGAAATAGGGAAGTTTTACAGAAAAGAAAAGTCAACCAATCAGAG 900
(257) N A A G N R N R E V L Q K E K S T K S E (276)
901 GGAAAACATGAAGGTGTCTATAGAGAAGTGGTTGATGAGAAAGCTCTGAAGCACATAACG 960
(277) G K H E G V Y R E L | V D E K A L K H I T (296)
961 GAAATGGCTTCAGTAAGGAAGCATCGAGGCAAGCTCTTATGGATAATGGCAACAACCTTA 1020
(297) E M G F S K E A S R Q A L M D N G N N L (316)
1021 GAAGCAGCACTGAACGTACTTCTTACAAGCAATAAACAGAAACCTGTTATGGGTCTCTCT 1080
(317) E A A L N V L L T S N K Q K P V M G P P (336)
1081 CTGAGAGGTAGAGGAAAAGGCAGGGGGCGAATAAGATCTGAAGATGAAGAGGACCTGGGA 1140
(337) L R G | R G K G R G R I R S E D E E D L G (356)
1141 AATGCAAGGCCATCAGCACCAAGCACATTATTGATTCTTGAATCTAAAAATGGGAAC 1200
(357) N A R P S A P S T L F D F L E S K M G T (376)
1201 TTGAATGTGGAAGAACCTAAATCACAGCCACAGCAGCTTCATCAGGGACAATACAGATCA 1260
(377) L N V E | E P K S Q P Q Q L H Q G Q Y R S (396)
1261 TCAAATACTGAGCAAAATGGAGTAAAAGATAATAATCATCTGAGACATCCTCCTCGAAAT 1320
(397) S N T E Q N G V K D N N H L R H P P R N (416)
1321 GATACCAGGCAGCCAAGAAATGAAAAACCGCCTCGTTTTCAAAGAGACTCCCAAAATTC 1380
(417) D T R Q P R N E K P P R F Q R D S Q N S (436)
1381 AAGTCAGTTTTAGAAGGCAGTGGATTACCTAGAAATAGAGGTTCTGAAAGACCAAGTACT 1440
(437) K S V L E G S G L P R N R G S E R P S T (456)
1441 TCTTCAGTATCTGAAGTATGGGCTGAAGACAGAATCAAATGTGATAGACCGTATTCTAGA 1500
(457) S S V S E V W A E D R I K C D R P Y S R (476)
1501 TATGACAGAACTAAAGATACTTATATCTTTAGGTTCTCAGCATAGTGATGGTGCTTTT 1560
(477) Y D R T K D T S Y P L G S Q H S D G A F (496)
1561 AAAAAAAGAGATAACTCTATGCAAAGCAGATCAGGAAAAGGTCCCTCCTTTGCAGAGGCA 1620
(497) K K R D N S M Q S R S G K G P S F A E A (516)
1621 AAAGAAAATCCACTTCTCAAGGATCTGTAGATTATAATAATCAAAAACGTGAAAAAAGA 1680
(517) K E N P L P Q G S V D Y N N Q K R G K R (536)

```

```

1681 GAAAGCCAAACATCTATTCTGATTATTTTTATGACAGGAAATCACAAACAATAAATAAT 1740
(537) E S Q T S I P D Y F Y D R K S Q T I N N (556)
1741 GAAGCTTTCAGTGGTATAAAAATTGAAAAACATTTTAAATGTAAATACTGATTATCAGAAT 1800
(557) E A F S G I K I E K H F N V N T D Y Q N (576)
1801 CCAGTTCGAAGTAATAGTTTCATTGGTGTTCCAAATGGAGAAGTAGAAATGCCACTGAAA 1860
(577) P V R S N S F I G V P N G E V E M P L K (596)
1861 GGAAGACGAATAGGACCTATTAAGCCAGCAGGACCTGTCACAGCTGTACCCCTGTGATGAT 1920
(597) G R R I G P I K P A G P V T A V P C D D (616)
1921 AAAATATTTTACAATAGTGGGCCCAAACGAAGATCTGGGCCAATTAAGCCAGAAAAAATA 1980
(617) K I F Y N S G P K R R S G P I K P E K I (636)
1981 CTAGAATCATCTATTCTATGGAGTATGCAAAAATGTGGAAACCTGGAGATGAATGTTTT 2040
(637) L E S S I P M E Y A K M W K P G D E C F (656)
2041 GCACTTTATTGGGAAGACAACAAGTTTACCGGGCAGAAGTTGAAGCCCTCCATTCTTCG 2100
(657) A L Y W E D N K | F Y R A E V E A L H S S (676)
2101 GGTATGACAGCAGTTGTTAAATTCATTGACTACGGAACTATGAAGAGGTGCTACTGAGC 2160
(677) G M T A V V K F I D Y G N Y E E V L L S (696)
2161 AATATCAAGCCATTCAAACAGAGGCATGGGAGGAAGAAGGCACCTACGATCAAACCTCG 2220
(697) N I K P I Q T E A W | E E E G T Y D Q T L (716)
2221 GAGTTCCTAGGGGAGGTGATGGCCAGCCAAGCAGATCCACTCGGCCAACCCAACAGTTT 2280
(717) E F R R G G D G Q P R R S T R P T Q Q F (736)
2281 TACCAACCACCCGGGCTCGGAACTAATAGGAAAAGACTCTTTGTGAAGAAACGAGCCAG 2340
(737) Y Q P P R A R N * | (744)
2341 TGACTGAAACACCCTGGTGGAAACCTGTTGACAGACCTTCCACTTTCTCTTCAGAATAAG 2400
2401 TAGCTGTGGTGGATATTATTATTTGAAGAAAGAAAAACAGATTTTAGGGTGGAAAAAC 2460
2461 AGTCAACTCACACAAAGAATGAAAAAATACTGAGTTAAATTAAGCAAATACCTTTTAC 2520
2521 AAGTGAAGGAAGAATTTTTCTTCTGCCGTCAATAAAACCATTGTGCTCGAGCGGGGG 2578

```

**Abbildung 4-18: Die humane cDNA-Sequenz von TUBA.** Es sind die cDNA-Sequenz (Nucleotidpositionen: Zahlen am Rand) und die abgeleitete Aminosäure-Sequenz (Zahlen in Klammern) von TUBA angegeben. Start- und Stopcodon sind grau unterlegt. Das *in-frame*-Stopcodon innerhalb der 5'-UTR ist durch eine Wellenlinie gekennzeichnet. Die Kozak-Consensussequenz in Bereich des Startcodons und das putative Polyadenylierungssignal in der 3'-UTR sind durchgehend unterstrichen. Die Lage der UBA-Domäne ist durch unterbrochene Unterstreichung, die der Tudor-Domäne durch doppelte Unterstreichung gekennzeichnet. Die beiden möglichen Kernlokalisationssignale sind durch Fett-Kursivdruck hervorgehoben. Die putativen Exon-Grenzen sind durch das Zeichen | innerhalb der Aminosäure-Sequenz dargestellt.

Mit dem Programm „RPS-BLAST“ (NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) wurden in der Aminosäuresequenz zwei konservierte Domänen gefunden: eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA-Domäne; von Aminosäure Asp<sub>288</sub> bis Leu<sub>324</sub>) und eine Tudor-Domäne (Lys<sub>647</sub> bis Pro<sub>700</sub>). Aufgrund dieser Domänenstruktur wurde das Protein „TUBA“ genannt, für engl. „*Tudor and UBA domain-containing protein*“. Innerhalb der Tudor-Domäne ist die Aminosäuresequenz von TUBA zu 38 % identisch und zu 57 % ähnlich (im Sinne konservativer Aminosäure-Substitutionen) mit der Sequenz von SMN. Tatsächlich wurden die ersten ESTs von TUBA über diese Homologie mit der SMN-Tudor-Domäne entdeckt. Zu SMNrp bestehen 44 % Identität und 59 % Ähnlichkeit in diesem Bereich. Ein multipler Sequenzvergleich von SMN, SMNrp und dem C-terminalen Abschnitt von TUBA ist in Abbildung 4-19 gezeigt. Innerhalb der UBA-Domäne besteht die größte gefundene Sequenzidentität mit beschriebenen humanen Proteinen zur Ubiquitin-Isopeptidase T



#### 4.2.1.2 Das humane TUBA-Gen besteht aus 14 Exons

Weitere BLAST-Analysen mit der TUBA-cDNA-Sequenz in genomischen Datenbanken (NCBI) zeigten, dass das humane TUBA-Gen auf Chromosom 13 im Bereich 13q21 lokalisiert ist. Die komplette cDNA verteilt sich in 14 Exons über einen 167 kb langen Abschnitt der genomischen Sequenz (*Homo sapiens chromosome 13 working draft sequence segment*, GenBank-Accession: NT\_009850.3). Die exonischen Sequenzen sind von unterschiedlich langen Introns mit klassischen Intronengrenzen unterbrochen (schematische Darstellung: siehe Abbildung 4-20 oben; Exongrenzen in der cDNA: siehe Abbildung 4-18). Die prä-mRNA ist demnach mindestens 167 kb lang, die mRNA nach dem Spleißen noch 2,9 kb (vgl. Abbildung 4-22, Seite 85).

#### 4.2.1.3 TUBA ist ein bei höheren Eukaryonten konserviertes Protein

Um festzustellen, ob TUBA auch in anderen Organismen vorkommt, wurden weitere BLAST-Datenbanksuchen mit der Aminosäure-Sequenz von TUBA durchgeführt. Dabei wurde gefunden, dass es neben einem fast identischen Homolog in der Maus auch Homologe in *D. melanogaster* und in *C. elegans* gibt. Abbildung 4-21 zeigt einen Sequenzvergleich dieser Proteine. In den inzwischen komplett sequenzierten Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* gibt es dagegen keine Homologe. Im Gegensatz zu SMNrp (vgl. Kapitel 4.1.1.2) ist TUBA demnach ein erst in der jüngeren Entwicklungsgeschichte der Eukaryonten evolviertes Protein.

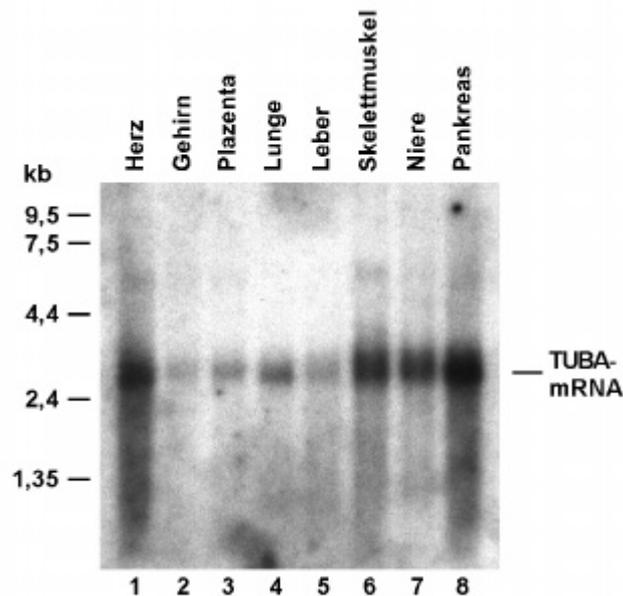
#### 4.2.1.4 Das TUBA-Gen wird ubiquitär exprimiert

Durch Northernblot-Analyse verschiedener menschlicher Gewebe wurde nun untersucht, ob TUBA gewebespezifisch oder, wie SMN und SMNrp, ubiquitär im Organismus exprimiert wird. Dazu wurde eine „Multiple Tissue Northern Blot“-Membran (Fa. Clontech) mit radioaktiv markierter TUBA-cDNA als Sonde hybridisiert. Es zeigte sich, dass TUBA in allen untersuchten Geweben als 2,9 kb große mRNA exprimiert wird. Die beobachtete Größe entspricht der Vorhersage nach der Größe der klonierten cDNA mit einer typischen 3'-Polyadenylierung. In allen Geweben wird nur eine einzelne TUBA-Bande beobachtet. Demnach gibt es keine Hinweise auf alternativ gespleißte Formen des Primärtranskripts.

Die Northernblotanalyse legt nahe, dass TUBA in allen humanen Geweben ubiquitär exprimiert wird. Dies, wie auch die Existenz homologer Proteine in entwicklungsgeschichtlich entfernteren Spezies, deuten darauf hin, dass auch TUBA (wie schon SMNrp) ein *housekeeping*-Gen mit einer grundsätzlichen, nicht gewebespezifischen Funktion im Zellstoffwechsel ist.

H. s.	1	MAQVAGAAALSQAGWYLSDEGTEACTSSPDKVNVNDITLLTALNIDLRTIGKKFLPSDINSNGKVEKLEGPCVLQIQKIRNV
M. m.	1	MAEVSGAALSQAGWYLSDEGTEACTSSPGKGSINDITLLTALNIDLRTIGKKFLPSDINNGKVEKLEGPCVLQIQKVRNV
D. m.	1	--MELGKKLREVGWYLTEGKIVTIAVGSEVWRKINDALNRDLRDLGGGALAKRED---ATLECKIVLQVQRVRNI
C. e.	1	----MDQLRKDGWYINISQTSQLFDELLPKNGSEIEKVLINEDLRNFGEASINLKKED-FVFEGPCVLQILRYRNV
H. s.	80	AAPKDNEES---QAAPRMLRLOVTDGHTISCTAVEFSYSKISLNTPPGTKVKLSG-IVDLKNGLLLNDSNTTVLGGEVE
M. m.	80	AAPKDNEES---QAAPRMLRVQVTDGHTISCTAVEFSYSKISLNTPPGTKVKLSG-TVDLKNGLLLSDSNTTVLGGEVE
D. m.	75	AAPKANEES---KAAPRLLQLDLSGQNSIKALELEPVQLNLNVAPGSKIYFKAEEKLQMQGFLLLKSSSEIQLLGGRVD
C. e.	75	SVERIKEEELNQDPAHSLIRLFFTDGHSISALLLQSLPGIITSSTPPGTKILILG-KVDVEGGFLILGKKDIRILGGKVD
H. s.	156	HLTEKWEIORSLSKHNRSN--TCTEGGPPFPVFPQKCVSHVQVDSRELDRRKTLQVTPMPKPTNDNDEFKQRTAAIAE
M. m.	156	HLIDKWAQRSLLKHNRSN--TCAEGGPPFPVFPQKCVSNVQVDSRELDRRKTLQVSLPAKPNNDNDEFKQRTAAIAE
D. m.	152	ALYEKWDLARTMMRYARSGRPLNGTSAPPPWFVAFGRKIDSNAESEMN----FKSLGEGDKDKPAKENEFNAMRTEAIAV
C. e.	154	EMTEKWNVEKSSVRAGGFKSSVCKGTGAKWISFGKRGQ---KGQLEKGFKANSVMPKTKQEGEDADDDFSKNRRAEIKD
H. s.	234	VAKSKEKTFGGGGG----GARSNLNNNAAGNRRREVLOKEKSTKSEKGH-----EVYRELV
M. m.	234	VAKSKEKTFGGGGG----GARSNLNI CAAGHNRRREVLOKEKASKSEKSN-----EGVYRELV
D. m.	228	ATKAGGKIFGGGGQNIIDHNVKILDKCFSEEEARSALSATRNLERALYNLKRSEAGGVGPIESVGRPGRDRPPRE
C. e.	231	LDSDTAK-----TFAKPNLAPPPVKAAPPKERVPAARPAR-----KGRGRKNS
H. s.	288	DEKALKHITEMCFKSKEASRQALMDNGNLEAALNVLLTSNKQKQVPMGPPLRGRCKCRG-----RIRSEDEEDLGNARPS
M. m.	288	DEKALKHITEMCFKSKEASRQALMDNANNLEAALNVLLNSKQKPAVGPARGRCKCRG-----RGRSEDEEDLGTARPS
D. m.	308	GKRGASAKDEVKAPKPAANTTFDFLTKLPAKETPAASNAETFAAAPTAAAPTAPPTNHFNPFKQYGSRRFSDESEKSPS
C. e.	276	EDGPDVDVGEVYNHKPSGPATLDFDFIG-----GCACACAS-----EKAVEL
H. s.	362	APSTLDFPLESKMGTLNVEEPKSPQPPQHOGQYRHSNTEQNGVMDNNHLR-----HPPRNDTRQPRNEKPPR-----F
M. m.	362	APSTLDFPLESKMGTLNVEEPKSPQPPQHOGQYRHWNAEQNGMMDGSQSR-----HLPNRNDTRQPRNERPPR-----F
D. m.	388	AMGGGGRFADRSRFENNVSFFAAHRGCHVCSRRGGGRNRRGGRDERPPREERAYREDREPREKPPKBERPPRERGAFN
C. e.	317	LPQNVQHLTEKMGKLNKNSFNFKYPG-----AGGRDQRPAA-----ARDNRRGPKNSAPQN-----
H. s.	430	QDSDQNSKSVLESGSLPRNRGSRPSTSSVSEVWAEDRIKCDRFPYSRYDRTKDTS-----YPLCS
M. m.	430	QDTPTEKSTVENSVLRSRNRGSRPSSSSGSDVWAEERIRCDRFPYSRYDRTKDAS-----HPLCF
D. m.	468	DRAAGRYKPEPTVVKTANRNGSDNVSLKPNSEIKPDHETTNGDHTGNRRGSRGSRNRGGSNRAENGNANGNRRNKPAAS
C. e.	371	-----QRPAARDGNRCPKNPGPQNRADYFRDRDRQORESTIGSVGQPRE-----VSRNF
H. s.	490	QHSDDGAFKKRDNMSQSRSGCKGPSFAEAKENPLPQGSVDYNNQKRGKRESQTSIPDYFYDRKSQTINNEAFSGIKIEKHFN
M. m.	490	QHNDGAFKKRENSMQNRPCRGPLMAEAKENPLPEFVDYNNQRGRRENQGTGHPDHCYERKPRTMNSEAFSGLIEKHFS
D. m.	548	LTSASSAAKSTNSAGDDFNARLSKITEETANLVSSAPKRENRKQGGQANRLAGSGTETQOQQPAQLHSSQKPEKAQTN
C. e.	422	QNSPRSNQNSNQGHPR--GNQKSEQQEAPHQTPRGNGNFQQQGPRTGTGNVFFQQGPPRGGQFHGGSQQGPPPPPSQH
H. s.	570	VNTDYQNPVRSNFIGVFNCEVEMPLKGR-----RIGPTKPKACPVTAVPCDDKIFYNSSGPKRRSGPIKPEKILES
M. m.	570	VNTDYPSPVQSNLS-LGVNCEETAPPLKGR-----RVGPTKKSACPVTAVPYDDKIFYNSSGPKRRSGPIKPEKVIES
D. m.	628	QKHHNPRHNSQANYSQLANGYTYDPSKIMGFQSKNEANFAMNLKKSQVTLPLNPKQEEEQESEPMSFGPVSAFVSRAG
C. e.	501	HPRGFQQQAQQNP--PERCINNQQQSYHG-----APRCMGNFGHQEPNINVQSSHQQQTGGPQ-----
H. s.	640	SIPMEY-----AKMVKPGDECFALYWEDNKFYRAEVEALHSSGMTAVVKFTIDYGNVYEEVLLSNIK----
M. m.	639	SIPVEY-----AKVWVKPGDECFALYWEDNKFYRAEVEALHSSGMTAVVKFTIDYGNVYEEVLLSNIK----
D. m.	708	PAPVAVPQAAPRDQFGMVPGDAWMMWQKGLDMAKYWDGGRYVBAEITGVSEK--TCVVFFMGYGNHEEVLVKVDLIPITDA
C. e.	555	-----WRVCAQCLAT-WTDGNLYPATVTEILPN-RTAIVRYNEYGNMHTIPVDFIIP----
H. s.	700	---PIQTEAWEEEGTYDQTFEFRGGDGQPRRSTRPT--QQFYQPPRARN-
M. m.	699	---PVQTEAWEEEGTYDHTIEFRGGDGQPRRSTRPT--QQFYQPPRARN-
D. m.	786	QNRPLSNSAQQQPHLQQQPHLQQQHSRYRGDRQTQQQQVYVPPHKREH
C. e.		-----

**Abbildung 4-21: TUBA ist unter höheren Eukaryonten konserviert.** Multipler Sequenzvergleich der TUBA-Aminosäure-Sequenzen von Mensch (H.s.: eigene Klonierung), Maus (M.m.: cDNA-Klon, *GenBank-Accession*: BC005670, davon Nucleotide 127-2358 translatiert), *D. melanogaster* (D.m.: CG13472-Protein, *GenBank-Accession*: Q9VUH8) und *C. elegans* (C.e.: hypothetisches Protein Y50D4C.3, *GenBank-Accession*: AAK68508). Das Vergleich wurde mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt, die graphische Darstellung mit dem Programm BOXSHADE 3.21 (vgl. Abbildung 4-4, Seite 62). Identische Aminosäuren in drei oder mehr Sequenzen sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt.



**Abbildung 4-22: TUBA ist ein ubiquitär exprimiertes Gen.** Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Multiple Tissue Northern Blots (Fa. Clontech), der mit radioaktiv markierter TUBA-cDNA als Sonde hybridisiert wurde. Auf dem Blot sind pro Spur 2 µg poly(A)-RNA der angegebenen humanen Gewebe aufgetragen.

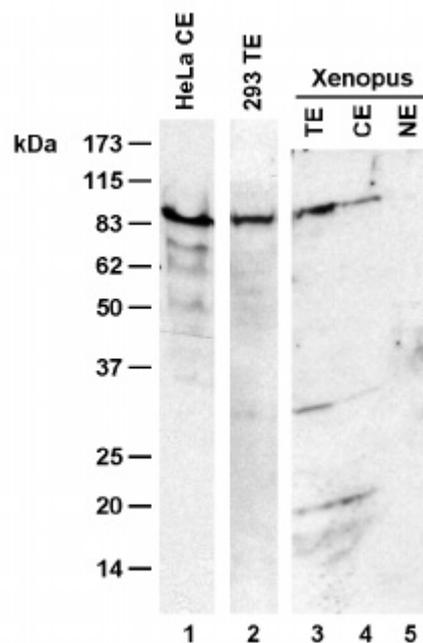
## 4.2.2 TUBA ist im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert

### 4.2.2.1 Herstellung eines spezifischen Antiserums

Das Tudor-Domänen-Protein SMN, Produkt des Krankheitsgens der spinalen Muskelatrophie, zeigt eine sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation in Zellen. Entsprechend sind auch verschiedene Funktionen des Proteins in den Kompartimenten beschrieben worden (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Das im ersten Teil dieser Arbeit untersuchte Homolog SMNrp wird nur im Zellkern gefunden (vgl. Abbildung 4-7, Seite 66). Dies deckt sich mit den gefundenen Funktionen als essentieller Spleißfaktor und möglicher Aktivator der Histon-Acetyltransferase GCN5 (Kapitel 4.1.3.4 und 4.1.4). Bei der Sequenzanalyse von TUBA wurden zwei potentielle Kernlokalisierungssignale im C-terminalen Abschnitt des Proteins gefunden. Es stellte sich somit die Frage, ob auch TUBA ein Kernprotein ist.

Um diese durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie beantworten zu können, wurde zunächst ein spezifisches Antiserum gegen TUBA hergestellt. Dazu wurde die codierende Sequenz von TUBA in den Expressionsvektor pET28a kloniert und als Histidin-tag-Fusionsprotein (His-TUBA) in *E. coli* exprimiert. Das Protein wurde an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Das schließlich erhaltene Kaninchenserum wurde durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurde His-TUBA kovalent an Sepharose gekoppelt.

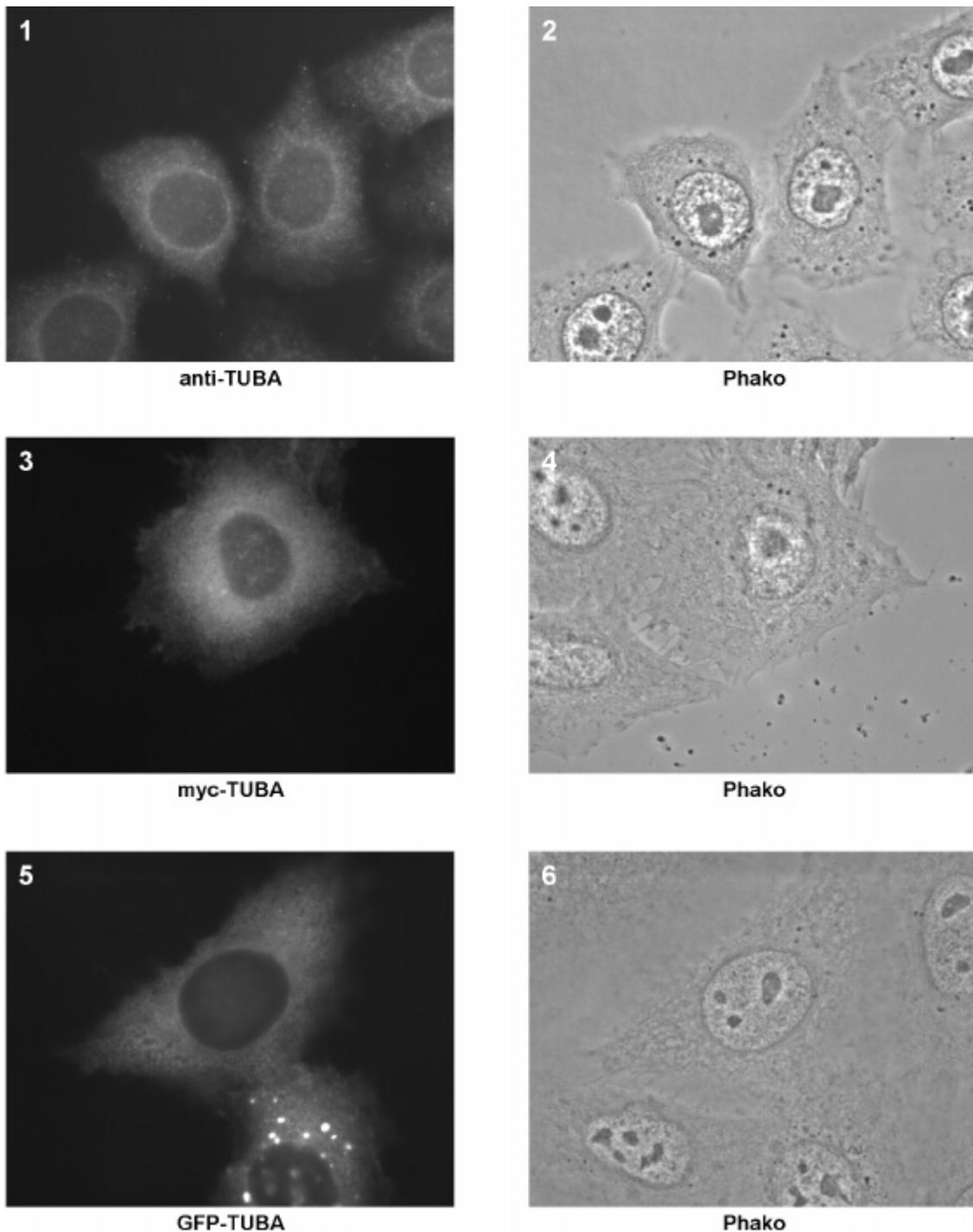
Nach der Reinigung wurde das Antiserum durch Westernblot auf seine Spezifität getestet (siehe Abbildung 4-23): In Cytoplasmaextrakt aus HeLa-Zellen und in Gesamtzellextrakt aus 293-Zellen wird hochspezifisch ein etwa 85 kDa großes Protein erkannt (Spur 1 und 2). Das beobachtete Molekulargewicht entspricht damit der anhand der Sequenz vorhergesagten Größe des TUBA-Proteins (83 kDa). Darüberhinaus wird auch in Ganzzell- und Cytoplasmaextrakten aus *X. laevis* Oocyten ein entsprechendes Signal beobachtet (Spur 3 und 4), nicht jedoch in Kernextrakten (Spur 5). Das spezifische, affinitätsgereinigte Kaninchen-Antiserum gegen das TUBA-Protein wird im folgenden nur noch mit „anti-TUBA“ bezeichnet.



**Abbildung 4-23:** Ein Antiserum gegen TUBA erkennt spezifisch ein 85kDa-Protein in Extrakten humaner Zell-Linien und in *Xenopus*-Oocytenextrakten. Westernblot mit affinitätsgereinigtem Kaninchen-Antiserum gegen das TUBA-Protein. 1: Cytoplasmaextrakt aus HeLa-Zellen. 2: Gesamtzellextrakt aus 293-Zellen. 3: Gesamtzellextrakt aus zwei *X. laevis* Oocyten. 4: Cytoplasmaextrakt aus zwei *X. laevis* Oocyten. 5: Extrakt aus 20 *X. laevis* Oocytenkernen.

#### 4.2.2.2 Lokalisation von endogenem und rekombinantem TUBA in Kulturzellen

Zur intrazellulären Lokalisation von TUBA wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit anti-TUBA an HeLa-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass TUBA im Cytoplasma und mit geringerer Intensität auch im Zellkern zu finden ist. Das stärkste Signal wurde im Cytoplasma, in einem Bereich nahe der Kernmembran gefunden (siehe Abbildung 4-24, Bild 1). Um die Lokalisation zu bestätigen wurde TUBA in die eukaryontischen Vektoren p3Myc und pEGFP-C2 kloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Zellen, die mit p3Myc-TUBA transfiziert sind, exprimieren rekombinantes TUBA-Protein mit einem



**Abbildung 4-24: TUBA ist hauptsächlich ein cytoplasmatisches Protein.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen. 1: Indirekte Immunfluoreszenz mit anti-TUBA. 3: Indirekte Immunfluoreszenz mit anti-c-Myc nach Transfektion mit p3Myc-TUBA. 5: GFP-Fluoreszenz nach Transfektion mit pEGFP-TUBA. 2, 4 und 6: Phasenkontrastaufnahmen der Zellen von 1, 3 und 5.

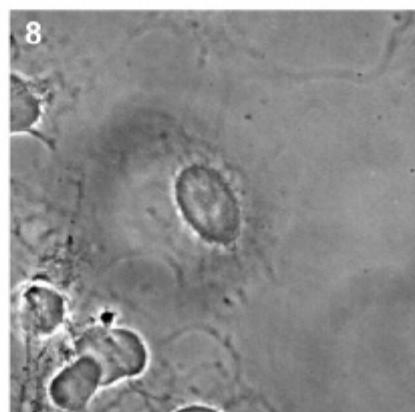
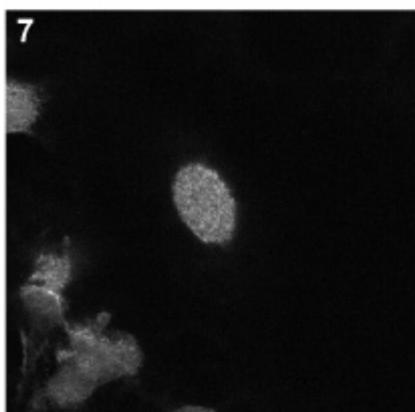
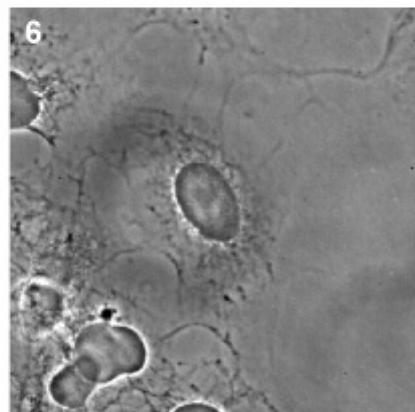
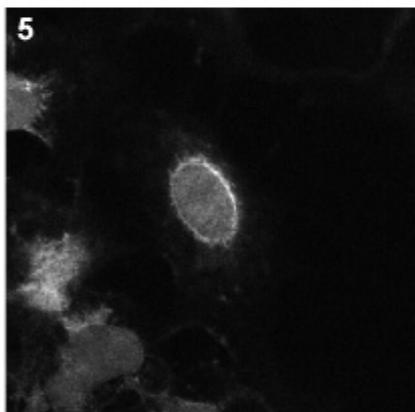
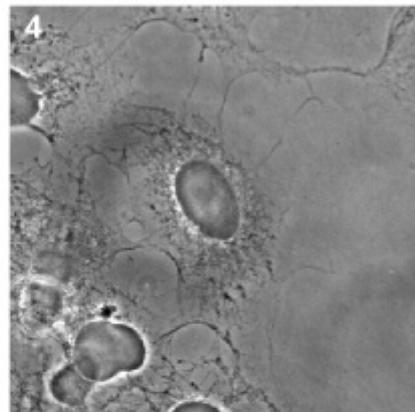
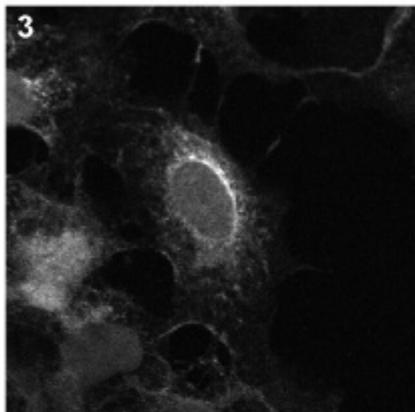
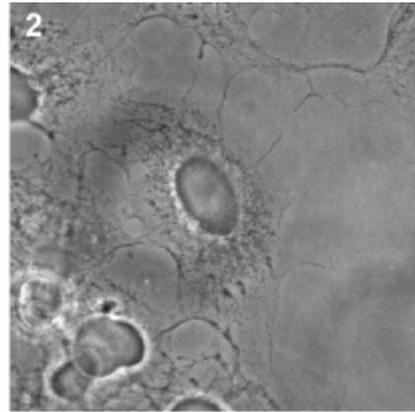
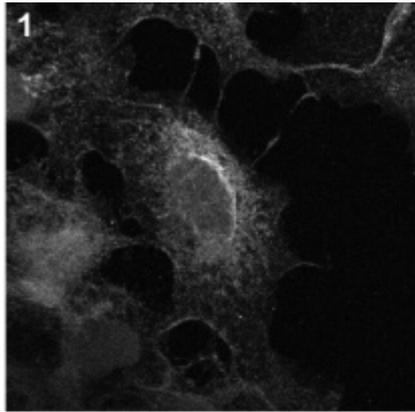
dreifachen N-terminalen c-Myc-Epitop, das durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit anti-c-Myc nachgewiesen werden kann. Transfektion mit pEGFP-TUBA führt zur Expression eines Fusionsproteins aus TUBA und dem *green fluorescent protein* (GFP). Das Fusionsprotein kann direkt durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Da beide

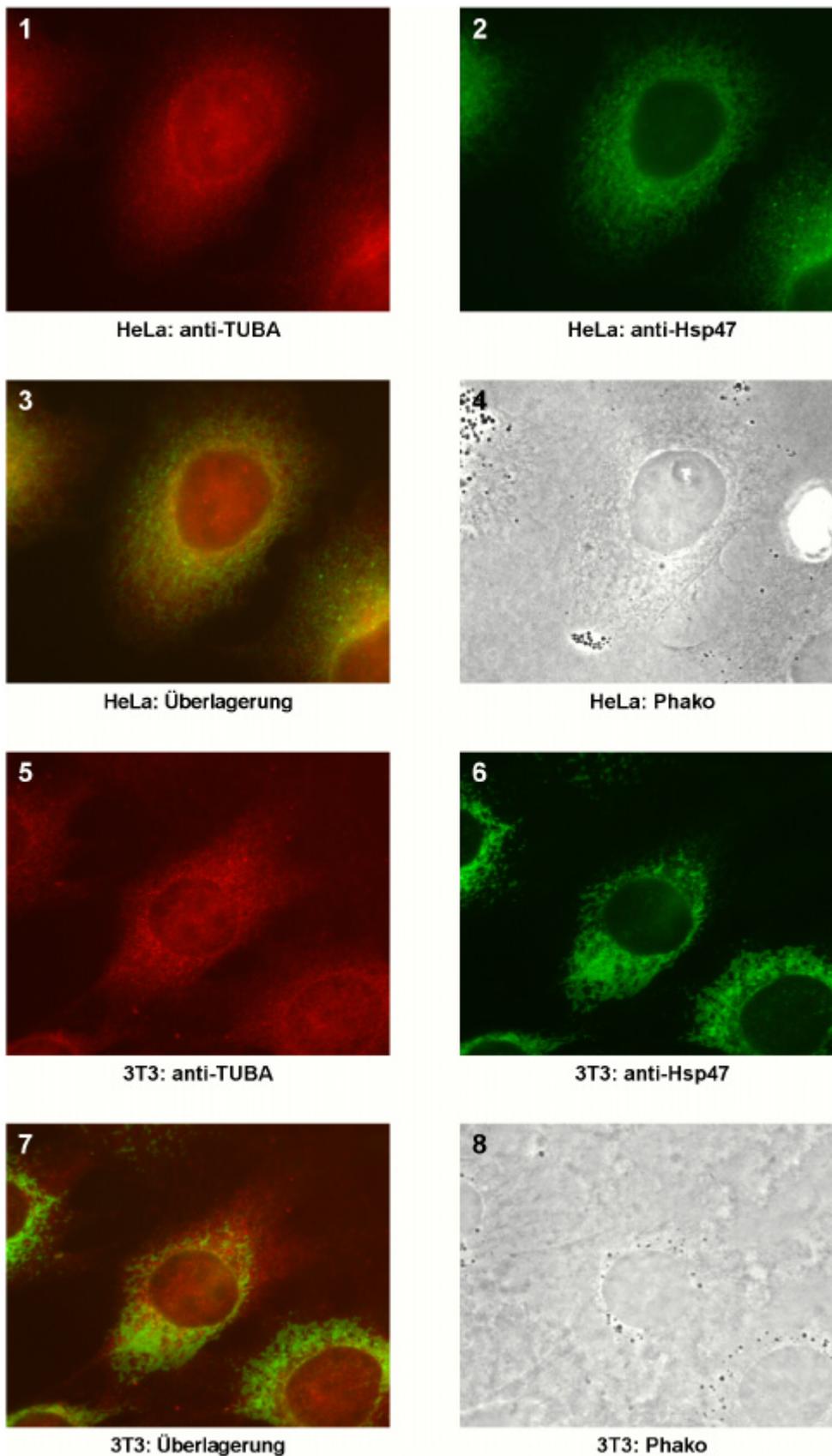
Vektoren starke Promotoren tragen, führt die Transfektion in der Regel zu einer Überexpression der rekombinanten Proteine im Vergleich zum endogenen Protein. In beiden Fällen zeigen die rekombinanten Proteine eine ähnliche Lokalisation wie das endogene TUBA: Myc-TUBA zeigt ebenfalls ein starkes cytoplasmatisches Signal in Kernnähe (siehe Abbildung 4-24, Bild 3), GFP-TUBA scheint fast ausschließlich im Cytoplasma zu lokalisieren (siehe Abbildung 4-24, Bild 5). Wie es auch bei anderen GFP-Fusionsproteinen gelegentlich beobachtet wird, führt die Überexpression von GFP-TUBA in einigen Zellen zur Bildung von Aggregaten (Abbildung 4-24, Bild 5: untere Zelle).

Um ein genaueres Bild der TUBA-Lokalisation zu erhalten, wurden weitere Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt: COS-1-Zellen wurden mit anti-TUBA markiert und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet. Dabei wurden in verschiedenen Ebenen konfokale Schnitte durch die Zellen gelegt und fotografiert (siehe Abbildung 4-25). Die kernnahe Lokalisation von TUBA im Cytoplasma zeigt hier eine z.T. tubulär erscheinende Struktur, die bis an die Kernhülle reicht und diese mit einzubeziehen scheint. Dagegen ist die Verteilung von TUBA innerhalb des Zellkerns diffus.

Es stellte sich die Frage, ob es sich bei der beobachteten cytoplasmatischen Struktur um eine Lokalisation am Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle handelt. Deshalb wurde untersucht, ob sich das cytoplasmatische TUBA-Signal mit einem ER-Marker colokalisieren lässt. Hierfür wurde ein Antikörper gegen das ER-Lumen-ständige Hitzeschock-Protein Hsp47 verwendet. Bei indirekten Co-Immunfluoreszenzstudien mit anti-TUBA und anti-Hsp47 an HeLa- und 3T3-Zellen wurde nur eine partielle Überlappung der beiden Signale beobachtet (siehe Abbildung 4-26). Dies deutet darauf hin, dass das cytoplasmatische TUBA zumindest nicht ausschließlich am ER gefunden wird und vermutlich kein ER-Lumen-ständiges Protein ist. Es ist eher wahrscheinlich, dass TUBA an der cytoplasmatischen Seite bestimmter Bereiche der ER- und Kernmembran lokalisiert.

**Abbildung 4-25 (gegenüberliegende Seite): Konfokale Mikroskopie zeigt deutlich die intrazelluläre Verteilung von TUBA.** COS-1-Zellen wurden mit anti-TUBA markiert und konfokal mikroskopiert. 1, 3, 5 und 7: Indirekte Immunfluoreszenz mit anti-TUBA in vier verschiedenen Schnittebenen der gleichen Zelle. 2, 4, 6 und 8: Phasenkontrastaufnahmen zu den Bildern 1, 3, 5 und 7.



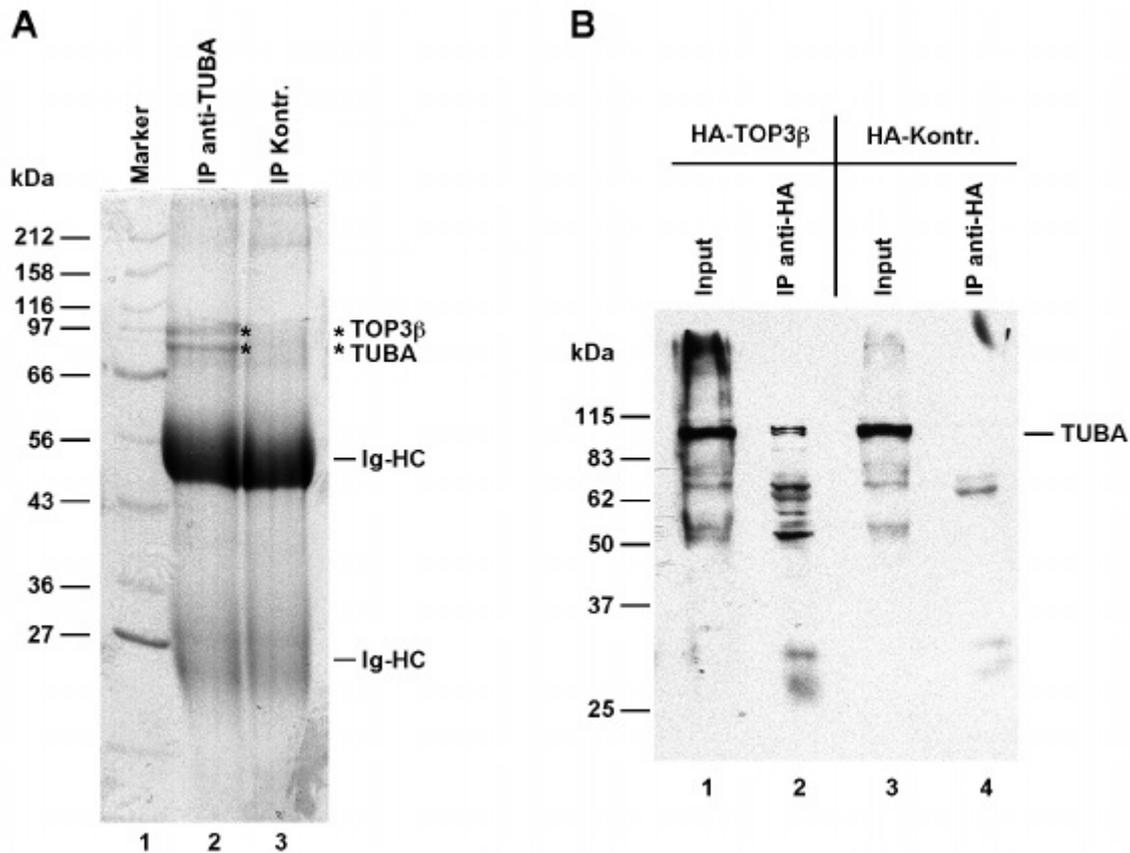


**Abbildung 4-26: Cytoplasmatisches TUBA colokalisiert nur partiell mit dem Endoplasmatischen Retikulum.** HeLa-Zellen (Bild 1-4) und 3T3-Zellen (Bild 5-8) wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Falschfarbendarstellung). 1 und 5: Indirekte Immunfluoreszenz mit anti-TUBA. 2 und 6: Indirekte Immunfluoreszenz der gleichen Zellen mit dem ER-Marker anti-Hsp47. 3 und 7: Überlagerung der anti-TUBA- und anti-Hsp47-Aufnahme. 4 und 8: Phasenkontrastaufnahme der Zellen von 1-3 bzw. 5-7.

### 4.2.3 TUBA interagiert mit DNA-Topoisomerase-III-beta (TOP3b)

#### 4.2.3.1 TOP3b copräzipitiert mit TUBA in stöchiometrischen Mengen

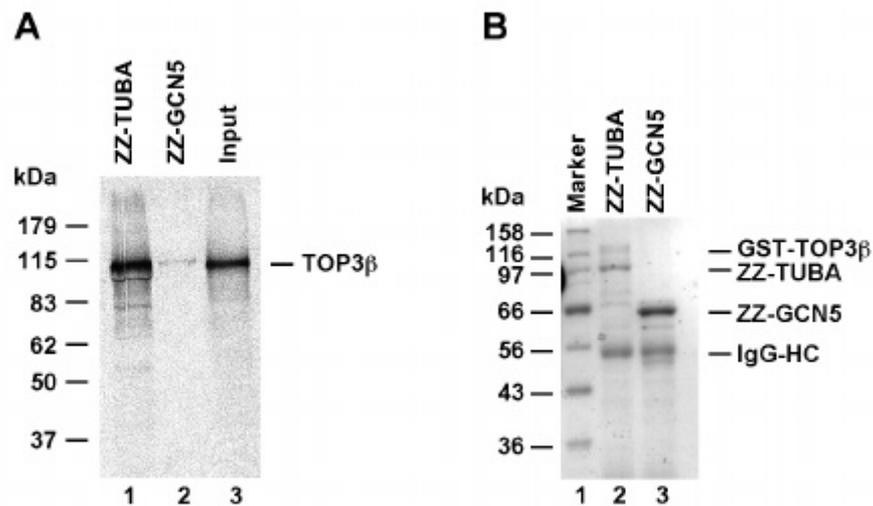
SMN und SMNrp (und auch andere Tudor-Domänenproteine) agieren nicht alleine in der Zelle sondern sind mit makromolekularen Komplexen assoziiert. Den Tudor-Domänen könnte dabei eine generelle Funktion als eine Art Plattform für die Interaktion mit anderen Proteinen zukommen. Daher wurde nun untersucht, ob sich auch für TUBA Bindungspartner in der Zelle finden lassen. Ein erster Ansatz bestand darin, TUBA durch Immunpräzipitation aus Zellextrakten zu isolieren und zu untersuchen, ob andere Proteine mitpräzipitiert werden können. Dazu wurde anti-TUBA an ProteinG-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasmaextrakt aus HeLa-Zellen inkubiert. Nach Waschen mit P300 mit 0,5 % Igepal wurden die Präzipitate durch pH-Schock (0,1 M Glycin pH 2,3) eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassiefärbung zeigte, dass zwei Proteine von etwa 95 und 85 kDa präzipitiert werden konnten (Abbildung 4-27A, die mit \* gekennzeichneten Banden). Beide wurden mit Trypsin verdaut, aus dem Gel eluiert und durch MALDI-Massenspektrometrie (durchgeführt von der Arbeitsgruppe Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) analysiert. Über die Massen der tryptischen Fragmente wurde so das 95kDa-Protein eindeutig als DNA-Topoisomerase-III-beta (TOP3 $\beta$ , *GenBank-Accession*: O95985) identifiziert. Beim 85kDa-Protein handelte es sich, wie schon anhand der Größe vermutet worden war, um TUBA selbst. Interessanterweise wurden beide Proteine in etwa gleichen Mengen präzipitiert. Daher kann angenommen werden, dass TOP3 $\beta$  im Extrakt in einem 1:1-Komplex an TUBA gebunden vorliegt. Zur weiteren Analyse der Interaktion wurde die cDNA von TOP3 $\beta$  (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Shu-Wing Ng, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA) in den Vektor pHA kloniert und damit 293-Zellen transfiziert. Die Zellen exprimieren dadurch TOP3 $\beta$  mit einem N-terminalen Peptidpitop des Hämagglutinin-Proteins des humanen Influenzavirus (*HA-tag*). Das so exprimierte HA-TOP3 $\beta$  wurde dann aus Zellextrakten mit einem HA-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Durch Westernblot mit anti-TUBA konnte gezeigt werden, dass dabei endogenes TUBA mitpräzipitiert wurde (siehe Abbildung 4-27B). Die Tatsache, dass die Co-Immunpräzipitation von TUBA mit TOP3 $\beta$  auch in umgekehrter Richtung möglich ist, ist ein Indiz für die tatsächliche Interaktion der beiden Proteine *in vivo*.



**Abbildung 4-27: DNA-Topoisomerase-III-beta (TOP3b) co-immunpräzipitiert mit TUBA in stöchiometrischen Mengen.** **A:** Immunpräzipitation aus HeLa-Cytoplasmaextrakt. Es wurde mit anti-TUBA (Spur 2) oder einem Kontrollserum (Spur 3) präzipitiert. Nach Waschen mit P300 mit 0,5 % Igepal wurden die gebundenen Proteine mit 0,1 M Glycin pH 2,3 eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die mit \* gekennzeichneten Banden wurden aus dem Gel eluiert und durch MALDI-Massenspektrometrie als TOP3 $\beta$  bzw. TUBA identifiziert. Ig-HC: Immunglobuline, schwere Ketten. Ig-LC: Immunglobuline, leichte Ketten. **B:** Immunpräzipitation aus Gesamtzellextrakten transfizierter 293-Zellen. Die Zellen wurden mit pHA-TOP3 $\beta$  (Spur 1 und 2) oder pHA-GFAP als Kontrolle (Spur 3 und 4) transfiziert. Nach der Extraktion wurde mit anti-HA präzipitiert. Es wurde mit IP-Puffer gewaschen und mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. TUBA wurde durch Westernblot mit anti-TUBA detektiert. Input (Spur 1 und 3): 20 % der Menge Extrakt, die zur Präzipitation eingesetzt wurde.

#### 4.2.3.2 TOP3b und TUBA binden direkt aneinander und colokalisieren im Cytoplasma

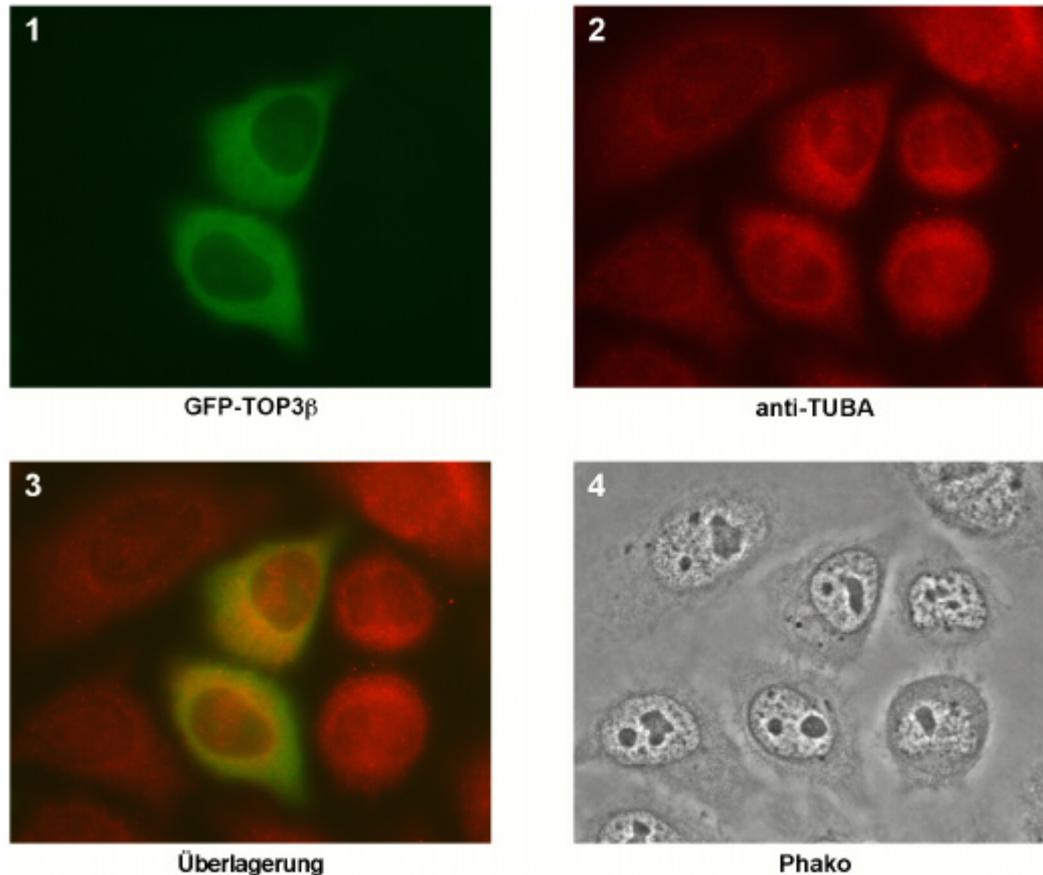
Mit den folgenden Experimenten wurde versucht, die Interaktion von TUBA mit TOP3 $\beta$  *in vitro* nachzuvollziehen. Dafür wurde die TUBA-Sequenz zunächst in den Vektor pET21a-zz kloniert und das Protein in *E. coli* mit einem N-terminalen ZZ-tag exprimiert (ZZ-TUBA, vgl. Kapitel 4.1.3.2). ZZ-TUBA wurde immobilisiert und mit *in-vitro*-translatierter, radioaktiv markierter TOP3 $\beta$  inkubiert. In der Tat konnte mit diesem Bindungsexperiment gezeigt werden, dass TOP3 $\beta$  auch *in vitro* an TUBA bindet (siehe Abbildung 4-28A). Um nachzuweisen, ob die Interaktion direkt erfolgt, wurden beide Proteine in *E. coli* rekombinant exprimiert und aufgereinigt. In einem anschließenden Bindungsexperiment wurde beobachtet,



**Abbildung 4-28: TOP3 $\beta$  interagiert *in vitro* direkt mit TUBA.** **A:** Autoradiographie eines Bindungsexperiments mit *in-vitro*-translatiertem TOP3 $\beta$ . ZZ-TUBA (Spur 1) oder ZZ-GCN5-S als Kontrolle (Spur 2) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit *in-vitro*-translatiertem, [ $^{35}$ S]-markiertem TOP3 $\beta$  inkubiert. Nach Waschen mit P300 wurde mit Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Input (Spur 3): 50 % der Menge des eingesetzten Translats. **B:** Bindungsexperiment mit rekombinant exprimierten Proteinen. ZZ-TUBA (Spur 2) oder ZZ-GCN5-S als Kontrolle (Spur 3) wurden immobilisiert und mit GST-TOP3 $\beta$  inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde die Proteine mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. IgG-HC: IgG, schwere Ketten.

dass auch gereinigtes TOP3 $\beta$  an gereinigtes, immobilisiertes TUBA band (siehe Abbildung 4-28B). Die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen ist also offensichtlich nicht von Linkerproteinen abhängig sondern erfolgt direkt.

Um weitere Hinweise über die beobachtete Interaktion von TUBA mit TOP3 $\beta$  zu erhalten, wurde die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine untersucht. Da kein geeigneter Antikörper gegen TOP3 $\beta$  zur Verfügung stand, wurde die Sequenz in den Vektor pEGFP-C2 kloniert und das Protein nach Transfektion von HeLa-Zellen als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass GFP-TOP3 $\beta$  ausschließlich im Cytoplasma der transfizierten Zellen zu finden war (siehe Abbildung 4-29). Dort überlappte das beobachtete Signal zum Teil mit der Lokalisation von TUBA (bestimmt durch indirekte Immunfluoreszenz). Im Zellkern wurde dagegen nur TUBA beobachtet. GFP-TOP3 $\beta$  zeigte also eine partielle Colokalisation mit endogenem TUBA in den untersuchten HeLa-Zellen, was für eine *in-vivo*-Interaktion der beiden Proteine im Cytoplasma spricht.



**Abbildung 4-29: GFP-TOP3b colokalisiert mit endogenem TUBA im Cytoplasma von HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-TOP3 $\beta$  transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Falschfarbendarstellung). 1: Fluoreszenz von rekombinantem GFP-TOP3 $\beta$ . 2: Indirekte Immunfluoreszenz von endogenem TUBA in den gleichen Zellen. 3: Überlagerung der GFP-TOP3 $\beta$ - und anti-TUBA-Aufnahme. 4: Phasenkontrastaufnahme der beobachteten Zellen.

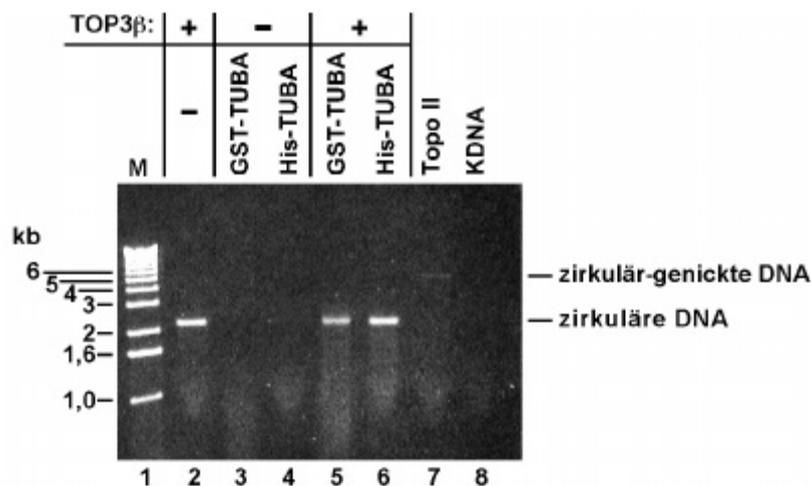
#### 4.2.3.3 TUBA hat keinen Einfluss auf die Topoisomerase-Aktivität von TOP3b *in vitro*

Die hier als TUBA-Interaktionspartner gefundene DNA-Topoisomerase TOP3 $\beta$  war erst kurze Zeit zuvor in Mensch und Maus entdeckt und beschrieben worden (Seki *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999). Aufgrund von Untersuchungen mit einem Hefe-Homolog wird diskutiert, dass TOP3 $\beta$  eine Rolle bei DNA-Reparaturprozessen und bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität spielen könnte (Gangloff *et al.*, 1994; Watt *et al.*, 1996). Die genaue Funktion des Proteins ist bisher jedoch nicht bekannt. Es war daher schwierig, funktionelle Experimente zu finden, um einen Einfluss der Interaktion mit TUBA zu untersuchen.

Die enzymatische Aktivität von TOP3 $\beta$  kann *in vitro* an der Auflösung catenaner DNA (Decatenierung) untersucht werden. Als Catenane werden ringförmige DNA-Moleküle bezeichnet, die wie Glieder einer Kette miteinander verknüpft sind. Natürlicherweise entstehen sie bei der Replikation zirkulärer DNAs und werden durch die Aktivität von DNA-Topoisomerasen voneinander getrennt. Als Substrat für Decatenierungsexperimente mit

TOP3 $\beta$  wurde Kinetoplast-DNA des Insekten-Trypanosomiden *Crithidia fasciculata* (Fa. TopoGen) verwendet. Die Inkubation dieser hochmolekularen DNA mit rekombinant exprimierter, aufgereinigter TOP3 $\beta$  führt zur Decatenierung, d. h. zur Freisetzung kleiner, ringförmiger DNA-Moleküle, die durch Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 4-30, Spur 2). Die unbehandelte Kinetoplast-DNA kann dagegen aufgrund ihrer Größe nicht ins Agarosegel einwandern (Spur 8). Nach Präinkubation von TOP3 $\beta$  mit verschiedenen gereinigten TUBA-Präparationen konnte keine nennenswerte Veränderung der Aktivität des Enzyms beobachtet werden (Spur 5 und 6). Entsprechend besitzt auch TUBA alleine keine Topoisomerase-Aktivität (Spur 3 und 4). Als Positivkontrolle der Decatenierung wurde humane DNA-Topoisomerase-II verwendet, deren Aktivität hauptsächlich zur Bildung „zirkulär-genickter“ DNA (ringförmige DNA mit Einzelstrangbruch) führte (Spur 7).

Anders als bei der Interaktion von SMNr<sub>p</sub> mit der Histon-Acetyltransferase GCN5-S führt hier die Bindung von TUBA an nicht zu einer offensichtlichen Beeinflussung der enzymatischen Aktivität des Interaktionspartners. Die zelluläre Funktion von TOP3 $\beta$  und die *in-vivo*-Substrate des Enzyms sind allerdings auch noch nicht bekannt. Insofern ist die Bedeutung der Interaktion des Proteins mit TUBA noch unklar.



**Abbildung 4-30: TUBA hat keinen Einfluss auf die Aktivität von TOP3 $\beta$  bei der Decatenierung von Kinetoplast-DNA.** 20 ng GST-TOP3 $\beta$  wurden mit Reaktionspuffer (Spur 2), mit 120 ng GST-TUBA (Spur 5) oder mit 20 ng His-TUBA (Spur 6) präinkubiert. Als Kontrolle auf intrinsische Aktivität wurden 120 ng GST-TUBA (Spur 3) oder 20 ng His-TUBA (Spur 4) mit Reaktionspuffer präinkubiert. Zur Decatenierung wurden je 150 ng Kinetoplast-DNA (KDNA) zugegeben. Nach der Reaktion wurden die DNAs durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle wurden 150 ng KDNA mit 2 u DNA-Topoisomerase-II (Fa. USB) inkubiert (Spur 7). In Spur 8 ist die unbehandelte KDNA aufgetragen, die nicht ins Agarosegel einwandert, Spur 1 zeigt einen DNA-Größenmarker.

#### 4.2.4 *FMRP*, das Krankheitsgenprodukt des Fragilen-X-Syndroms, und seine Homologe interagieren mit TUBA

##### 4.2.4.1 FXR1 wird als Interaktionspartner von TUBA im *Two-Hybrid-Screen* gefunden

Ein zweiter Ansatz bei der Suche nach Bindungspartnern war die Durchführung eines *Two-Hybrid-Screens* mit TUBA als *bait*-Konstrukt. Hierfür wurde das „Pretransformed Matchmaker Library“-System (Fa. Clontech) verwendet und insgesamt  $2 \cdot 10^6$  cDNA-Klone aus einer humanen, aus Gehirn stammenden cDNA-Bank getestet. Mehrere Proteine wurden so zunächst als putative Interaktoren von TUBA identifiziert. In Tabelle 4-2 sind die Kandidaten mit stärkster Interaktion im *Two-Hybrid-Screen* aufgelistet. Neben falsch positiven oder bisher noch unbeschriebenen Proteinen wurde interessanterweise FXR1 als möglicher TUBA-Bindungspartner gefunden.

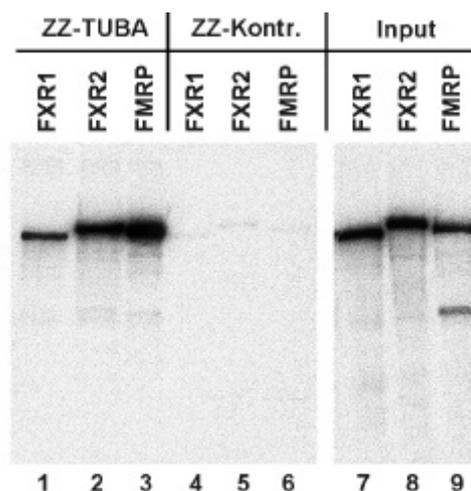
*FXR1* ist eines der beiden autosomalen Homologen von *FMRI*, dem Krankheitsgen des Fragilen-X-Syndroms (Siomi *et al.*, 1995). Das Fragile-X-Syndrom ist die häufigste erbliche Form mentaler Retardation des Menschen mit einer geschätzten Prävalenz von 1:4000 bei Männern und 1:6000 bei Frauen (Turner *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 1997). Den Patienten

TUBA-Interaktoren im <i>Two-Hybrid-Screen</i>	GenBank-Accession	Stärke der Interaktion
Novel centrosomal protein RanBPM (RANBPM)	NM_005493.1	++
Microtubule-associated protein 1a (MAP1A)	U38292.1	++
Fragile X mental retardation, autosomal homolog 1 (FXR1)	NM_005087.1	++
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	S40719.1	++
CUG triplet repeat, RNA-binding protein 2 (CUGBP2)	NM_006561.1	++
Zinc-finger protein (ZNF76) gene	M91592.1	++
RAB28, member RAS oncogene family (RAB28)	NM_004249.1	++
Ribosomal protein L12 (RPL12)	NM_000976.1	+
Homo sapiens clone 24627 mRNA sequence	AF070618.1	+
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566K1924 hypothetical protein	AL110235.1	+

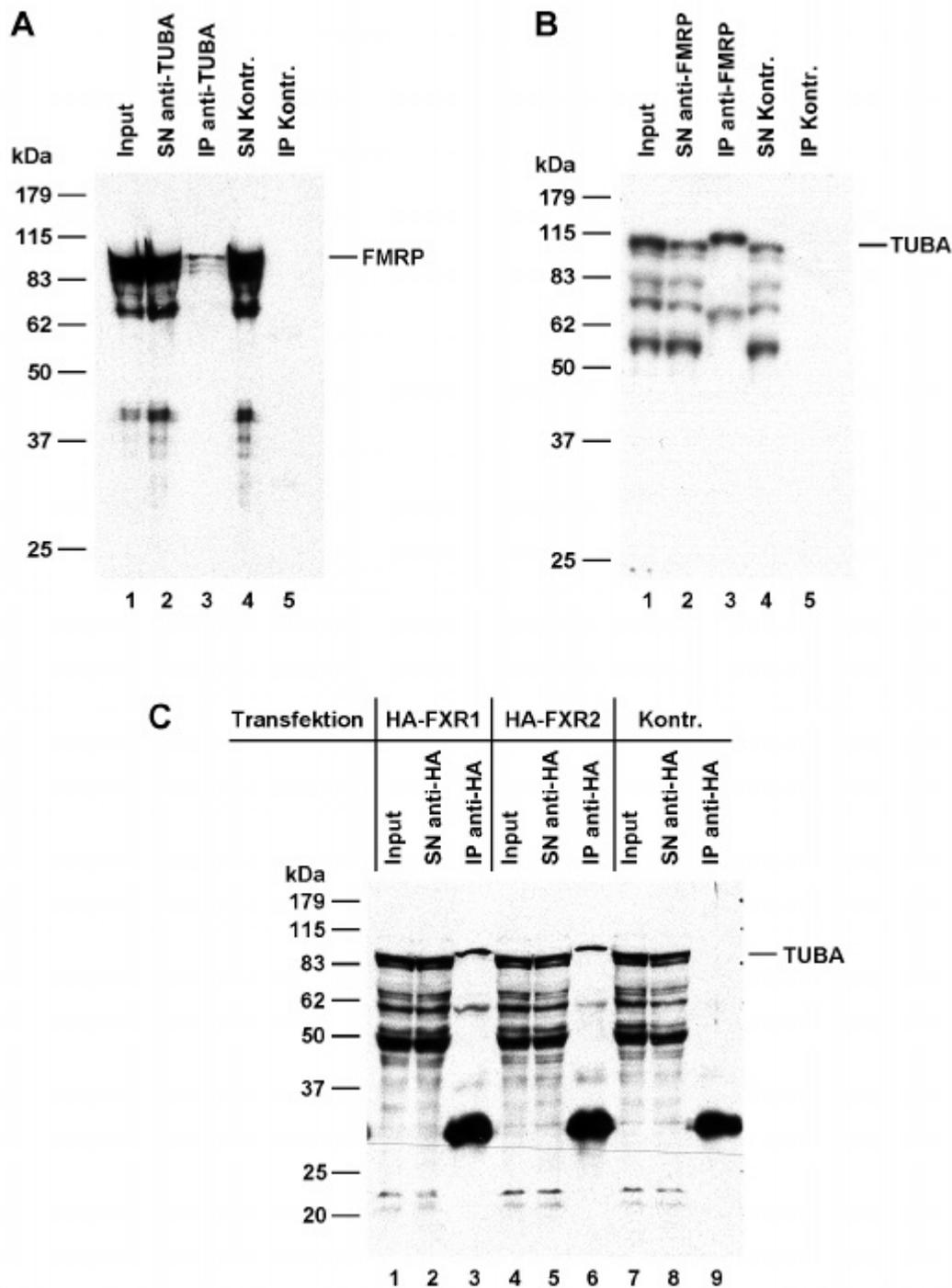
**Tabelle 4-2: *FXR1* ist ein starker Interaktor von TUBA im *Two-Hybrid-Screen*.** Die Tabelle fasst die im *Two-Hybrid-Screen* identifizierten, potentiellen Interaktionspartner von TUBA zusammen. Die *GenBank-Accession*-Nummern der einzelnen Klone sind angegeben. Die rechte Spalte gibt die relative Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe-Kolonien auf SDC-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin als Maß für die Stärke der Interaktion wieder.

fehlt das *FMR1*-Genprodukt, das Protein FMRP, aufgrund einer CGG-Trinucleotidexpansion im Promotorbereich des Gens, die zur Inhibition seiner Transkription führt. Die Expression der beiden Homologen FXR1 und FXR2 ist dagegen unbeeinflusst. Alle drei Produkte dieser Genfamilie sind RNA-bindende Proteine und bilden Homo- und Heterodimere untereinander. Sie werden mit dem Zellkern-Cytoplasma-Transport von mRNA und mit der Kontrolle der mRNA-Translation an Ribosomen in Verbindung gebracht (Imbert *et al.*, 1998; Jin und Warren, 2000). Ihre genauen Funktionen aber – und damit auch der Mechanismus der Krankheitsentstehung beim Fehlen von FMRP – sind bisher noch nicht verstanden. Eine mögliche Interaktion dieser Proteine mit TUBA war nicht zuletzt auch deshalb interessant, weil auch andere Tudor-Domänen-Proteine, SMN und SMNrp eingeschlossen, häufig an RNA-metabolen Prozessen beteiligt sind.

Zunächst wurde versucht, die im *Two-Hybrid-Screen* beobachtete Interaktion von TUBA mit FXR1 *in vitro* nachzuvollziehen. Dazu wurden Bindungsexperimente mit immobilisiertem ZZ-TUBA und durch *in-vitro*-Translation radioaktiv markiertem FXR1 durchgeführt. Gleichzeitig wurde so auch eine Bindung von TUBA an FMRP und FXR2 getestet (cDNA-Klone aller drei Proteine wurden freundlicherweise von Dr. Bernhard Laggerbauer, MPI für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt). Das Bindungsexperiment bestätigte die TUBA-FXR1-Interaktion (siehe Abbildung 4-31, Spur 1). Darüberhinaus wurden auch die beiden Homologen FMRP und FXR2 effizient an TUBA gebunden (Spur 2 und 3). In



**Abbildung 4-31: TUBA interagiert mit FMRP, dem Produkt des Krankheitsgens des Fragilen-X-Syndroms, und seinen Homologen FXR1 und FXR2.** ZZ-TUBA (Spur 1-3) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 4-6) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit *in-vitro*-translatiertem, [<sup>35</sup>S]-markiertem FXR1 (Spur 1 und 4), FXR2 (Spur 2 und 5) oder FMRP (Spur 3 und 6) inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Translate durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Input (Spur 7-9): je 30% der eingesetzten Translate.



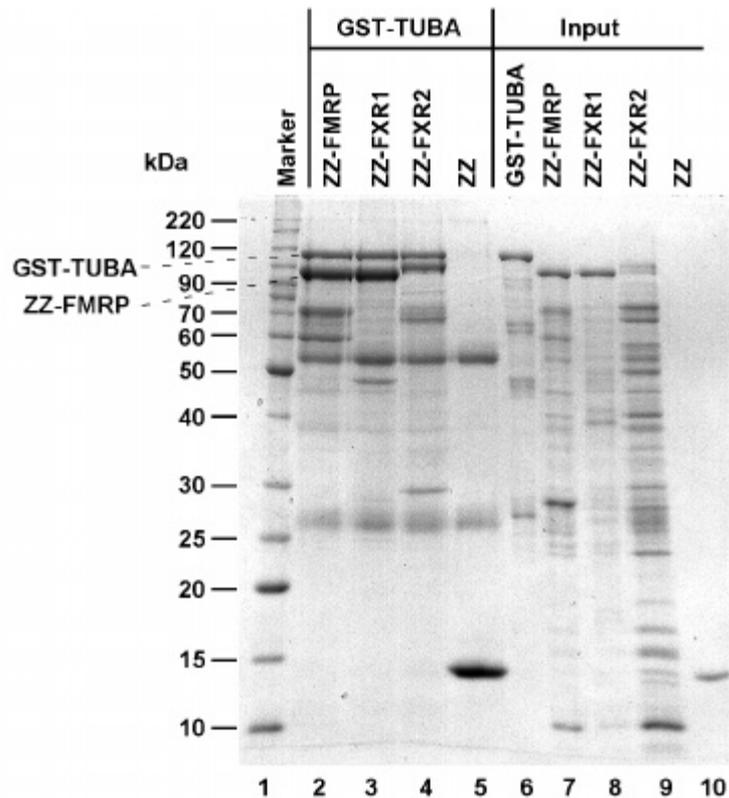
**Abbildung 4-32 TUBA lässt sich zusammen mit FMRP, FXR1 und FXR2 immunpräzipitieren.** **A:** Immunpräzipitation aus 293-Gesamtzell-extrakten. Es wurde mit anti-TUBA (Spur 3) oder einem unspezifischen Kontrollserum (Spur 5) immunpräzipitiert, mit IP-Puffer gewaschen und mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. FMRP wurde durch Westernblot mit anti-FMRP detektiert. Input (Spur 1) und Überstände der Präzipitationen (Spur 2 und 4): je 5% der Extraktmengen in der Immunpräzipitation. **B:** Immunpräzipitation wie in A. Hier wurde mit anti-FMRP (Spur 3) oder anti-HA als Kontrolle (Spur 5) präzipitiert und TUBA durch Westernblot mit anti-TUBA detektiert. **C:** Immunpräzipitation aus Gesamtzell-extrakten transfizierter 293-Zellen. Die Zellen wurden mit pHA-FXR1 (Spur 1-3), pHA-FXR2 (Spur 4-6) oder pHA-GFAP als Kontrolle (Spur 7-9) transfiziert. Es wurde mit anti-HA präzipitiert und TUBA durch Westernblot detektiert. Input (Spur 1, 4 und 7) und Überstände (2, 5 und 8): je 10% der Extraktmenge in der Immunpräzipitation.

gleichen Bindungsstudien mit den anderen Two-Hybrid-Kandidaten RANBPM, MAP1A, GFAP, CUGBP2, ZNF76, RAB28 und RPL12 konnte keine Interaktion mit TUBA beobachtet werden. Es handelt sich daher bei ihnen vermutlich um falsch-positive Klone.

#### **4.2.4.2 FMRP, FXR1 und FXR2 binden direkt an TUBA und lassen sich copräzipitieren**

Über Immunpräzipitationen wurde nun getestet, ob die *in vitro* beobachtete Interaktion von TUBA mit den Produkten der *FMR1*-Genfamilie auch *in vivo* relevant ist. Dazu wurden TUBA und FMRP aus Gesamtzellextrakten von 293-Zellen immunpräzipitiert und durch Westernblot eine wechselseitige Copräzipitation überprüft („anti-FMRP“, ein monoklonaler FMRP-spezifischer Maus-Antikörper wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Eva Keidel, MPI für Biochemie, Martinsried). Es konnte so gezeigt werden, dass FMRP mit TUBA copräzipitiert wird und umgekehrt (siehe Abbildung 4-32, A und B). Immunpräzipitationen mit Kontrollantikörpern waren in beiden Fällen negativ. Es wurde beobachtet, dass nur ein geringer Teil des Gesamt-FMRP aus dem Extrakt mit TUBA copräzipitiert wurde (Abbildung 4-32A), umgekehrt scheint ein größerer Anteil von TUBA mit FMRP assoziiert zu sein (Abbildung 4-32B). Da für FXR1 und FXR2 keine geeigneten Antikörper zur Verfügung standen, wurden beide in den Vektor pHA kloniert und in 293-Zellen als HA-Fusionsproteine exprimiert. Aus Zellextrakten konnten die Proteine so mit einem HA-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Im Westernblot wurde nachgewiesen, dass auch hier TUBA mit (HA-) FXR1 und FXR2 copräzipitiert wurde (siehe Abbildung 4-32C). Die beobachteten Copräzipitationen aus Zellextrakten sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass TUBA auch *in vivo* mit FMRP und seinen Homologen interagiert.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die beobachteten Interaktionen unmittelbar erfolgen oder von Linkerproteinen in den Extrakten vermittelt werden. Dazu wurden rekombinant exprimiertes und gereinigtes ZZ-FMRP, ZZ-FXR1 und ZZ-FXR2 an IgG-Sepharose immobilisiert und mit gereinigtem GST-TUBA inkubiert. In allen drei Fällen wurde so eine direkte Bindung von TUBA nachgewiesen (siehe Abbildung 4-33, Spur 1-3). In der Coomassiefärbung zeigte sich zudem, dass TUBA in einem 1:1-Verhältnis an die Proteine der FMRP-Familie bindet.

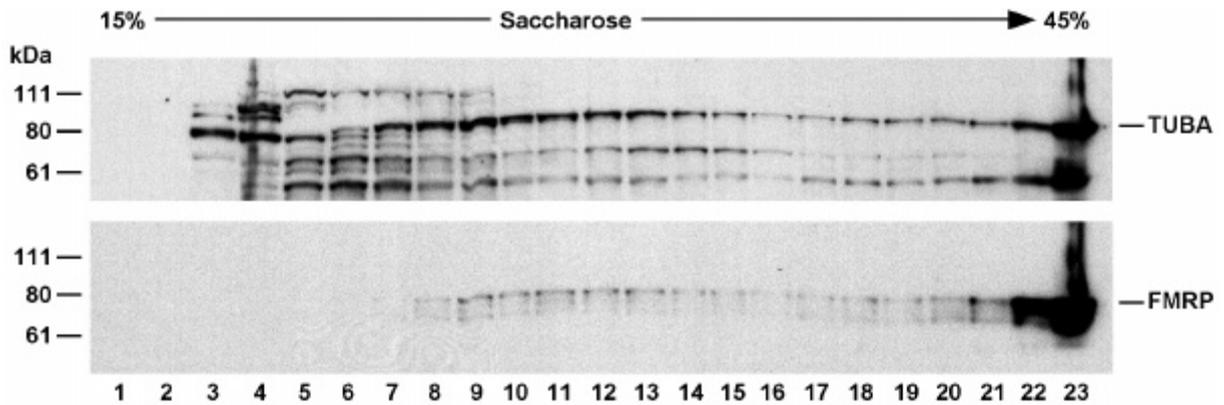


**Abbildung 4-33:** Die Bindung von TUBA an die Proteine der FMRP-Familie erfolgt direkt. Bindungsexperiment mit rekombinant exprimierten, gereinigten Proteinen. ZZ-FMRP (Spur 2), ZZ-FXR1 (Spur 3), ZZ-FXR2 (Spur 4) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 5) wurden immobilisiert und mit GST-TUBA inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Proteine mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Spur 6-10 zeigt je 10% der eingesetzten Proteine, Spur 1 einen Molekulargewichtsmarker.

#### 4.2.4.3 TUBA und FMRP zeigen ein ähnliches Laufverhalten bei der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und colokalisieren partiell im Cytoplasma

FMRP ist in der Zelle Teil makromolekularer Komplexe. Diese haben unterschiedliche Größen, vermutlich durch unterschiedliche Protein-Zusammensetzungen und die Assoziation mit (verschieden großen) mRNAs. Bei der Ultrazentrifugation von Zellextrakten zeigt FMRP daher ein heterogenes Sedimentationsverhalten: Das Protein verteilt sich über viele Fraktionen im hochmolekularen Bereich eines Dichtegradienten (siehe Abbildung 4-34 unten). Die Sedimentations-Analyse von TUBA in HeLa-Gesamtzellextrakten ergab, dass das Protein im Gradienten ähnlich verteilt ist wie FMRP (Abbildung 4-34 oben). Dieses Laufverhalten ist mit verschiedenen Extrakten und Gradienten reproduzierbar. Es deutet darauf hin, dass beide Proteine *in vivo* miteinander wechselwirken und Teil der gleichen makromolekularen Komplexe sein könnten.

Weitere Hinweise auf eine Interaktion von FMRP und TUBA *in vivo* ergaben sich aus Immunlokalisationsstudien. Dazu wurden die beiden Proteine zunächst in HeLa-Zellen mit

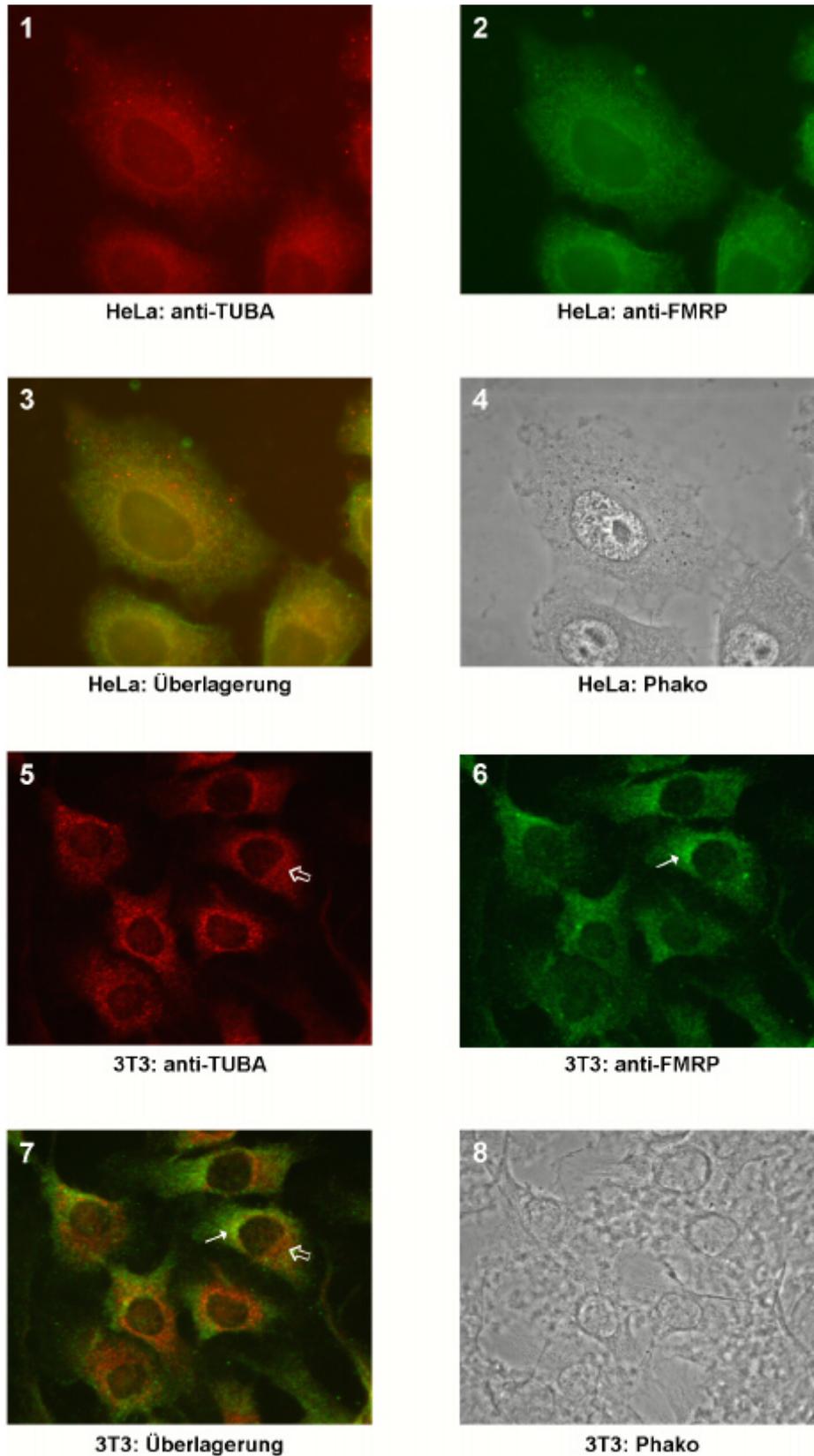


**Abbildung 4-34: TUBA und FMRP zeigen ein ähnliches Sedimentationsverhalten bei der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von Zellextrakten.** HeLa-Gesamtzellextrakt wurde über einen 15- bis 45-prozentigen Saccharosegradienten ultrazentrifugiert. Die Proteine aus 23 Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und TUBA (oben) oder FMRP (unten) durch Westernblot nachgewiesen.

Antikörpern markiert und durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass TUBA und FMRP im Cytoplasma der analysierten Zellen colokalisieren (siehe Abbildung 4-35, Bild 1 bis 3). Für beide Proteine wurde besonders auch die schon bei der TUBA-Lokalisation alleine gesehene, kernnahe Struktur angefärbt. Bei Immunlokalisationen in 3T3-Zellen zeigte sich dagegen keine vollständige Überlappung der TUBA- und FMRP-Signale im Cytoplasma. Hier wurden die stärksten Signale beider Proteine oft auf verschiedenen Seiten des Zellkerns gefunden (siehe Abbildung 4-35, Bild 5 bis 7: Pfeile). Diese nur partielle Colokalisation ist konsistent mit den Ergebnissen der Co-Immunpräzipitation, die zeigten, dass das endogene FMRP in Extrakten nur zum Teil mit TUBA assoziiert ist.

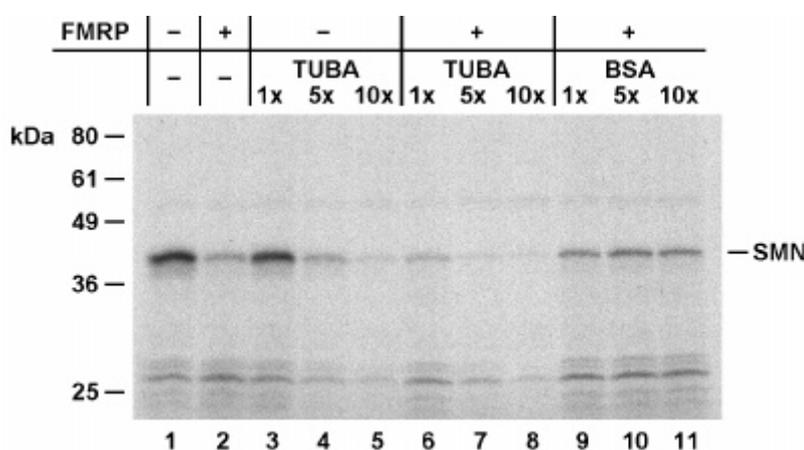
#### 4.2.4.4 Ein Einfluss von TUBA auf die Aktivität von FMRP als Inhibitor der Translation ist nicht nachweisbar

Die zelluläre Funktion von FMRP ist bisher nicht genau bekannt. Es wird diskutiert, dass das RNA-bindende Protein am spezifischen Kern-Cytoplasma-Transport von mRNAs und an der Kontrolle der Translation beteiligt ist. In der Tat konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von FMRP die Translation verschiedener mRNAs *in vitro* inhibiert werden kann (Laggerbauer *et al.*, 2001). Es stellte sich daher die Frage, ob TUBA einen Einfluss auf diese Funktion von FMRP hat. Um dies zu überprüfen, wurden die rekombinant exprimierten gereinigten Proteine zusammen mit *in vitro* transkribierter mRNA, Kaninchen-Reticulocytenslysat (Fa. Amersham), Aminosäuren und [<sup>35</sup>S]-Methionin inkubiert. Die synthetisierten Translate werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. In ersten Translationsexperimenten mit TUBA voller Länge stellte sich heraus, dass das Protein selbst schon in der Lage war, die Translation zu



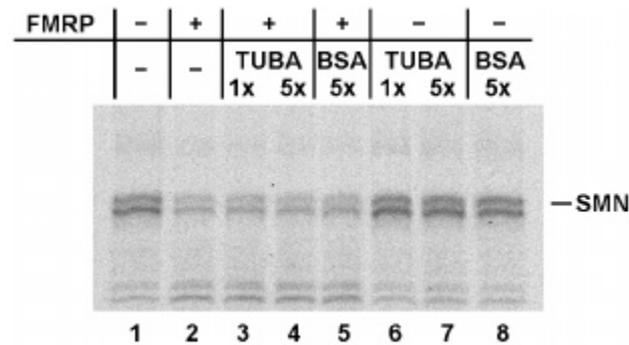
**Abbildung 4-35: FMRP und TUBA colocalisieren partiell im Cytoplasma.** HeLa-Zellen (Bild 1-4) und 3T3-Zellen (Bild 5-8) wurden mit anti-TUBA und anti-FMRP markiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Falschfarbendarstellung). 1 und 5: Indirekte Immunfluoreszenz mit anti-TUBA. 2 und 6: Indirekte Immunfluoreszenz der gleichen Zellen mit anti-FMRP. 3 und 7: Überlagerung des anti-TUBA- und anti-FMRP-Bildes. 4 und 8: Phasenkontrastaufnahme der Zellen von 1-3 bzw. 5-7. An einer 3T3-Zelle ist die kernnahe Lokalisation von TUBA (dicker Pfeil) und FMRP (dünner Pfeil) hervorgehoben.

inhibieren (siehe Abbildung 4-36). Die Inhibition wird aber erst bei Zugabe einer mindestens fünffach molaren Menge erreicht, verglichen mit der Menge von FMRP die für einen solchen Effekt verantwortlich ist (vgl. Spur 2 mit 4). TUBA ist ein sehr basisches Protein – der isoelektrische Punkt wurde anhand der Sequenz mit pH 9,7 errechnet – und kann bei physiologischem pH-Wert unspezifisch an Nukleinsäuren binden (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu FMRP besitzt es keine der bekannten RNA-Bindungsdomänen. Die beobachtete Translation-inhibierende Wirkung bei Zugabe größerer Mengen TUBA ist daher sehr wahrscheinlich auf das unspezifische „Abfangen“ der mRNA im Versuchsansatz zurückzuführen. Entsprechend hatte die Zugabe beider Proteine einen additiven Effekt, d. h. sie führte zu einer verstärkten Inhibition der Translation (Spur 6-8).



**Abbildung 4-36: TUBA voller Länge hemmt in größeren Mengen die Translation einer mRNA in vitro.** Autoradiographie eines *in-vitro*-Translationsexperiments. 75 ng His-FMRP wurden mit Reaktionspuffer (Spur 2), oder einer 1fachen, 5fachen oder 10fachen molaren Menge von His-TUBA (Spur 6-8) oder von BSA als Kontrolle (Spur 9-11) präinkubiert. Anschließend wurden zur *in-vitro*-Translation je 20 ng SMN-mRNA und der Reaktionsmix aus Reticulocytenslysate mit Aminosäuren und [<sup>35</sup>S]-Methionin zugegeben. Die Translate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Spur 1 zeigt die Translation der mRNA ohne rekombinante Proteine, Spur 3-5 nach Zugabe von His-TUBA alleine (80, 400 und 800 ng, entsprechend den in Ansatz 6-8 mit FMRP präinkubierten Mengen).

Da der Einfluss auf die Wirkung von FMRP als Inhibitor der Translation mit TUBA voller Länge so nicht getestet werden konnte, wurde der Versuch mit einem C-terminalen Fragment des Proteins (TUBA<sub>558-744</sub>) wiederholt, das mit hoher Effizienz noch an FMRP bindet (vgl. Abbildung 4-42, Seite 111). Im Gegensatz zum Protein voller Länge inhibiert TUBA<sub>558-744</sub> alleine die Translation nicht (bis zu einer fünffach molaren Menge verglichen mit FMRP, siehe Abbildung 4-37, Spur 6 und 7). Die Präinkubation von FMRP mit diesem Fragment führt allerdings zu keiner sichtbaren Verstärkung (oder Verringerung) der inhibitorischen Wirkung (vgl. Spur 2 mit 3 und 4). Zusammengefasst war also ein Einfluss von TUBA auf die Translation-inhibierende Wirkung von FMRP *in vitro* nicht nachweisbar.

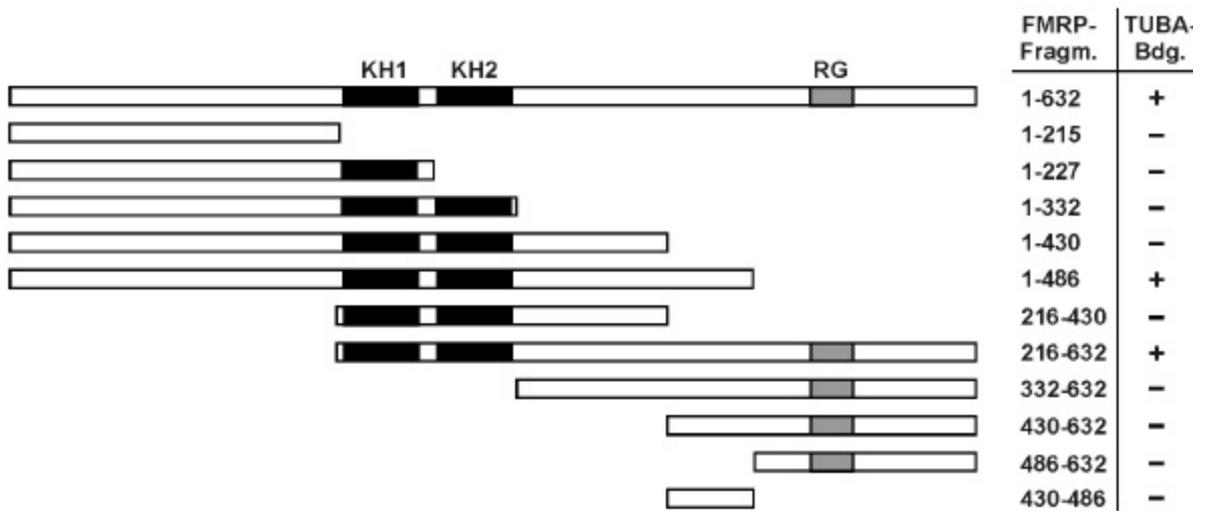
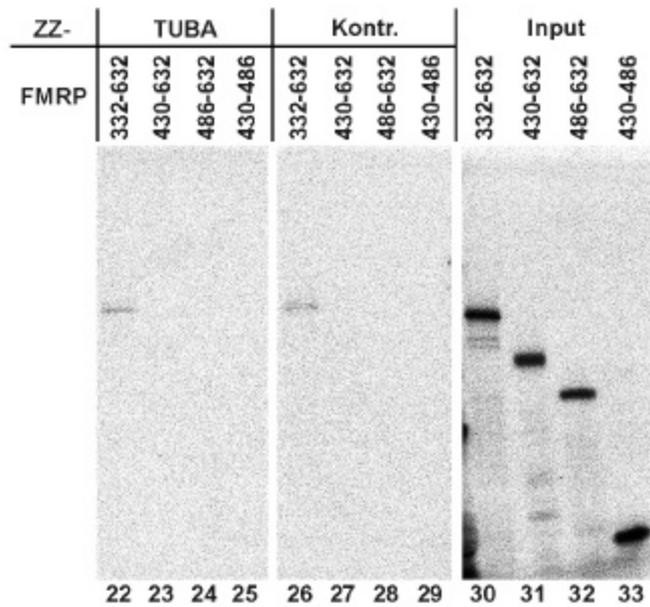
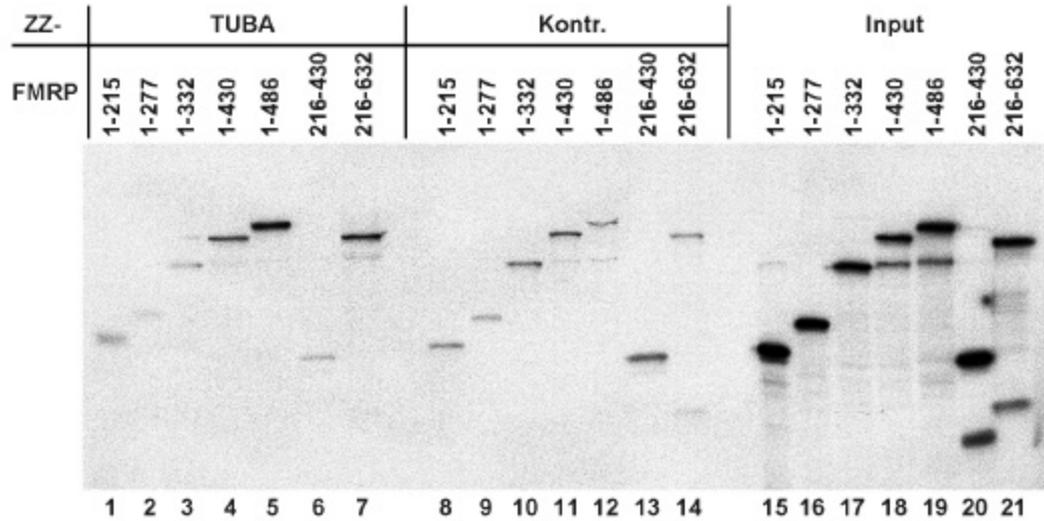


**Abbildung 4-37:** Ein C-terminales TUBA-Fragment ( $TUBA_{558-744}$ ), das noch an FMRP bindet, hat keinen Einfluss auf dessen Translation-inhibierende Wirkung. Autoradiographie eines *in-vitro*-Translationsexperiments wie in Abbildung 4-36 gezeigt. 75 ng His-FMRP wurde hier mit Reaktionspuffer (Spur 2) oder einer 1fachen oder 5fachen molaren Menge  $TUBA_{558-744}$  (Spur 3-4) oder einer 5fachen Menge BSA (Spur 5) präinkubiert. Spur 1 zeigt die Translation der mRNA ohne Zugabe rekombinanter Proteine, Spur 6-8 nach Zugabe von His-TUBA oder BSA alleine (Mengen entsprechend den in Ansatz 3-5 mit FMRP präinkubierten Mengen).

#### 4.2.4.5 Zwei unterschiedliche Regionen in der FMRP-Sequenz sind für die Bindung an TUBA verantwortlich

FMRP ist ein aus 632 Aminosäuren bestehendes Protein, das drei konservierte RNA-Bindungsmotive enthält. In seinem mittleren Abschnitt werden zwei KH-Domänen (KH1 und KH2; siehe Schema in Abbildung 4-38 unten), im C-terminalen Abschnitt eine Arginin-Glycin-reiche Domäne (RGG-Box) gefunden. Im folgenden wurde mit Bindungsexperimenten untersucht, welcher Bereich des Proteins für die Interaktion mit TUBA verantwortlich ist. Dazu wurden insgesamt 11 verschiedene Deletionsmutanten von FMRP kloniert, durch *in-vitro*-Translation radioaktiv markiert und deren Bindung an immobilisiertes ZZ-TUBA getestet. Interessanterweise wurde dabei festgestellt, dass zwei unterschiedliche Bereiche in der Primärstruktur für die Bindung an TUBA essentiell sind (siehe Abbildung 4-38). Zum einen ist der Abschnitt von Aminosäure 430 bis 486 an der Bindung beteiligt. So ist die Bindung von  $FMRP_{1-430}$  an ZZ-TUBA (Spur 4) nicht größer als die an die ZZ-Kontrolle (Spur 11), die von  $FMRP_{1-486}$  aber im Vergleich deutlich (vgl. Spur 5 mit Spur 12, unglücklicherweise zeigen einige der FMRP-Fragmente eine relativ hohe Hintergrundbindung an das ZZ-Kontrollpeptid.). Zum zweiten wird der Bereich, der die beiden KH-Domänen trägt (Aminosäure 216-332), für die TUBA-Bindung benötigt, so wird  $FMRP_{216-632}$  noch effektiv

**Abbildung 4-38 (gegenüberliegende Seite):** Die Bindung von FMRP an TUBA wird von zwei Abschnitten in der Primärstruktur des Proteins vermittelt. **Oben und Mitte:** Autoradiographie von *in-vitro*-Bindungsexperimenten. ZZ-TUBA (Spur 1-7 und 22-25) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 8-14 und 26-29) wurden immobilisiert und mit radioaktiv markierten Translaten der angegebenen FMRP-Deletionsfragmente inkubiert. Nach Waschen mit P300 wurde mit Probenpuffer eluiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Spur 15-21 und 30-33 zeigen je 30 % der eingesetzten Translate. **Unten:** Die Balken zeigen schematisch die Primärstrukturen der getesteten FMRP-Fragmente mit den Positionen der KH-Domänen und der RGG-Box (RG). Die Tabelle daneben fasst die Ergebnisse der Bindungsexperimente zusammen.



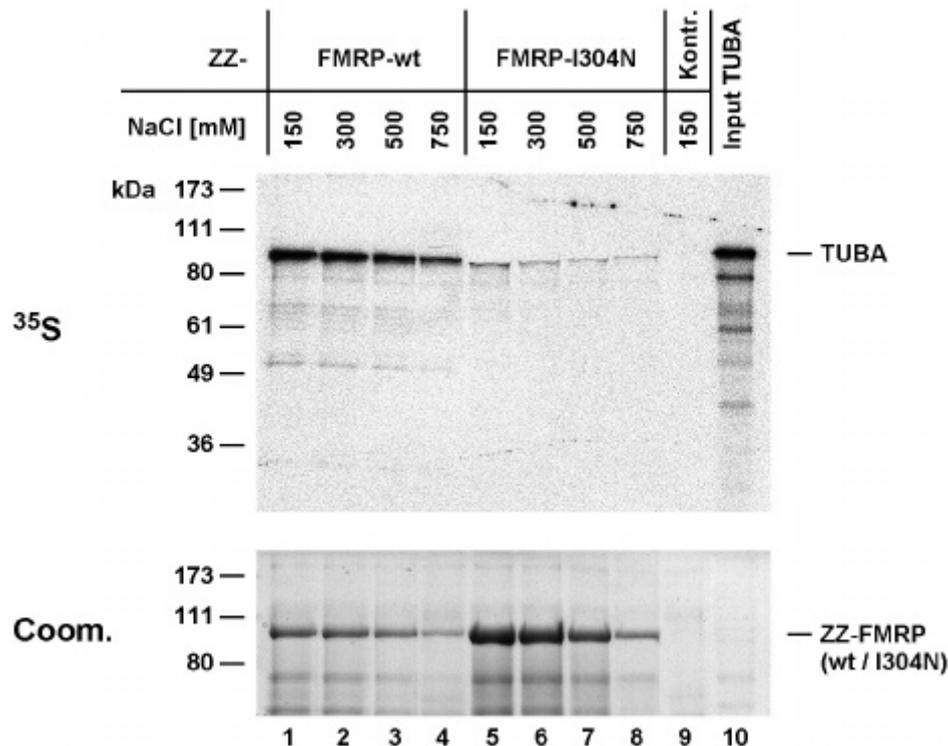
gebunden (Spur 7), FMRP<sub>332-632</sub> dagegen nicht mehr (Spur 22). Fragmente, die nur eine der beiden Bindungsstellen enthalten, interagieren nicht mit TUBA. Daher ist anzunehmen, dass beide Abschnitte der Primärstruktur im gefalteten Protein in räumlicher Nähe zueinander liegen und zusammen die TUBA-Bindungsstelle konstituieren.

#### **4.2.4.6 Die in Patienten gefundene Punktmutante FMRP-I304N bindet nicht mehr an TUBA**

In Patienten mit Fragilem-X-Syndrom wird in der Regel eine CGG-Trinucleotidexpansion im Promotorbereich des *FMRI*-Gens gefunden, was zur Inaktivierung der Transkription des Gens führt (Imbert *et al.*, 1998). Die Symptomatik der Krankheit wird demnach durch einen Mangel an FMRP in den Zellen hervorgerufen. Es ist aber auch ein Patient mit schwerer Form der Krankheit bekannt, bei dem die Expression von FMRP nicht gestört ist (De Boulle *et al.*, 1993). Bei diesem Patienten wurde statt der Trinucleotidexpansion eine Punktmutation innerhalb des offenen Leserasters von FMRP gefunden. Die Mutation führt zu einem Aminosäure-Austausch innerhalb der zweiten KH-Domäne (Ile<sub>304</sub> zu Asn, kurz: I304N). Die Folgen dieser Mutation auf molekularer Ebene sind noch nicht genau verstanden, so ist z.B. die RNA-Bindungs Kapazität des mutierten Proteins *in vitro* unverändert (Brown *et al.*, 1998; Lagerbauer *et al.*, 2001). Lagerbauer *et al.* (2001) konnten aber zeigen, dass FMRP-I304N einen Dimerisierungsdefekt aufweist und *in vitro* keinen inhibitorischen Einfluss mehr auf die Translation hat. In der Zelle ist das Protein offenbar nicht funktionell, was, wie das komplette Fehlen von FMRP, zur Entstehung des Syndroms führt.

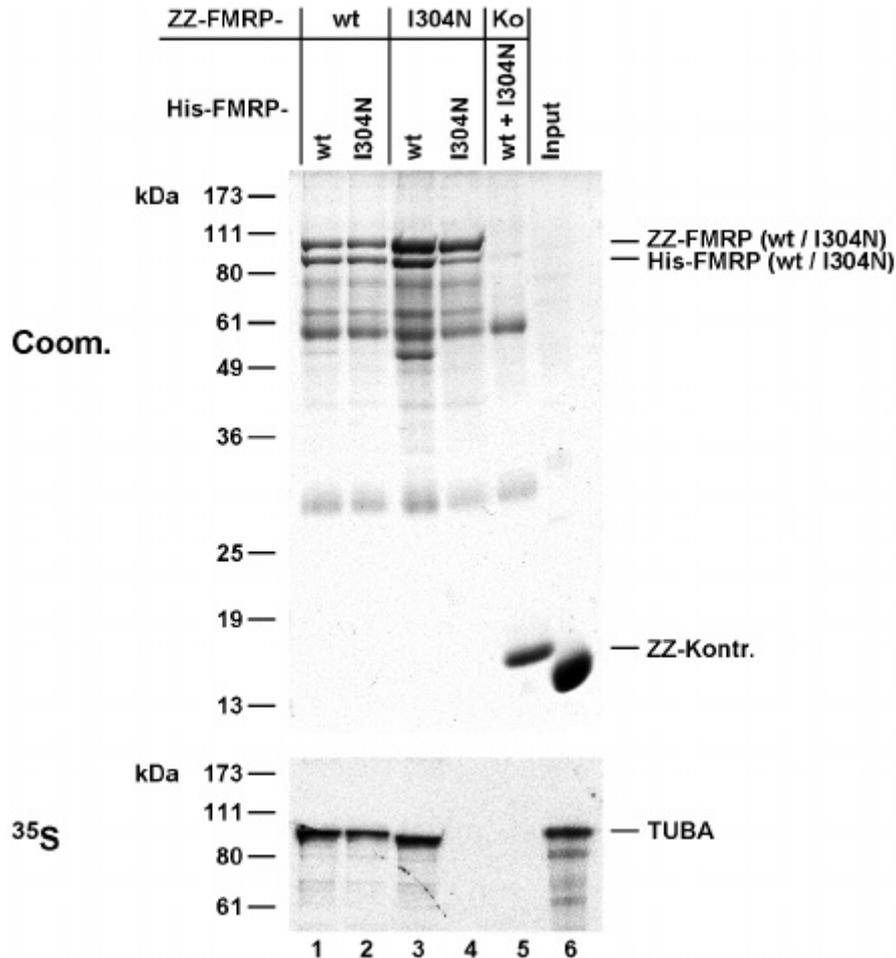
Der Proteinabschnitt, der die beiden KH-Domänen trägt, ist, wie oben gezeigt, an der Bindung von FMRP an TUBA beteiligt. Daher wurde nun durch *in-vitro*-Bindungsexperimente untersucht, ob der I304N-Aminosäure-Austausch diese Interaktion beeinflusst. Um graduelle Unterschiede mit Wildtyp-FMRP besser beobachten zu können, wurden die Versuchsansätze mit steigender Stringenz (durch steigende NaCl-Konzentration im Puffer) gewaschen. Erstaunlicherweise zeigten die Versuche, dass die Austauschmutante FMRP-I304N in ihrer TUBA-Bindung stark beeinträchtigt ist (siehe Abbildung 4-39). Schon bei der geringsten (physiologischen) Salzkonzentration binden hier nur noch weniger als 10 Prozent der Menge an TUBA-Translat, die an Wildtyp-FMRP gebunden wird (vgl. Spur 1 mit Spur 5). Wie geschildert, verursacht der Aminosäure-Austausch im Patienten einen starken Phänotyp. Es ist daher gut möglich, dass der gefundene TUBA-Bindungsdefekt ursächlich an der Entstehung der Krankheitssymptome beteiligt ist. Die Interaktion von Wildtyp-FMRP mit TUBA ist dagegen sehr stabil. Auch bei 750 mM NaCl, der höchsten getesteten Salzkonzentration, ist

das Signal des gebundenen TUBA-Translats nur wenig schwächer als unter physiologischen Bedingungen (vgl. Spur 1 mit Spur 4). Die Coomassie-Färbung zeigt dabei, dass bei dieser hohen NaCl-Konzentration schon ein Teil des immobilisierten ZZ-FMRP von der IgG-Sepharose abgewaschen wurde. Relativ zu der noch gebundenen ZZ-FMRP-Menge ist die Interaktion mit TUBA hier sogar unverändert.



**Abbildung 4-39:** Die in einem Patienten gefundene Punktmutante *FMRP-I304N* kann nicht mehr an *TUBA* binden. ZZ-FMRP-Wildtyp (Spur 1-4), ZZ-FMRP-I304N (Spur 5-8) oder das ZZ-Peptid als Kontrolle (Spur 9) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit [<sup>35</sup>S]-markiertem, *in-vitro*-translatiertem TUBA inkubiert. Anschließend wurde je fünfmal mit P150 (Spur 1, 5 und 9), P300 (Spur 2 und 6), P500 (Spur 3 und 7) oder P750 (Spur 4 und 8) gewaschen. Die Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und das TUBA-Translat durch Autoradiographie sichtbar gemacht (oberer Teil). In Spur 9 sind 30 % des eingesetzten Translats aufgetragen. Der untere Teil der Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Gels nach Coomassie-Färbung.

Konsistent mit dem Befund, dass *FMRP-I304N* keine Aktivität als Inhibitor der Translation hat, konnten Lagerbauer *et al.* (2001) zeigen, dass die Punktmutante nicht mehr mit sich selbst interagieren kann. Dieser Homodimerisierungs-Defekt könnte also der Grund für den Aktivitätsverlust von *FMRP-I304N* sein. Dadurch wurde die Frage aufgeworfen, ob die Dimerisierung von *FMRP* eine Voraussetzung für die Interaktion mit *TUBA* darstellt. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Bindungsexperimente mit immobilisiertem ZZ-FMRP durchgeführt, das zuvor mit His-FMRP dimerisiert worden war. Es zeigte sich dabei, dass der Dimerisierungsdefekt von *FMRP-I304N* nicht vollständig ist. Wie von Lagerbauer *et al.* (2001) für *in-vitro*-translatierte Proteine beschrieben, ist auch hier die Bildung von



**Abbildung 4-40: FMRP-I304N zeigt noch geringe Dimerisierung aber keine TUBA-Interaktion mehr.** ZZ-FMRP-Wildtyp (Spur 1 und 2) oder ZZ-FMRP-I304N (Spur 3 und 4) wurden an IgG-Sepharose immobilisiert und mit His-FMRP-Wildtyp (Spur 1 und 3) oder His-FMRP-I304N (Spur 2 und 4) dimerisiert. Als Kontrolle wurde das ZZ-Peptid immobilisiert und His-FMRP-Wildtyp zusammen mit -I304N zugegeben (Spur 5). Anschließend wurden die Proteine mit [<sup>35</sup>S]-markiertem TUBA-Translat inkubiert. Die Ansätze wurden mit P300 gewaschen, die Proteine mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (oberer Teil) und Autoradiographie (unterer Teil) sichtbar gemacht. Spur 6 zeigt 30 % des eingesetzten TUBA-Translats.

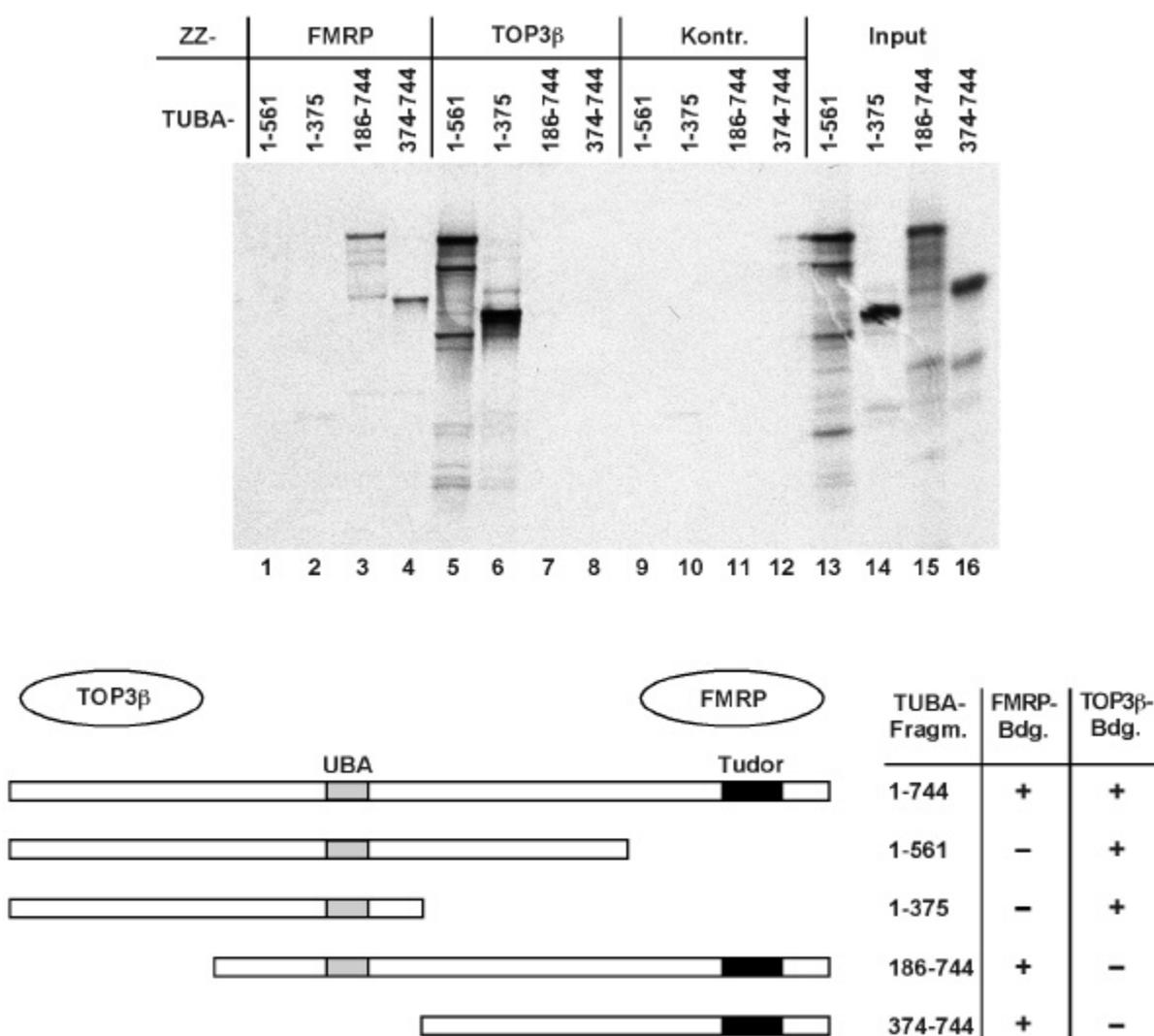
Heterodimeren mit Wildtyp-FMRP nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 4-40, Spur 2 und 3, oben). Die Bindung von *in-vitro*-translatiertem TUBA an die Heterodimere ist gegenüber der Bindung an Wildtyp-FMRP-Homodimere nur geringfügig schwächer (vgl. Spur 1 und 2, unten). Bei der Homodimerisierung konnten an die immobilisierte Punktmutante noch etwa 20 % His-FMRP-I304N gebunden werden, verglichen mit der Heterodimerisierung mit Wildtyp-FMRP (vgl. Spur 3 und 4, oben). Im Bindungsexperiment mit TUBA nimmt aber das Signal des gebundenen Translats nicht entsprechend auf 20 % ab, vielmehr wurde überhaupt kein TUBA an die I304N-Homodimere gebunden (Spur 4, unten). Trotz der beobachteten Restaktivität bei der Homodimerisierung ist die TUBA-Bindung an FMRP-I304N vollständig gestört. Demnach scheint die FMRP-Dimerisierung offenbar keine Voraussetzung für die

TUBA-Interaktion zu sein. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Quartärstruktur in I304N-Homodimeren so stark gestört ist, dass eine TUBA-Bindung nicht mehr stattfinden kann.

### 4.2.5 Verschiedene Domänen von TUBA haben unterschiedliche Aufgaben bei der Protein-Interaktion

#### 4.2.5.1 TOP3b bindet an den N-Terminus von TUBA, die FMRP-Bindungsstelle ist der Tudor-Domäne benachbart

Mit TOP3 $\beta$  und FMRP (und seinen Homologen) wurden verschiedene, bisher nicht in einem Zusammenhang beschriebene Proteine gefunden, die mit dem neu entdeckten UBA- und



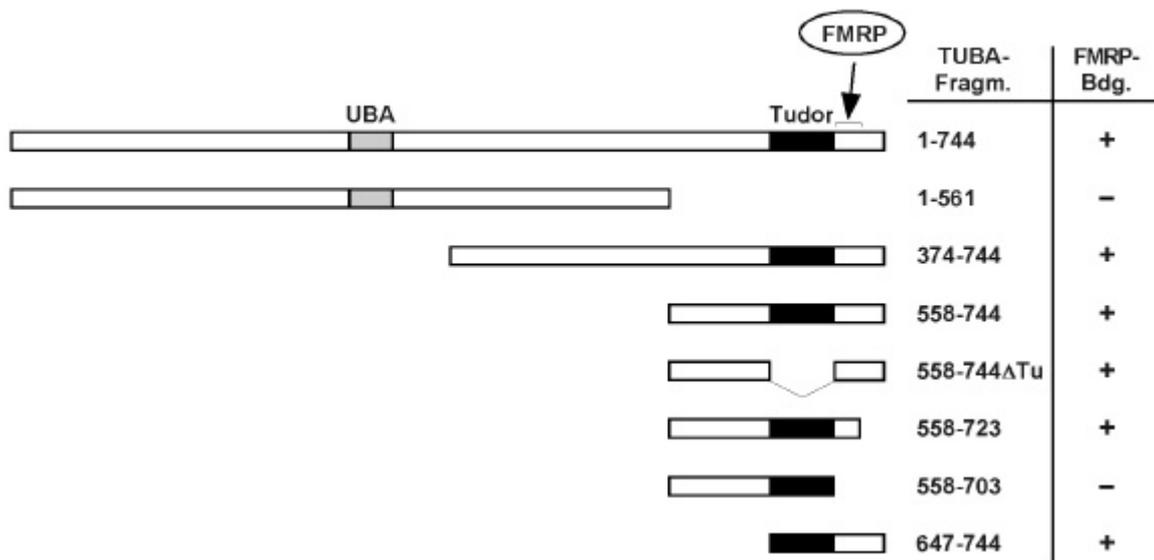
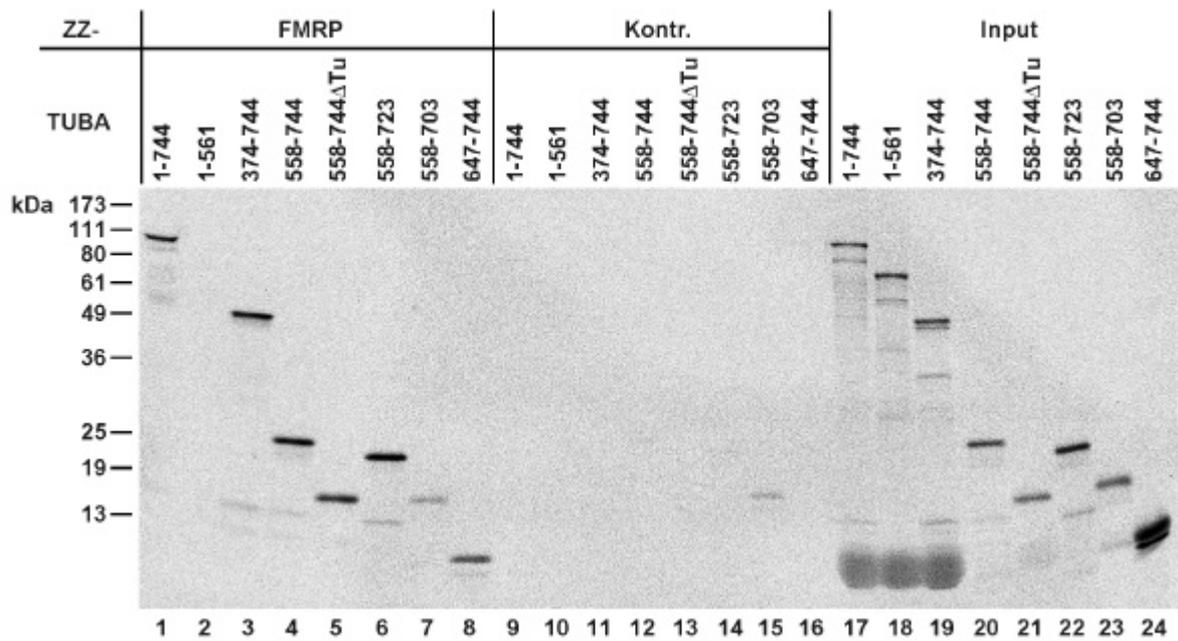
**Abbildung 4-41:** Der N-Terminus von TUBA vermittelt die TOP3b-Interaktion, FMRP bindet an den C-Terminus des Proteins. **Oben:** Autoradiographie von *in-vitro*-Bindungsexperimenten. ZZ-FMRP (Spur 1-4), ZZ-TOP3 $\beta$  (Spur 5-8) oder das ZZ-Peptid als Kontrolle (Spur 9-12) wurden immobilisiert und mit [<sup>35</sup>S]-markierten Translaten der angegebenen TUBA-Deletionsfragmente inkubiert. Nach Waschen mit P300 wurde mit Probenpuffer eluiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. In Spur 13-16 sind 30 % der eingesetzten Translate gezeigt. **Unten:** Die Balken zeigen schematisch die Primärstrukturen der getesteten TUBA-Fragmente mit den Positionen von UBA- und Tudor-Domäne. Die Tabelle daneben fasst die Ergebnisse der Bindungsexperimente zusammen. Die Bindungsstellen für TOP3 $\beta$  und FMRP sind über den Balkendiagrammen angezeigt.

Tudor-Domänen-Protein TUBA interagieren. Im folgenden wurde untersucht, welche Regionen des TUBA-Proteins für die einzelnen Interaktionen verantwortlich sind. Dazu wurden zunächst vier verschiedene Deletionskonstrukte von TUBA kloniert und durch *in-vitro*-Translation radioaktiv markiert (siehe Schemata in Abbildung 4-41 unten). Bindungsexperimente an immobilisiertem ZZ-FMRP und ZZ-TOP3 $\beta$  ergaben, dass die beiden Proteine an unterschiedliche Regionen im TUBA-Protein gebunden werden. FMRP bindet nur an Konstrukte, die den C-terminalen Abschnitt des Proteins enthalten (Aminosäure 562-744; siehe Abbildung 4-41, Spur 1-4). Dagegen liegt die TOP3 $\beta$ -Bindungsstelle am N-Terminus von TUBA (Aminosäure 1-185; Spur 5-8).

Die Tudor-Domänen verschiedener Proteine sind als Protein-Interaktionsdomänen beschrieben worden. So kann über seine Tudor-Domäne z.B. SMN an Sm-Proteine binden (Bühler *et al.*, 1999) oder SMNrp, wie oben gezeigt, an GCN5 (siehe Kapitel 4.1.3.3). Innerhalb der C-terminalen 183 Aminosäuren, die die FMRP-Bindungsstelle beinhalten, liegt die Tudor-Domäne von TUBA. Das warf die Frage auf, ob über diese die FMRP-Interaktion vermittelt wird. Daher wurde die FMRP-Bindungsstelle genauer kartiert. Mit fünf weiteren Deletionskonstrukten von TUBA wurden wie oben Bindungsexperimente an ZZ-FMRP durchgeführt (siehe Abbildung 4-42). Dabei zeigte sich, dass die Tudor-Domäne für die FMRP-Bindung entbehrlich ist, ihre Deletion beeinflusst die Bindung nicht (vgl. Spur 4 und 5). Vielmehr liegt die Bindungsstelle für FMRP in direkter Nachbarschaft der Tudor-Domäne (Aminosäure 703-723, vgl. Spur 6 und 7). Damit blieb offen, welche Funktion die Tudor-Domäne von TUBA hat.

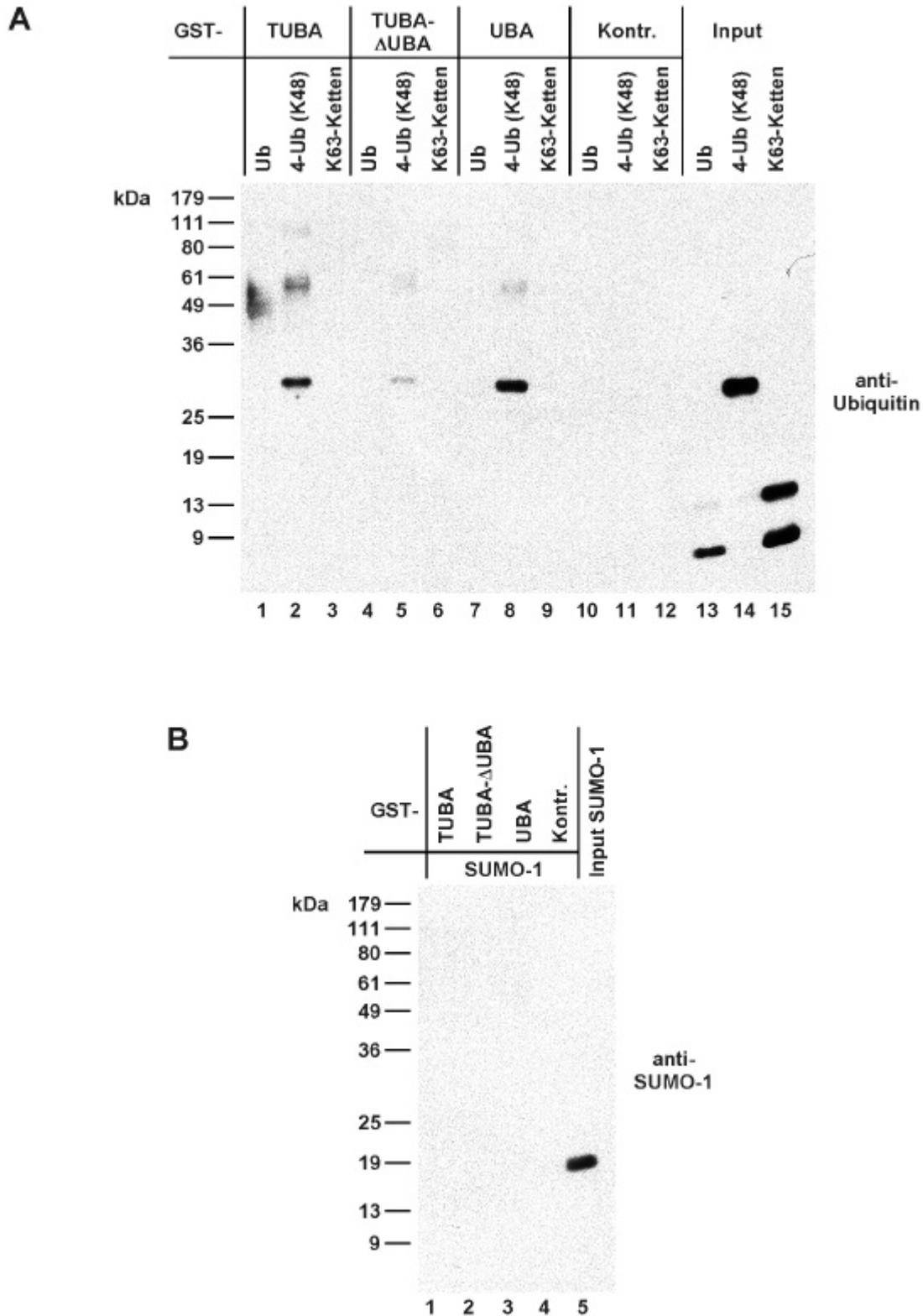
#### **4.2.5.2 Die UBA-Domäne von TUBA bindet spezifisch an Lys<sub>48</sub>-verknüpfte Ubiquitin-Ketten**

TUBA trägt in seinem mittleren Abschnitt eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA-Domäne). Als mit dieser Arbeit begonnen wurde, war nur bekannt, dass es sich hierbei um eine evolutionär konservierte Domäne handelt, die in einigen, am Ubiquitin-Stoffwechsel beteiligten Proteinen vorkommt (Hofmann und Bucher, 1996). Es wurde daher vermutet, dass UBA-Domänen mit Ubiquitin interagieren können. In ersten Experimenten mit TUBA konnte aber keine Bindung an monomeres Ubiquitin beobachtet werden. In der Zelle kommt Ubiquitin nicht nur als Monomer vor, vielmehr werden vor allem aus mehreren Ubiquitin-Molekülen bestehende Ketten gefunden, die kovalent mit anderen Proteinen verknüpft sind. Hierdurch werden diese Proteine für bestimmte zelluläre Prozesse markiert. Die Art der Verknüpfung innerhalb der Ubiquitin-Ketten stellt dabei ein Signal dar. So ist z. B. schon



**Abbildung 4-42:** Die FMRP-Bindungsstelle liegt zwischen Aminosäure 703 und 723 von TUBA. **Oben:** Autoradiographie von *in-vitro*-Bindungsexperimenten wie in Abbildung 4-41. ZZ-FMRP (Spur 1-8) oder das ZZ-Kontrollpeptid (Spur 9-16) wurden immobilisiert und mit Translaten der angegebenen TUBA-Fragmente inkubiert. In Spur 17-24 sind 30 % der eingesetzten Translate gezeigt. **Unten:** Die Balken zeigen schematisch die getesteten TUBA-Fragmente, die Position der FMRP-Bindungsstelle ist angegeben. Die Tabelle daneben fasst die Ergebnisse der Bindungsexperimente zusammen.

lange bekannt, dass Proteine durch Ubiquitinierung (kovalente Verknüpfung mit Ubiquitin) für den proteolytischen Abbau am 26S-Proteasom markiert werden können. In diesem Fall ist ein Ubiquitin-Molekül mit seinem Aminosäurerest Lys<sub>48</sub> durch Isopeptidbindung mit dem C-Terminus des nächsten Ubiquitin-Moleküls in einer Kette verknüpft. Daneben kennt man inzwischen ubiquitinierte Proteine, bei denen die Ubiquitin-Moleküle in den Ketten über Lys<sub>63</sub> verknüpft sind. In diesem Fall ist die Ubiquitinierung keine Abbaumarkierung sondern



**Abbildung 4-43: Die UBA-Domäne von TUBA bindet spezifisch an  $Lys_{48}$ -verknüpftes Tetra-Ubiquitin. A:** GST-TUBA (Spur 1-3), GST-TUBA- $\Delta$ UBA (Spur 4-6), GST-UBA (Spur 7-9) oder GST als Kontrolle (Spur 10-12) wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit monomerem Ubiquitin (Spur 1, 4, 7 und 10),  $Lys_{48}$ -verknüpftem Tetra-Ubiquitin (Spur 2, 5, 8 und 11) oder  $Lys_{63}$ -verknüpften Ubiquitin-Ketten (Spur 3, 6, 9 und 12) inkubiert. Nach Waschen mit PBS + 0,5% Tween20 wurden die Proteine mit Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und Ubiquitin durch Westernblot sichtbar gemacht. Spur 13-15 zeigt je 10 % der getesteten Ubiquitin-Formen. **B:** Bindungsexperiment wie in A. Die angegebenen GST-Konstrukte wurden hier mit SUMO-1 inkubiert und dieses dann durch Westernblot nachgewiesen. Spur 5 zeigt 10 % des eingesetzten SUMO-1.

dient vermutlich als Signal bei Prozessen wie DNA-Reparatur, mitochondrialer Vererbung oder der Endocytose bestimmter Hefe-Proteine (Pickart, 2000).

Um zu klären, ob TUBA über seine UBA-Domäne an eine der verschiedenen Ubiquitinformen oder an das Ubiquitin-homologe Protein SUMO-1 binden kann, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurde TUBA in den Vektor pGEX-5X-1 kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das dadurch am N-Terminus mit Glutathion-S-Transferase fusionierte Protein (GST-TUBA) kann an Glutathion-Sepharose immobilisiert werden. Auf gleiche Art wurde ein TUBA-Konstrukt mit deletierter UBA-Domäne (GST-TUBA- $\Delta$ UBA) und ein nur aus der UBA-Domäne bestehendes Konstrukt (GST-UBA) hergestellt. Nach Immobilisierung wurde eine Interaktion mit folgenden Proteinen getestet: monomeres Ubiquitin (Fa. Sigma), Lys<sub>48</sub>-verknüpftes Tetra-Ubiquitin (Fa. Affiniti Research Products), Lys<sub>63</sub>-verknüpfte Ubiquitin-Ketten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Edith Oberhofer, Abteilung Jentsch, MPI für Biochemie, Martinsried) und SUMO-1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tanja Büsgen, AG Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried). Bei den Bindungsstudien stellte sich heraus, dass alleine das Lys<sub>48</sub>-verknüpfte Tetra-Ubiquitin an TUBA gebunden werden kann (siehe Abbildung 4-43A, Spur 2). Monomeres und Lys<sub>63</sub>-verknüpftes Ubiquitin zeigen keine Interaktion (Abbildung 4-43A, Spur 1 und 3), ebenso bindet SUMO-1 nicht an TUBA (Abbildung 4-43B). In Spur 15 (Input) ist zu sehen, dass die hier verwendeten Lys<sub>63</sub>-verknüpften Ubiquitin-Ketten schon bis auf Dimergröße degradiert waren. In mehreren Bindungsstudien mit intakten multimeren Ketten konnte aber eindeutig beobachtet werden, dass TUBA nicht mit Lys<sub>63</sub>-verknüpftem Ubiquitin interagiert (nicht gezeigt). Mit den in Abbildung 4-43A gezeigten Bindungsexperimenten wurde außerdem nachgewiesen, dass die Interaktion mit Lys<sub>48</sub>-verknüpftem Ubiquitin von der UBA-Domäne vermittelt wird. So zeigt die isolierte UBA-Domäne (Spur 8) die gleiche Bindung wie TUBA voller Länge (Spur 2), TUBA- $\Delta$ UBA interagiert dagegen nicht mehr mit Tetra-Ubiquitin (Spur 5). Die sehr spezifische Bindung an Lys<sub>48</sub>-verknüpftes Ubiquitin lässt demnach vermuten, dass TUBA in der Zelle über seine UBA-Domäne an Proteine bindet, die für den Abbau am 26S-Proteasom bestimmt sind.



## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Isolierung und Charakterisierung von zwei bisher unbekanntem Genen beschrieben. Beide wurden über ihre Homologie zu *SMN*, dem Krankheitsgen der spinalen Muskelatrophie, entdeckt. *SMNrp*, das erste der beiden Gene, codiert für ein Zellkernprotein, das offensichtlich eine Rolle bei der Transkriptionsregulation und beim prä-mRNA-Spleißen spielt. Damit befasst sich der erste Teil dieses Kapitels. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der Erforschung von *TUBA*, dem anderen der beiden Gene, diskutiert.

### 5.1 **SMNrp ist ein Protein mit verschiedenen Funktionen im Zellkern**

#### 5.1.1 **Initiale Charakterisierung von SMNrp**

Die Analyse der Sequenz ergab, dass *SMNrp* für ein Protein aus 238 Aminosäuren codiert. Mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 30 kDa ist es ungefähr so groß wie *SMN*. *SMNrp* trägt, wie *SMN*, im mittleren Abschnitt seiner Primärsequenz eine Tudor-Domäne, die zwischen beiden Proteinen stark konserviert ist. Im N- und C-terminalen Abschnitt unterscheiden sich die beiden Proteine dagegen deutlich, was auf unterschiedliche Funktionen hindeutete. Durch Datenbanksuchen wurden Homologe von *SMNrp* auch in *S. pombe* und *A. thaliana* entdeckt. Demnach ist *SMNrp* schon früh in der Entwicklung der Eukaryonten, noch vor der Trennung von Tieren, Pflanzen und Pilzen entstanden und damit wie *SMN* ein entwicklungsgeschichtlich altes Protein. In *S. cerevisiae* konnte dagegen kein *SMNrp*-homologes Protein gefunden werden. Die Analyse des vollständig sequenzierten Genoms zeigt inzwischen, dass es in der Bäckerhefe offenbar generell keine Proteine mit Tudor-Domänen gibt.

Während dieser Arbeit wurden von Talbot *et al.* (1998) die cDNA-Sequenz und eine erste Charakterisierung von *SMNrp* veröffentlicht. Die Autoren beschreiben dort, dass *SMNrp* gewebespezifisch exprimiert wird, und zwar hauptsächlich im Skelettmuskel, sehr gering auch in Herz und Pankreas. Im Hinblick auf eine mögliche Funktion des Tudor-Domänen-Proteins im RNA-Stoffwechsel diskutieren sie, dass *SMNrp* daher eine Rolle im Metabolismus spezifischer mRNA-Subklassen spielen könnte. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *SMNrp* vielmehr eine ubiquitäre Expression in allen getesteten Geweben aufweist, wobei im Northernblot in der Tat stärkere Signale in Skelettmuskel und Herz als in den anderen Geweben beobachtet wurden (Abbildung 4-5). Die ubiquitäre Expression spricht

dafür, dass *SMNrp* wie *SMN* ein sogenanntes „Haushaltsgen“ (*housekeeping gene*) ist, also ein Gen mit einer grundsätzlichen und nicht gewebespezifischen Funktion im Zellstoffwechsel. Auch die Verbreitung von *SMNrp* in weit verwandten Spezies, darunter der einzelligen Hefe *S. pombe*, spricht gegen eine gewebespezifische und für eine solche „Haushaltsfunktion“ von *SMNrp*. Die im Northernblot beobachteten mRNA-Level lassen daher eher auf einen von der jeweiligen Stoffwechselleistung abhängigen, unterschiedlich hohen Bedarf an *SMNrp* in den verschiedenen Geweben schließen. Dabei ist zu beachten, dass bisher nicht untersucht ist, inwieweit die Expression auch über die Translation oder die Stabilität des Proteins reguliert wird.

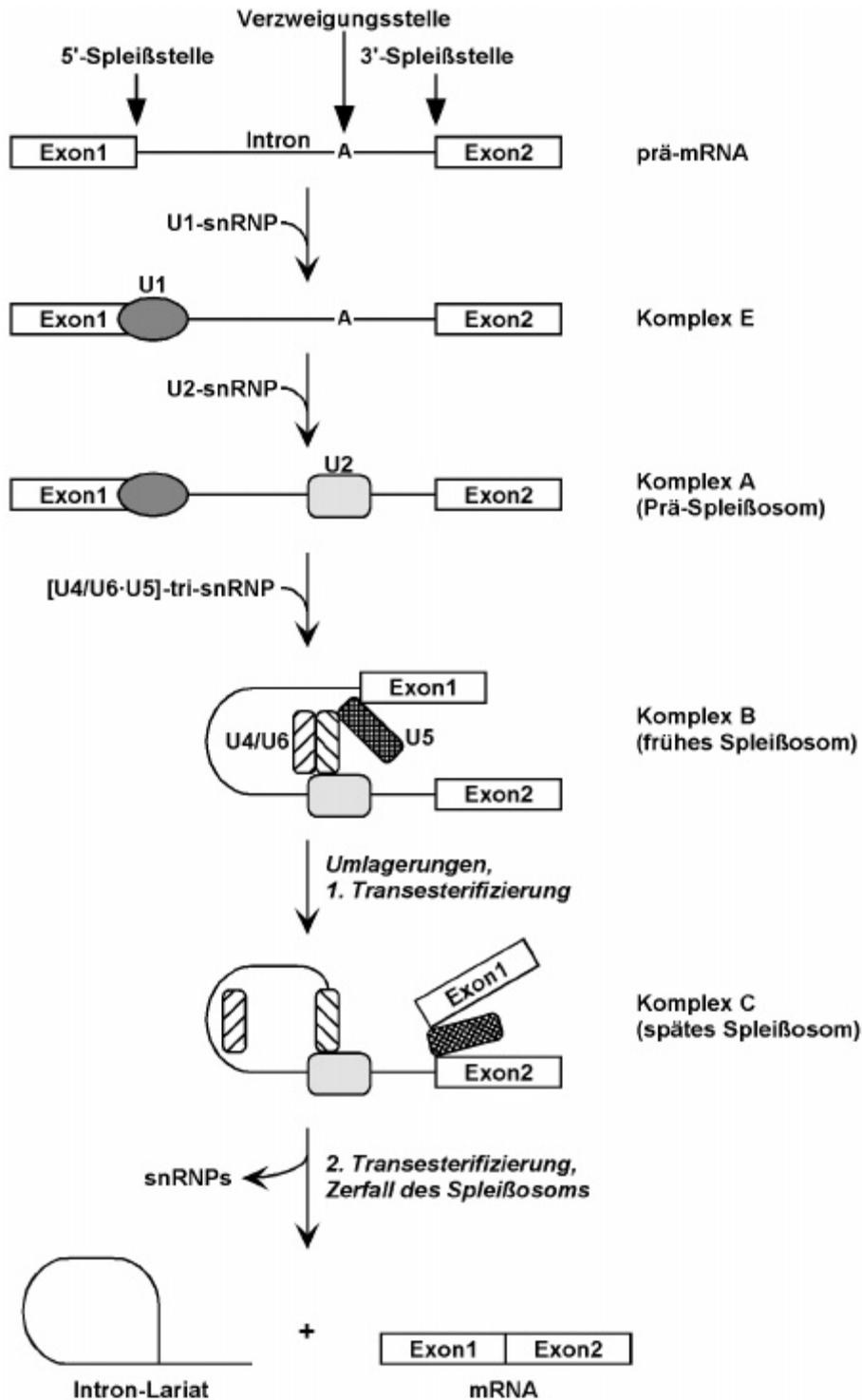
Die Analyse der intrazellulären Lokalisation zeigte deutliche Unterschiede zwischen *SMNrp* und *SMN*. Während letzteres im Cytoplasma und im Zellkern gefunden wird, wurde *SMNrp* durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie nur im Zellkern detektiert. Es ist dabei nicht (wie *SMN*) in *coiled bodies* / *gems* konzentriert, vielmehr verteilt sich das Protein über den ganzen Zellkern, wobei die Nucleoli ausgespart bleiben (Abbildung 4-7). Durch die Analyse der intranukleären Verteilung auf Ultrastruktur-Ebene konnten erste Hinweise auf eine Funktion von *SMNrp* gewonnen werden. Hierbei zeigte sich, dass das Protein hauptsächlich an Perichromatinfibrillen lokalisiert ist, also an Substrukturen des Zellkerns, die als aktive Bereiche der Transkription und des Spleißens gelten (Fakan, 1994; Puvion und Puvion-Dutilleul, 1996). Bei der weiteren, biochemischen Analyse von *SMNrp* stellte sich dann tatsächlich heraus, dass das Protein eine Funktion bei diesen Prozessen im Zellkern hat: Es wurde nachgewiesen, dass *SMNrp* ein U2-snRNP-assoziiertes, essentieller Spleißfaktor ist. Darüberhinaus scheint es als Aktivator der Histon-Acetyltransferase GCN5-S auch in die Kontrolle der Transkription involviert zu sein.

### **5.1.2 *SMNrp* ist ein U2-snRNP-assoziiertes, essentieller Spleißfaktor**

Bei der Analyse von Peptiden, die bei der biochemischen Aufreinigung von Spleißosomen isoliert worden waren, wurde von Neubauer *et al.* (1998) ein EST identifiziert, das für Teile von *SMNrp* codiert. Von *SMN* wusste man bereits, dass es eine wichtige Funktion bei der Biogenese der spleißosomalen snRNPs im Cytoplasma und beim Spleißprozess selbst im Zellkern hat (Fischer *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Pellizzoni *et al.*, 1998). Dadurch stellte sich die Frage, ob auch *SMNrp* eine Rolle beim Spleißen spielt.

Das Spleißen von prä-mRNA ist ein in mehreren Schritten ablaufender Prozess. Dabei kommt es zuerst zur sequentiellen Anlagerung der verschiedenen snRNPs (und anderen, hier nicht erwähnten Proteinen), was dann zur Ausbildung des katalytisch aktiven Spleißosoms führt (siehe Abbildung 5-1): Als erstes wird das U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle gebunden und so der sogenannte „Komplex E“ gebildet. Als zweites bindet das U2-snRNPs an die Verzweigungsstelle im Intron. Bei diesem energieabhängigen Vorgang entsteht der „Komplex A“ oder das „Prä-Spleißosom“. Als letzte Komponente wird das [U4/U6-U5]-tri-snRNP integriert und es entsteht „Komplex B“, das „frühe Spleißosom“, das nach verschiedenen Umlagerungen die zweischrittige Spleißreaktion katalysiert. In einer ersten Transesterifizierungsreaktion wird dabei die Verzweigungsstelle mit dem 5'-Ende des Introns verknüpft. Dadurch entstehen das Exon1 und ein Intron-Exon2-Zwischenprodukt, die beide noch mit dem „späten Spleißosom“ (Komplex C) assoziiert bleiben. Im zweiten Transesterifizierungsschritt werden dann die beiden Exons miteinander ligiert. Nach dem Zerfall des Spleißosoms werden sie schließlich zusammen mit dem Lasso-förmigen Intron („Lariat“) freigesetzt (Krämer, 1996; Burge *et al.*, 1999).

Die Analyse von SMNrp konnte eindeutig zeigen, dass das Protein eine essentielle Funktion beim Spleißprozess hat: Bei Dichtegradienten-Ultrazentrifugationen wurde beobachtet, dass ein bedeutender Teil (zwischen 20 und 80 %) des Proteins aus Kernextrakten mit dem 17S-U2-snRNP cosedimentiert. Immunpräzipitationen mit anti-SMNrp bestätigten die Vermutung, dass SMNrp ein U2-snRNP-assoziiertes Protein ist. Eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins an der Spleißreaktion lieferten die Antikörper-Inhibitions- und Immundepletionsstudien. Hier konnte gezeigt werden, dass das Spleißen einer prä-mRNA durch anti-SMNrp inhibiert werden kann, und zwar sowohl in Zellkernextrakten *in vitro*, als auch nach Mikroinjektion in *Xenopus*-Oocyten *in vivo* (Abbildung 4-16). Auf gleiche Art führt die Immundepletion von SMNrp aus Kernextrakten zu einer nahezu vollständigen Hemmung des Spleißreaktion. In allen drei Fällen wurde beobachtet, dass es nicht mehr zur Bildung des Intron-Exon2-Zwischenprodukts kommt. Das bedeutet, dass der mehrstufige Spleißprozess noch vor der ersten Transesterifizierungsreaktion blockiert wird. Der letztendliche Beweis dafür, dass SMNrp in der Tat ein essentieller Spleißfaktor ist, war der Befund, dass die Inhibition des Spleißens in SMNrp-depletierten Extrakten durch Zugabe von gereinigtem, rekombinantem SMNrp wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 4-17). Dies zeigt eindeutig, dass die Blockade der Reaktion einzig auf das Fehlen von SMNrp in den Extrakten zurückzuführen war.



**Abbildung 5-1: Das Spleißen von prä-mRNA ist ein mehrstufiger Prozess.** Die Abbildung zeigt schematisch vereinfacht die Entstehung der verschiedenen spleißosomalen Komplexe durch die aufeinander folgende Anlagerung der snRNPs an die prä-mRNA und die anschließende Spleißreaktion. Weitere Erklärungen hierzu im Text (verändert nach Krämer, 1996).

Die Analyse des SMNrp-Homologs in *S. pombe* bestätigte die hier beschriebene Funktion des humanen Proteins als essentieller Spleißfaktor (Hannus, 2001; Meister *et al.*, 2001c). So zeigt die Deletion des Hefe-Gens einen letalen Phänotyp, es handelt sich also um ein essentielles

Gen in *S. pombe*. Durch Untersuchung von temperatursensitiven Mutanten konnte dann nachgewiesen werden, dass auch hier die Depletion des Proteins in den Zellen zu einem Spleißdefekt führt. Dieser Defekt kann durch die Expression eines chimären Proteins, das aus dem N-terminalen Abschnitt des humanen und dem C-terminalen Abschnitt des Hefe-Proteins besteht, wieder aufgehoben werden. Dies zeigte, dass das über seine Sequenzhomologie gefundene *S.-pombe*-Protein auch funktionell homolog zum humanen SMNrp ist.

Weiterführende Untersuchungen durch G. Meister konnten die Funktion des humanen SMNrp beim Spleißprozess genauer eingrenzen (Meister *et al.*, 2001c). Es zeigte sich hier, dass SMNrp während des Prozesses mit Komplex A und B assoziiert ist. Die Immundepletion des Proteins in Kernextrakt führt dazu, dass zwar noch Komplex A, jedoch nicht mehr Komplex B entstehen kann. Durch Zugabe von gereinigtem SMNrp wird die Blockade der Reaktionsfolge an dieser Stelle wieder aufgehoben, d. h. Komplex B wird wieder gebildet. Demnach wird SMNrp für die Reifung des frühen Spleißosoms aus dem Prä-Spleißosom benötigt. Diese Befunde sind konsistent mit den hier gemachten Beobachtungen, dass die Reaktionsfolge bei SMNrp-Depletion oder Antikörper-Inhibition noch vor der ersten Transesterifizierungsreaktion blockiert ist. Die Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass SMNrp für die Rekrutierung des [U4/U6·U5]-tri-snRNPs bei der Bildung des frühen Spleißosoms verantwortlich sein könnte. Weitere Untersuchungen konnten in der Tat zeigen, dass SMNrp *in vitro* auch mit dem [U4/U6·U5]-tri-snRNP interagieren kann und zwar durch eine direkte Interaktion mit dem U4/U6-90kDa-Protein (Meister *et al.*, 2001c; Rappsilber *et al.*, 2001). Zusammengefasst legen die Daten nahe, dass SMNrp ein U2-snRNP-assoziiierter Faktor ist, der die Interaktion des prä-spleißosomalen Komplexes A mit dem [U4/U6·U5]-tri-snRNP vermittelt und so eine entscheidende Rolle bei der Bildung des reifen, katalytisch aktiven Spleißosoms spielt.

Zur Zeit ist noch unklar, ob SMNrp eine integrale Komponente des 17S-U2-snRNPs ist, oder ob die Interaktion nur transient erfolgt. Das Protein ist bisher nicht als eines der 11 spezifischen Proteine, die im U2-snRNP gefunden werden, identifiziert worden (Behrens *et al.*, 1993). Auch die relativ geringe Abundanz von SMNrp in Zellkernextrakten lässt eine eher transiente Interaktion mit dem U2-snRNP vermuten. Die meisten bisher bekannten U2-spezifischen Proteine werden für die Bindung des U2-snRNPs an Komplex E bei der Bildung von Komplex A benötigt (Hodges und Beggs, 1994; Reed, 1996; Caspary und Seraphin, 1998; Caspary *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu scheint SMNrp an der Rekrutierung des U2-snRNPs in das Prä-Spleißosom nicht beteiligt zu sein. Dies lässt sich aus der Beobachtung schließen,

dass die Bildung von Komplex A in Kernextrakten durch die SMNrp-Depletion oder die Antikörper-Inhibition nicht betroffen ist (Meister *et al.*, 2001c).

Zukünftige Untersuchungen sollen aufdecken, über welche U2-spezifische Proteine die Interaktion von SMNrp mit dem U2-snRNP erfolgt und welche Bedeutung die *in vitro* beobachtete Bindung an das [U4/U6-U5]-tri-snRNP *in vivo* hat. Außerdem wird es spannend sein, die Aufgaben der verschiedenen Domänen von SMNrp bei der Funktion des Proteins genauer zu klären. Untersuchungen mit Mutanten gaben bereits erste Hinweise darauf, dass die N-terminale Domäne von SMNrp für die U2-Interaktion verantwortlich ist, die Tudor-Domäne dagegen eine entscheidende Rolle bei der Bildung des frühen Spleißosoms spielt (Meister *et al.*, 2001c). Im Gegensatz zu SMN, das über seine Tudor-Domäne mit den spleißosomalen Sm-Proteinen interagiert (Bühler *et al.*, 1999), konnte für SMNrp bisher keine Bindung an Sm- oder Lsm-Proteine nachgewiesen werden (G. Meister, persönliche Mitteilung). Die Tudor-Domäne von SMNrp ist daher vermutlich an der Vermittlung von Wechselwirkungen mit anderen Proteinfaktoren beteiligt.

### **5.1.3 SMNrp als Cofaktor der Histon-Acetyltransferase GCN5**

Neben seiner Funktion als essentieller Spleißfaktor scheint SMNrp noch eine weitere Funktion im Zellkern zu haben. So lassen die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen in dieser Arbeit darauf schließen, dass SMNrp als Cofaktor der Histon-Acetyltransferase GCN5-S auch eine Rolle bei der Aktivierung der Transkription spielt.

In Eukaryonten ist DNA durch Bindung an Histone in Nucleosomen, die sich wiederholende Grundstruktur des Chromatins, verpackt. Ein Nucleosom besteht dabei aus einem 146 bp langen DNA-Abschnitt, der sich um einen oktameren Komplex aus je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 windet (Struhl, 1998; Workman und Kingston, 1998; Kouzarides, 1999). Gene, die in solchermaßen verpackten DNA-Abschnitten liegen, werden normalerweise nicht transkribiert, da offenbar die hierfür nötige Bindung von Transkriptionsaktivatoren und den Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie an ihre Erkennungssequenzen nur sehr ineffizient erfolgen kann (Lee *et al.*, 1993; Recht und Osley, 1999). Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Transkription spielt die Acetylierung der nucleosomalen Histone (Allfrey *et al.*, 1964). Diese posttranslationale Modifikation erfolgt an Lysinresten, was zu einer Neutralisation der positiven Ladungen führt. Man nimmt an, dass dadurch die Interaktion der Histone mit der negativ geladenen DNA geschwächt, die nucleosomale Struktur aufgelockert und so die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre

Erkennungssequenzen ermöglicht wird (Lee *et al.*, 1993; Vettese-Dadey *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2001; Sewack *et al.*, 2001). In umgekehrter Weise wird die Deacetylierung von Histonen mit der Repression der Transkription in Verbindung gebracht (Taunton *et al.*, 1996; Workman und Kingston, 1998). Inzwischen deutet sich an, dass die Acetylierungen, zusammen mit Phosphorylierungen, Methylierungen und Ubiquitinierungen, Teil eines komplexen Modifikationsmusters der Histone sind („Histon-Code“: Strahl und Allis, 2000; Turner, 2000), das den jeweiligen Aktivitätszustand des Chromatins widerspiegelt und von spezifischen Regulatorproteinen nachfolgender Prozesse erkannt wird (Berger, 2002; Orphanides und Reinberg, 2002).

Die Acetylierung von Histonen wird durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert (Marmorstein und Roth, 2001; Roth *et al.*, 2001). Auf der Suche nach Bindungspartnern von SMNrp durch *Two-Hybrid-Screen* wurde eines dieser Enzyme, GCN5-S, als putativer Interaktor von SMNrp identifiziert. Verschiedene Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass SMNrp ein Regulator dieser HAT im Zellkern ist: 1) SMNrp lokalisiert an Perichromatinfibrillen (s. o.), die als aktive Bereiche des Spleißens aber auch der Transkription gelten. 2) Die im *Two-Hybrid-Screen* beobachtete, starke Interaktion mit GCN5-S konnte durch Bindungsexperimente *in vitro* bestätigt werden. Dabei wurde außerdem gezeigt, dass die Interaktion zwischen beiden Proteinen direkt erfolgt. 3) SMNrp konnte über immobilisiertes GCN5-S selektiv aus Zellextrakten präzipitiert werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass eine SMNrp-GCN5-S-Interaktion auch *in vivo* stattfinden könnte. 4) SMNrp stimuliert die HAT-Aktivität von GCN5-S an freien Histonen. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus SMNrp und GCN5-S *in vitro* Histone acetylieren kann, die in Nucleosomen eingebunden sind. Diese Aktivität besitzt GCN5-S alleine nicht. Anders als bei freien Histonen wird hierbei selektiv nur Histon H3 acetyliert (Abbildung 4-13). Die Daten legen demnach nahe, dass SMNrp ein Cofaktor der HAT GCN5-S ist, der die Substratspezifität des Enzyms entscheidend moduliert.

#### **5.1.3.1 Ist SMNrp Komponente eines humanen GCN5-Komplexes?**

Acetylierungsexperimente zeigen, dass rekombinantes GCN5-S *in vitro* zwar freie Histone modifizieren kann, Histone in Nucleosomen aber nicht erkennt (Yang *et al.*, 1996). Wie man aus Untersuchungen von GCN5 in der Hefe weiß, ist das Protein, wie die meisten HATs, Teil großer Multiproteinkomplexe. In *S. cerevisiae* sind zwei solche HAT-Komplexe, „Ada“ und „SAGA“, beschrieben worden, die GCN5 als katalytische Untereinheit enthalten (Grant *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 1997). In diesen Komplexen kann GCN5 die

Acetylierung von Histonen in Nucleosomen effektiv katalysieren, was darauf hindeutet, dass Komponenten der Komplexe die Substraterkennung des Enzyms so modifizieren, dass das *in vivo* relevante Substrat erkannt wird (Grant *et al.*, 1997). Der Ada-Komplex in Hefe enthält neben GCN5 die Proteine Ada2, Ada3 und Ada5, während im SAGA-Komplex zusätzlich noch mehrere Spt-Proteine gefunden werden (Grant *et al.*, 1997). Beide Komplexe interagieren mit Transkriptionsfaktoren, was vermutlich die Rekrutierung der HAT-Aktivität zu transkriptionsaktiven Stellen im Genom bewirkt (Silverman *et al.*, 1994). Inzwischen sind auch in höheren Eukaryonten ähnliche HAT-Komplexe beschrieben worden. Die beiden Homologen von Hefe-GCN5 im Menschen, das humane GCN5 und die verwandte Acetyltransferase p/CAF, werden in mindestens drei verschiedenen, SAGA-ähnlichen Komplexen gefunden (Martinez *et al.*, 1998; Ogryzko *et al.*, 1998; Brand *et al.*, 1999). Neben humanen Homologen der Hefe-Proteine Ada2, Ada3 und Spt3 enthalten sie auch verschiedene *TATA binding protein*-assoziierte Faktoren (TAFs), die bis dahin nur als Untereinheiten des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID bekannt waren (Ogryzko *et al.*, 1998). Auch im SAGA-Komplex in *S. cerevisiae* wurden solche TAFs gefunden, was nahe legt, dass die beschriebenen GCN5-Komplexe in Hefe und Mensch strukturell und funktionell konserviert sind (Grant *et al.*, 1998a; Struhl und Moqtaderi, 1998).

Der Befund, dass GCN5-S im Komplex mit SMNrp Histone in Nucleosomen acetylieren kann, lässt die Vermutung zu, dass SMNrp eine Komponente eines humanen GCN5-S-Komplexes ist, welche die Erkennung des *in-vivo*-Substrats durch das Enzym vermittelt. Bei der biochemischen Aufreinigung humaner GCN5-Komplexe konnte SMNrp jedoch bisher nicht als Bestandteil identifiziert werden (Ogryzko *et al.*, 1998; Brand *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2001). Wie bereits berichtet, gibt es kein SMNrp-Homolog in *S. cerevisiae*. Demnach ist das Protein offenbar auch keine der zwischen Mensch und Hefe konservierten Komponenten der GCN5-Komplexe. Beides könnte darauf hindeuten, dass SMNrp eine spezifische Funktion bei GCN5-S in höheren Eukaryonten erfüllt und dabei möglicherweise Komponente eines anderen als der bisher beschriebenen GCN5-Komplexe ist.

Für das humane GCN5 sind zwei unterschiedlich große Spleiß-Isoformen bekannt (Smith *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). Im *Two-Hybrid-Screen* wurde GCN5-S, die kürzere Variante, als SMNrp-Interaktor identifiziert. Es ist gezeigt, dass GCN5-L, die am N-Terminus um 360 Aminosäuren längere Isoform, im Gegensatz zu GCN5-S Histone in Nucleosomen *in vitro* als Substrat erkennt (Xu *et al.*, 1998). Demnach könnte SMNrp als Cofaktor von GCN5-S eine ähnliche Funktion haben wie der N-Terminus der längeren Isoform GCN5-L. Zwischen

beiden (SMNr<sub>p</sub> und dem N-terminalen Abschnitt von GCN5-L) besteht allerdings keine Sequenzähnlichkeit, so dass hier höchstens eine funktionelle Homologie vorläge. In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass SMNr<sub>p</sub> mit gleicher Effizienz auch mit GCN5-L interagiert (Abbildung 4-11). Bisher ist nicht bekannt, ob und inwieweit sich die HAT-Komplexe der beiden Isoformen in ihrer Zusammensetzung voneinander unterscheiden. Daher bleibt offen, ob SMNr<sub>p</sub> auch eine Rolle als Cofaktor von GCN5-L spielt.

Obwohl die experimentellen Daten eine Funktion von SMNr<sub>p</sub> als Cofaktor von GCN5-S nahe legen, ließ sich bisher nicht eindeutig zeigen, ob die *in vitro* beobachtete Interaktion zwischen beiden Proteinen auch tatsächlich *in vivo* relevant ist. Der stärkste Hinweis darauf, dass beide auch *in vivo* miteinander interagieren, ist der Befund, dass sich SMNr<sub>p</sub> über immobilisiertes, rekombinantes GCN5-S selektiv aus Zellextrakten präzipitieren lässt. Der Beweis steht aber noch aus, dass beide Proteine in der Zelle tatsächlich aneinander binden. So war es bisher nicht möglich, z. B. durch Co-Immünpräzipitation, einen SMNr<sub>p</sub>-GCN5-S-Komplex aus Zellextrakten zu isolieren. Dies könnte aber auch darauf zurückzuführen sein, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nur von transienter Natur ist und sie sich daher einer gemeinsamen Aufreinigung entziehen. In diesem Fall wäre SMNr<sub>p</sub> tatsächlich keine integrale Komponente eines humanen GCN5-Komplexes. Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Interaktion der beiden Proteine in der Zelle durch spezifische posttranslationale Modifikationen reguliert wird. Für GCN5 sind bisher Phosphorylierungen und Acetylierungen beschrieben worden, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen (Barlev *et al.*, 1998; Winston und Allis, 1999).

### 5.1.3.2 Welche Funktion könnte die Interaktion von SMNr<sub>p</sub> mit GCN5 haben?

Aus Untersuchungen in der Hefe weiß man, dass die Histon-Acetylierung durch GCN5 die Transkription nur bestimmter Gene stimuliert (Kuo *et al.*, 1998). Diese Selektivität wird vermutlich dadurch vermittelt, dass der GCN5-Komplex durch spezifische Interaktion mit Transkriptionsaktivatoren an den jeweiligen Promotorregionen rekrutiert wird. Es ist prinzipiell vorstellbar, dass SMNr<sub>p</sub> als GCN5-S-Cofaktor solche Interaktionen vermittelt. Im *Two-Hybrid-Screen* mit SMNr<sub>p</sub> wurden mit TAXREB107 (Morita *et al.*, 1993), dem *Jun activation domain binding protein* (Claret *et al.*, 1996) und dem *α-Fetoprotein enhancer binding protein* (Morinaga *et al.*, 1991) mehrere in Frage kommende Faktoren isoliert, die die Anlagerung eines humanen SMNr<sub>p</sub>-GCN5-S-Komplexes an spezifische DNA-Abschnitte vermitteln könnten. Weitere Untersuchungen sind hier nötig, um herauszufinden, ob es sich bei diesen Kandidaten um echte SMNr<sub>p</sub>-Bindungspartner in der Zelle handelt. Die Tatsache,

dass GCN5-S im Komplex mit SMNrp die Acetylierung von Histonen in Nucleosomen *in vitro* katalysieren kann, spricht eher dafür, dass SMNrp direkt die Aktivität des Enzyms beeinflusst. Für das Tudor-Domänen-Protein SMN wird eine Chaperon-ähnliche Funktion bei der Zusammenlagerung von snRNPs aus Sm-Proteinen und snRNA diskutiert (MacKenzie und Gendron, 2001). SMNrp könnte auf vergleichbare Art eine Auflockerung der nucleosomalen Struktur bewirken, die dazu führt, dass die Histone, speziell H3, besser zugänglich für die GCN5-S-katalysierte Acetylierung werden. In *S. cerevisiae* wurde kürzlich ein nur aus Ada2, Ada3 und GCN5 bestehender HAT-Komplex beschrieben, der das gleiche Acetylierungsmuster an Nucleosomen erzeugt, wie der deutlich größere SAGA-Komplex (Sendra *et al.*, 2000). Offenbar werden also keine weiteren Faktoren für die „ordnungsgemäße“ Erkennung des *in-vivo*-Substrats durch GCN5 benötigt. Im Menschen könnte SMNrp im GCN5-S-Komplex daher die Funktion von Ada2 oder Ada3 übernehmen. Sequenzvergleiche zeigen allerdings keine Verwandtschaft der Proteine, so dass hier (wie schon mit dem N-terminalen Abschnitt von GCN5-L, s. o.) allenfalls eine funktionelle Homologie besteht. Darüberhinaus konnte ein Effekt von SMNrp auf die Aktivität von GCN5-S auch schon bei der *in-vitro*-Acetylierung freier Histone beobachtet werden, wenn auch nur geringfügig. Dies lässt aber darauf schließen, dass SMNrp eher einen direkten, stimulierenden Einfluss auf die enzymatische Aktivität von GCN5-S hat, z. B. durch Bewirkung einer Konformationsänderung des Enzyms bei der Interaktion.

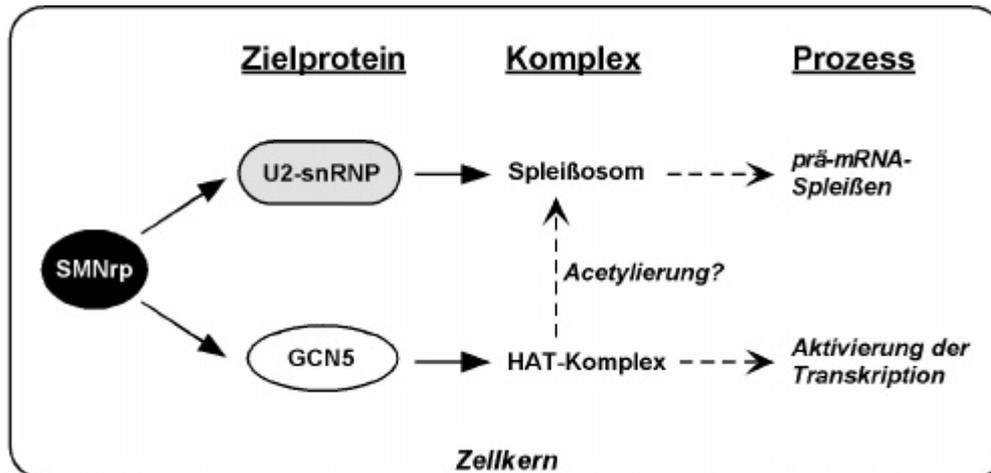
#### **5.1.4 SMNrp, ein Bindeglied zwischen Transkription und Spleißen?**

Wenn SMNrp im Zellkern tatsächlich mit GCN5-S interagiert und die Aktivität des Enzyms moduliert, stellt sich die Frage, ob es dabei einen Zusammenhang mit seiner Rolle als U2-snRNP-assoziiertes, essentielles Spleißfaktor gibt, oder ob das Protein zwei voneinander unabhängige, sich möglicherweise sogar gegenseitig ausschließende Aufgaben erfüllt. Interessanterweise wurde kürzlich mit SAP130 zum ersten Mal ein Spleißfaktor beschrieben, der mit dem humanen GCN5-Komplex „STAGA“ assoziiert ist (Martinez *et al.*, 2001). SAP130 ist eine Untereinheit des Proteinkomplexes SF3b, der als Komponente des 17S-U2-snRNPs eine entscheidende Rolle bei der Spleißosom-Zusammenlagerung spielt (Das *et al.*, 1999). Die Funktion der Interaktion von SAP130 mit dem GCN5-Komplex ist nicht bekannt. Es mehren sich damit aber die Hinweise auf eine direkte Verbindung zwischen der Transkription und dem Spleißprozess. Aus verschiedenen Untersuchungen weiß man, dass die Prozessierung der prä-mRNA cotranskriptional abläuft und dass sich die verschiedenen Prozesse gegenseitig regulieren (Orphanides und Reinberg, 2002; Proudfoot *et al.*, 2002).

Eine besondere Rolle spielt dabei die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II, die während der Transkription direkt mit den verschiedenen RNA-prozessierenden Faktoren interagiert (Hirose und Manley, 2000). Die hier beschriebenen Assoziationen von Spleißfaktoren wie SMNrp oder SAP130 mit HAT-Komplexen deuten an, dass es nicht erst während der Elongation, sondern schon bei der Aktivierung der Transkription zu Wechselwirkungen mit dem Spleißmaschinerie kommt. So könnten Spleißosom-Komponenten auf diese Weise schon früh an aktiv transkribierten Genen rekrutiert werden. Auch der beschriebene Einfluss von Promotorsequenzen auf alternative Spleißvorgänge (Cramer *et al.*, 1999) könnte über solche Interaktionen vermittelt werden.

Obwohl HATs *per definitionem* die Acetylierung von Histonen katalysieren, sind inzwischen auch zahlreiche andere Proteine als Substrate von HATs beschrieben worden, darunter Transkriptionsaktivatoren wie p53 oder E2F1, die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIE $\beta$  und TFIIF, Strukturproteine wie Tubulin, die Kernimport-Proteine der Importin- $\alpha$ -Familie und einige andere (zusammengefasst in Roth *et al.*, 2001). Daraus lässt sich die interessante Hypothese ableiten, dass die Interaktion von SMNrp mit GCN5 auch die Funktion haben könnte, eine HAT-Aktivität an das Spleißosom zu binden, um dort die Acetylierung spleißosomaler Proteine zu katalysieren. In der Tat zeigten erste Experimente bereits, dass sich verschiedene Sm- und andere spleißosomale Proteine, durch den SMNrp-GCN5-S-Komplex *in vitro* acetylieren lassen (G. Meister, persönliche Mitteilung). Es bleibt abzuwarten, ob sich auch *in vivo* Acetylierungen an spleißosomalen Proteinen finden lassen und welche Funktionen diese gegebenenfalls haben.

Weiterführende Untersuchungen durch G. Meister zur Funktion von SMNrp als Spleißfaktor gaben Hinweise darauf, dass der N-terminale Abschnitt des Proteins für die Assoziation mit dem U2-snRNP verantwortlich ist. Die Tudor-Domäne ist für die Bildung des frühen Spleißosoms essentiell, möglicherweise erfolgt über sie die Interaktion von Komplex B mit dem [U4/U6·U5]-tri-snRNP (Meister *et al.*, 2001c). Durch Experimente mit Deletionsmutanten wurde hier gezeigt, dass SMNrp wahrscheinlich über die Tudor-Domäne mit GCN5 interagiert. Der N-terminale Abschnitt des Proteins ist dagegen für die Stimulierung der katalytischen Aktivität der HAT wichtig. Zur Zeit ist nicht klar, ob die verschiedenen Proteinabschnitte die genannten Aufgaben gleichzeitig ausüben können, oder ob sich diese gegenseitig ausschließen. Zukünftige Experimente sollen diese Fragen klären und dabei vor allem untersuchen, ob SMNrp tatsächlich ein Faktor ist, der die Aktivierung der Transkription mit dem Spleißprozess verbindet (siehe Abbildung 5-2). Unabhängig davon



**Abbildung 5-2: Vermittelt SMNrp zwischen der Aktivierung der Transkription und dem Spleißprozess?** Die Abbildung stellt schematisch die Interaktion von SMNrp mit dem U2-snRNP und seine daraus resultierende Funktion als essentieller Spleißfaktor dar. Außerdem ist der (bisher nicht eindeutig bewiesene) Einfluss auf die Aktivierung der Transkription über die Interaktion mit GCN5 gezeigt. Beide Prozesse könnten möglicherweise über SMNrp miteinander in Verbindung stehen. Die Überlegung, dass HAT-Komplexe *in vivo* auch spleißosomale Proteine acetylieren, ist spekulativ (siehe Text).

scheint SMNrp aber, wie auch SMN, ein Protein zu sein, das an verschiedenen zellulären Vorgängen beteiligt ist. Bereits 1997 wurde postuliert, dass Proteine mit Tudor-Domänen in Prozesse im RNA-Stoffwechsel der Zelle involviert sind (Ponting, 1997). Man vermutet, dass die Tudor-Domänen hierbei Plattformen für Protein-Protein-Interaktionen darstellen (Selenko *et al.*, 2001). Beides scheint sich mit den beschriebenen Funktionen beim Spleißen und bei der Transkriptionsaktivierung auch für das neuentdeckte Tudor-Domänen-Protein SMNrp zu bestätigen.

## 5.2 Analyse des UBA- und Tudor-Domänen-Proteins TUBA

### 5.2.1 Sequenz, Expression und intrazelluläre Lokalisation

Über seine Homologie im Bereich der Tudor-Domäne wurde auch TUBA („*Tudor and UBA domain-containing protein*“) bei der Datenbanksuche nach SMN-verwandten Sequenzen entdeckt. Mit seinen 744 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 85 kDa ist es etwa dreimal so groß wie SMN und SMNrp. Neben der Tudor-Domäne, die im C-terminalen Abschnitt von TUBA liegt, trägt das Protein noch eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA-Domäne) im zentralen Bereich der Primärstruktur. Jenseits dieser beiden konservierten Abschnitte zeigt TUBA keine Sequenzverwandschaft zu bekannten humanen Proteinen. Durch Northernblot konnte gezeigt werden, dass *TUBA* im humanen Organismus ubiquitär exprimiert wird und demnach vermutlich ebenfalls eine „Haushaltsfunktion“ im zellulären Stoffwechsel hat (Abbildung 4-22).

In der Aminosäuresequenz von TUBA lassen sich zwei putative Kernlokalisierungssignale finden. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde festgestellt, dass das Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern verschiedener Kulturzellen lokalisiert. Diese intrazelluläre Verteilung konnte durch Transfektion und Expression von TUBA-Konstrukten mit *myc*- oder *GFP-tag* bestätigt werden. Konfokale Mikroskopie zeigte ein genaueres Bild der TUBA-Lokalisation (Abbildung 4-25). Im Zellkern ist das Protein diffus verteilt und nicht wie SMN in distinkten *coiled bodies* konzentriert. Im Cytoplasma lokalisiert das Protein an der Kernhülle und angrenzenden tubulären Strukturen, bei denen es sich vermutlich um Bereiche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) handelt. Eine Colokalisation mit dem ER-Marker Hsp47 zeigte aber nur eine partielle Überlappung der Signale (Abbildung 4-26). Demnach ist TUBA vermutlich kein ER-Lumen-ständiges Protein sondern eher an der cytoplasmatischen Seite bestimmter Bereiche der ER- und Kernmembran lokalisiert. In biochemischen Untersuchungen wurde herausgefunden, dass TUBA mit FMRP interagiert, für das eine Rolle als Regulator der Translation am Ribosom diskutiert wird (Laggerbauer *et al.*, 2001). Dies lässt die Spekulation zu, dass auch TUBA in die Kontrolle der Translation involviert ist und es sich daher bei den angefärbten Strukturen um Bereiche des (Ribosomen-beladenen) rauhen ERs handeln könnte. Einen genaueren Aufschluss hierüber wird die elektronenmikroskopische Analyse der TUBA-Lokalisation geben können.

### **5.2.2 Die Interaktion von TUBA mit DNA-Topoisomerase-III-beta**

Die Existenz einer Tudor-Domäne ließ annehmen, dass TUBA mit anderen Proteinen in der Zelle interagiert. Daher wurden verschiedene Strategien verfolgt, um Bindungspartner des Proteins zu finden und so Hinweise über seine Funktion zu erhalten. Bei der Immunpräzipitation von TUBA aus HeLa-Zellextrakten wurde in einem 1:1-Verhältnis reproduzierbar ein 95 kDa großes Protein copräzipitiert und durch MALDI-Massenspektrometrie als DNA-Topoisomerase-III-beta (TOP3 $\beta$ ) identifiziert. Ebenso konnte auch in umgekehrter Richtung TUBA mit rekombinant exprimiertem HA-TOP3 $\beta$  aus 293-Zellextrakten copräzipitiert werden (Abbildung 4-27). Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegen demnach beide Proteine in der Zelle als Komplex vor. Bindungsexperimente *in vitro* bestätigten die Interaktion und konnten zeigen, dass TOP3 $\beta$  direkt an den N-terminalen Abschnitt von TUBA bindet (Abbildung 4-41).

DNA-Topoisomerasen sind Enzyme, die den topologischen Zustand von DNA-Molekülen verändern können (Wang, 1996). Indem sie die Auflösung von Torsionsspannungen bewirken,

sind sie entscheidend an den verschiedenen DNA-abhängigen Prozessen in der Zelle wie der Replikation, der Transkription, der Rekombination oder der Chromatin-Remodellierung beteiligt. Biochemisch werden zwei Subfamilien der Enzyme unterschieden. Bei Typ-I-Topoisomerasen erfolgt die Katalyse durch vorübergehende Einführung eines Einzelstrangbruchs in das DNA-Substrat, um die Passage des Gegenstrangs zu erlauben. Typ-II-Topoisomerasen erzeugen dafür vorübergehend Doppelstrangbrüche im DNA-Molekül. Im Menschen sind (bisher) drei Typ-I-Enzyme entdeckt worden: die DNA-Topoisomerase-I und die beiden nah verwandten DNA-Topoisomerase-III-alpha (TOP3 $\alpha$ ) und -III-beta (TOP3 $\beta$ ). Während für DNA-Topoisomerase-I Funktionen bei der Replikation und der Transkription bekannt sind, weiß man über die Aufgaben von TOP3 $\alpha$  und TOP3 $\beta$  zur Zeit noch wenig (Champoux, 2001). Gendisruptionen in der Maus zeigen, dass beide trotz ihrer nahen Verwandtschaft (die Aminosäure-Sequenzen sind zu 38 % identisch und zu 53 % ähnlich) offenbar keine redundanten Funktionen haben. Während ein homozygoter *TOP3a*-Verlust schon während der frühen Embryonalentwicklung letal ist, entwickeln sich *TOP3b*<sup>-/-</sup>-Mäuse zunächst normal, zeigen aber eine geringere Lebenserwartung, die mit multiplen Schäden innerer Organe korreliert (Li und Wang, 1998; Kwan und Wang, 2001). Da man noch keine spezifische zelluläre Funktion von TOP3 $\beta$  kennt, war es schwierig, die Bedeutung der Interaktion mit TUBA zu untersuchen. Die katalytische Aktivität des Enzyms kann *in vitro* durch Decatenierung hochmolekularer DNA nachgewiesen werden. Auf die Decatenierungsaktivität von TOP3 $\beta$  hatte die Zugabe von TUBA im Experiment allerdings keinen Einfluss (Abbildung 4-30). Anders als SMNrp bei GCN5-S kann also TUBA offenbar nicht direkt die enzymatische Aktivität seines Interaktionspartners modulieren.

Top3, das einzige Topoisomerase-III-Homolog in *S. cerevisiae*, interagiert mit Sgs1, einer DNA-Helikase der RecQ-Familie (Gangloff *et al.*, 1994). Erst kürzlich wurde beschrieben, dass die humanen TOP3 $\alpha$  und TOP3 $\beta$  an RecQ5 $\beta$ , ebenfalls Mitglied dieser Protein-Familie, binden (Shimamoto *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, dass Topoisomerase-III-Enzyme in Eukaryonten offenbar zusammen mit RecQ-Helikasen agieren. In allen Fällen sind aber die zellulären Zusammenhänge und die molekularen Funktionen der Interaktionen noch nicht bekannt. Interessanterweise sind unter den fünf bisher bekannten Helikasen der RecQ-Familie beim Menschen auch *BLM* und *WRN*, die Krankheitsgene für das Bloom- bzw. Werner-Syndrom (Ellis *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996). Beide Erkrankungen zeichnen sich durch genetische Instabilität in den Patientenzellen aus, die zu einer erhöhten Tumorprädisposition und einer frühzeitigen Alterung der Betroffenen führt (Lindor *et al.*, 2000). Dagegen sind

bisher keine Krankheiten bekannt, die durch Mutationen in *RecQ5* verursacht werden. Man weiß aber auch noch nicht, ob TOP3 $\beta$ , außer mit RecQ5 $\beta$ , auch mit BLM, WRN oder den anderen Helikasen der RecQ-Familie interagiert. Insofern ist die mögliche Bedeutung von TOP3 $\beta$  und seines Bindungspartners TUBA für die genannten (oder andere) Erkrankungen noch unklar.

Zukünftige Untersuchungen sollen klären, ob TOP3 $\beta$  gleichzeitig oder jeweils exklusiv mit RecQ5 $\beta$  und TUBA interagiert und wie diese Wechselwirkungen reguliert sind. Möglicherweise kann die intrazelluläre Lokalisation der Proteine hierauf schon Hinweise geben. Interessanterweise wurde GFP-TOP3 $\beta$ , nach Transfektion und Expression in HeLa-Zellen, im Cytoplasma gefunden, wo es mit endogenem TUBA colokalisiert (Abbildung 4-29). Dies ist konsistent mit der ursprünglichen Copräzipitation beider Proteine aus Cytoplasma-Extrakt von HeLa-Zellen. Der Befund war aber insofern unerwartet, als dass man für ein Enzym mit putativem Kernlokalisierungssignal und DNA als Substrat eher eine Lokalisation im Zellkern erwarten würde. Er steht überdies im Widerspruch zu Daten von Shimamoto *et al.* (2000). In dieser Veröffentlichung war TOP3 $\beta$  in 293EBNA-Zellen überexprimiert und über ein N-terminales Flag-tag im Nucleoplasma detektiert worden, wo es mit ebenfalls überexprimiertem GFP-RecQ5 $\beta$  colokalisierte. Diese widersprüchliche intrazelluläre Verteilung der Topoisomerase könnte prinzipiell auf Unterschiede zwischen den verwendeten Zell-Linien hindeuten, oder auf die Verwendung der unterschiedlichen Protein-tags (GFP bzw. Flag) zurückzuführen sein. Ebenso ist nicht klar, wie stark die Proteine gegenüber dem endogenen TOP3 $\beta$ -Level jeweils überexprimiert waren und welchen Einfluss dies auf die intrazelluläre Verteilung der rekombinanten Proteine hat. Die Immunlokalisierung von endogenem TOP3 $\beta$  mit einem spezifischen Antikörper konnte indessen die hier beobachtete Lokalisation bestätigen (persönliche Mitteilung von Prof. S.W. Ng, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA). Insbesondere scheint das Protein dabei, ähnlich wie für TUBA beobachtet, in der Nähe der Kernhülle konzentriert zu sein. Da auch TUBA im Cytoplasma und im Zellkern gefunden wird, ergibt sich aus den unterschiedlichen Befunden die interessante, wenngleich spekulative Vorstellung, dass TUBA die intrazelluläre Lokalisation von TOP3 $\beta$  regulieren könnte. So wäre denkbar, dass TOP3 $\beta$  durch die Interaktion mit TUBA im Cytoplasma und damit räumlich getrennt von seinem putativen Substrat gehalten wird. Ein bestimmtes Signal in der Zelle könnte dann – entweder nach Freisetzung oder im Komplex mit TUBA – zur Translokation in den Zellkern führen, wo TOP3 $\beta$  dann mit RecQ5 $\beta$  interagiert und seiner Funktion als DNA-Enzym nachkommt.

Die Analyse verschiedener Tudor-Domänen-Proteine führte zu der Vermutung, dass diese allgemein an RNA-metabolen Prozessen beteiligt sind (s. o., Ponting, 1997). Interessanterweise wurde für DNA-Topoisomerase-III aus *E. coli* gezeigt, dass das Enzym synthetisch erzeugte RNA-Stränge topologisch verändern kann und demnach *in vitro* auch eine Aktivität als RNA-Topoisomerase besitzt (Wang *et al.*, 1996). Ob diese Aktivität *in vivo* eine Relevanz hat und ob ähnliches auch mit eukaryontischen Topoisomerasen beobachtet werden kann, ist nicht bekannt. Wegen ihrer Interaktion mit dem Tudor-Domänen-Protein TUBA wäre TOP3 $\beta$  aber ein attraktiver Kandidat für eine solche RNA-Topoisomerase. Es bleibt abzuwarten, ob die weitere Erforschung der Funktion von TOP3 $\beta$  dabei helfen wird, die Rolle der Interaktion mit TUBA besser zu verstehen.

### **5.2.3 TUBA ist ein Komplexpartner von FMRP und seinen Homologen**

Eine zweite Strategie zur Identifizierung von Interaktionspartnern bestand in der Durchführung eines *Two-Hybrid-Screens* mit der TUBA-Sequenz als *bait*-Konstrukt. Hierbei wurde FXR1 als Bindungspartner von TUBA entdeckt. Bindungsexperimente bestätigten *in vitro* die Interaktion zwischen beiden Proteinen. Darüberhinaus bindet TUBA auch an die beiden FXR1-homologen Proteine FXR2 und vor allem FMRP, das Produkt des Krankheitsgens des Fragilen-X-Syndroms (Abbildung 4-31). Durch Experimente mit rekombinant exprimierten, aufgereinigten Proteinen wurde herausgefunden, dass die Bindung zwischen TUBA und den drei Proteinen der FMRP-Familie jeweils direkt und in einem 1:1-Verhältnis erfolgt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Interaktion von TUBA mit FMRP vergleichsweise stabil ist (bis mindestens 750 mM NaCl, Abbildung 4-39). Als wichtigstes Indiz für eine tatsächliche Interaktion der Proteine *in vivo* gilt der Befund, dass FMRP durch Immunpräzipitation von TUBA aus Zellextrakt copräzipitiert werden konnte und umgekehrt. Dabei wurde festgestellt, dass nur ein relativ geringer Teil des gesamten FMRP im Extrakt mit TUBA assoziiert ist (Abbildung 4-32A). Offenbar interagiert TUBA also nur mit einem Teil des zellulären FMRP-Pools. Die Interaktion mit FXR1 und FXR2 konnte durch Copräzipitation von TUBA nach rekombinanter Expression und Immunpräzipitation beider Proteine über einen HA-tag bestätigt werden. Zusammengefasst deuten die Bindungsdaten darauf hin, dass TUBA ein bisher unbekannter Komplexpartner von FMRP und seinen Homologen FXR1 und FXR2 in der Zelle ist.

Fragiles-X-Syndrom, die häufigste erbliche Form mentaler Retardation beim Menschen, wird durch eine CGG-Trinucleotidexpansion im Promotorbereich des *FMR1*-Gens verursacht

(Verkerk *et al.*, 1991; Verheij *et al.*, 1993). Diese dynamische Mutation führt zur Inaktivierung der Transkription und damit zu einem Verlust des Genprodukts FMRP in den Zellen der Betroffenen. Die Sequenz von FMRP enthält drei konservierte RNA-Bindungsmotive: zwei KH-Domänen im mittleren Abschnitt und eine RGG-Box im C-terminalen Abschnitt der Primärstruktur (Ashley *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993). Daher wurde schon früh vermutet, dass das Protein eine Rolle im RNA-Stoffwechsel der Zelle spielt. FMRP ist ein hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiertes Protein, trägt aber sowohl ein Kernlokalisations- als auch ein Kernexportsignal. Man nimmt daher an, dass es eine Funktion beim spezifischen Export von mRNAs aus dem Zellkern hat (Eberhart *et al.*, 1996). Verschiedene andere Untersuchungen konnten zeigen, dass FMRP, zusammen mit seinen Homologen FXR1 und FXR2 und anderen Proteinen, im Cytoplasma mit mRNPs (*messenger-Ribonucleoprotein-Partikeln*) und darüber mit aktiv translatierenden Polyribosomen assoziiert ist (Khandjian *et al.*, 1996; Tamanini *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997a; Ceman *et al.*, 1999; Schenck *et al.*, 2001). Die Ergebnisse von *in-vitro*-Experimenten und Studien in *X. laevis*-Oocyten schlagen für FMRP eine Funktion als negativer Regulator der Translation am Ribosom vor (Laggerbauer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass FMRP spezifisch mit bestimmten mRNAs assoziiert und in den nucleocytoplasmatischen Transport und die Kontrolle der Translation dieser mRNAs involviert ist. Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass FMRP über seine RGG-Box spezifisch an mRNAs bindet, die eine bestimmte intramolekulare Struktur, ein sogenanntes G-Quartett, tragen (Darnell *et al.*, 2001). Es konnten so bereits einige FMRP-assoziierte mRNAs isoliert werden, deren Fehlregulation (bei FMRP-Mangel) zur Entstehung der Symptomatik in Patienten mit Fragilem-X-Syndrom führen könnte (Brown *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit TUBA und FMRP (und seinen Homologen FXR1 und FXR2) werden durch weitere Beobachtungen untermauert. Prinzipiell ist TUBA, wie FMRP, ein hauptsächlich im Cytoplasma aber auch im Zellkern gefundenes Protein. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass beide Proteine im Cytoplasma partiell colokalisieren. Speziell in HeLa-Zellen wurden überlappende Signale dabei an tubulären Strukturen in der Umgebung des Zellkerns beobachtet (Abbildung 4-35). Bei Ultrastrukturanalysen in Rattenhirn-Neuronen wurde FMRP in Ribosomen-reichen Regionen, in der Nähe von oder zwischen Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums, lokalisiert (Feng *et al.*, 1997b). Wie für die TUBA-Lokalisation bereits oben diskutiert,

scheint es daher wahrscheinlich, dass es sich auch bei den hier beobachteten Strukturen um Bereiche des rauhen ERs handelt. Eine Ultrastrukturanalyse der cytoplasmatischen TUBA-Verteilung wird hierüber genaueren Aufschluss geben können. Interessanterweise wurde in Maus-Fibroblasten (3T3-Zellen) nur eine partielle Colokalisation von FMRP und TUBA beobachtet (Abbildung 4-35). Dabei wurden die stärksten Signale der Proteine oft auf verschiedenen Seiten des Zellkerns gefunden. Abgesehen von möglichen prinzipiellen Unterschieden zwischen den verwendeten Zell-Linien, könnte dies auch darauf zurückzuführen sein, dass TUBA, wie bei der Copräzipitation festgestellt wurde, nur mit einem Teil des cytoplasmatischen FMRP-Pools assoziiert ist.

Ein weiterer Hinweis auf eine *in-vivo*-Interaktion ist der Befund, dass FMRP und TUBA bei der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von Zellextrakten ein sehr ähnliches Sedimentationsverhalten zeigen. Beide verteilen sich über viele Fraktionen im hochmolekularen Bereich der Gradienten (Abbildung 4-34). Bei FMRP ist hierfür vermutlich die Assoziation mit mRNPs und Polyribosomen verantwortlich. Eine Interaktion von TUBA mit Ribosomen ist bisher nicht nachgewiesen worden, interessanterweise wurde aber im *Two-Hybrid-Screen* u. a. RPL12, ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit, als möglicher Interaktor von TUBA entdeckt. Die im *Two-Hybrid-Screen* beobachtete Interaktion konnte bisher *in vitro* noch nicht bestätigt werden. Es ist aber prinzipiell vorstellbar, dass TUBA direkt an Ribosomen bindet und so FMRP-assoziierte mRNPs an den Translationsort rekrutiert.

FMRP kann die Translation verschiedener mRNAs *in vitro* inhibieren (Laggerbauer *et al.*, 2001). Es wurde daher untersucht, ob die Interaktion mit TUBA diese Aktivität von FMRP in irgendeiner Weise beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass schon TUBA alleine die Translation einer mRNA in Reticulocytelysate hemmt (Abbildung 4-36), vermutlich durch unspezifisches Abfangen der mRNA im Ansatz aufgrund der hohen positiven Ladung des Proteins (der errechnete isoelektrische Punkt von TUBA liegt bei pH 9,7). Mit dem gleichen experimentellen Ansatz wurde auch ein C-terminales Fragment von TUBA untersucht, das mit hoher Effizienz noch an FMRP bindet, alleine aber die *in-vitro*-Translation einer mRNA nicht beeinflusst. Die Interaktion von FMRP mit diesem Fragment hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Aktivität des Proteins als Inhibitor der Translation (Abbildung 4-37). Da das Fragment nur etwa das C-terminale Drittel der vollständigen TUBA-Sequenz umfasst, ist es natürlich gut möglich, dass hier zwar noch die FMRP-bindende Domäne enthalten ist, aber andere, für die Funktion dieser Interaktion wichtige Bereiche des Proteins nicht mehr zur

Verfügung stehen. Daher konnte die Bedeutung der TUBA-FMRP-Interaktion bei der Translation bisher nicht geklärt werden.

Die Kartierung der TUBA-Bindungsstelle von FMRP durch Deletionsmutanten ergab, dass zwei unterschiedliche Regionen in der Primärstruktur für die Interaktion verantwortlich sind. Da keiner der beiden Bereiche alleine eine Bindungsaktivität zeigt, kann man vermuten, dass sich beide im gefalteten Protein in räumlicher Nähe zueinander befinden und gemeinsam die TUBA-Bindungsstelle konstituieren. Eine der beiden Regionen umfasst den Abschnitt von FMRP mit den beiden KH-Domänen. Interessanterweise ist ein Patient mit Fragilem-X-Syndrom beschrieben, bei dem statt einer CGG-Expansion eine Punktmutation innerhalb des offenen Leserasters gefunden wurde, die zu einem Aminosäure-Austausch (I304N) innerhalb der zweiten KH-Domäne (KH2) von FMRP führt (De Boule *et al.*, 1993). Der Betroffene weist dabei einen besonders schweren Krankheitsphänotyp auf. In Bindungsexperimenten konnte diese Mutante, FMRP-I304N, nicht mehr mit TUBA interagieren (Abbildung 4-39). Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Interaktion von FMRP mit TUBA essentiell für die Funktion des Proteins ist und dass ihr Ausbleiben ursächlich an der Entstehung der Symptome bei Fragilem-X-Syndrom beteiligt sein könnte. NMR-Analysen von FMRP-Fragmenten deuten darauf hin, dass nur die erste der beiden KH-Domänen (KH1) eine entsprechende Faltung aufweist und RNA-bindungsaktiv ist (Adinolfi *et al.*, 1999). Der KH2-Abschnitt, in dem auch die I304N-Mutation gefunden wird, ist dagegen ungefaltet und bindet *in vitro* nicht an RNA. Er hat daher vermutlich eher eine Bedeutung bei Protein-Protein-Wechselwirkungen (wie z. B. mit TUBA) als bei der RNA-Bindung durch FMRP. Dies ist konsistent mit dem Befund, dass FMRP-I304N im Cytoplasma keine veränderte Assoziation mit mRNA aufweist (Feng *et al.*, 1997a). Dagegen ist FMRP-I304N aber, wie die Untersuchung weiter zeigt, in abnorme mRNPs integriert, die im Gegensatz zu Wildtyp-FMRP nicht mehr mit Polyribosomen assoziiert sind. Tatsächlich konnten Lagerbauer *et al.* (2001) beobachten, dass FMRP-I304N keine Aktivität als Inhibitor der Translation einer mRNA *in vitro* mehr besitzt. Da die Mutante nicht mehr mit TUBA interagieren kann, könnte letzteres direkt in die postulierte Funktion von FMRP als Regulator der Translation am Ribosom involviert sein. Ein weiterer Befund der Analyse von FMRP-I304N war, dass die Mutante im Gegensatz zu Wildtyp-FMRP nicht mehr mit sich selbst interagieren kann (Lagerbauer *et al.*, 2001). Die Untersuchungen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Dimerisierung von FMRP aber vermutlich keine Voraussetzung für die Interaktion mit TUBA ist. So konnte mit rekombinant exprimierten Proteinen gezeigt werden, dass der Homo-

Dimerisierungsdefekt von FMRP-I304N nicht vollständig ist. Während die Mutante noch etwa 20 % Selbstbindungsaktivität aufweist (verglichen mit der Heterodimerisierung von FMRP-I304N mit Wildtyp-FMRP), konnte trotzdem kein TUBA an I304N-Homooligomere gebunden werden (Abbildung 4-40).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die genaue Funktion der Interaktion von TUBA mit FMRP bisher nicht geklärt werden konnte. Gerade die Tatsache aber, dass die Mutante FMRP-I304N, die im Patienten einen starken Phänotyp verursacht, keine TUBA-Bindungsaktivität mehr zeigt, lässt vermuten, dass TUBA eine wichtige Rolle bei der bisher ebenfalls nur teilweise verstandenen Funktion von FMRP in der Zelle spielt.

#### **5.2.4 Die Funktionen von Tudor-, UBA- und anderen Domänen**

Durch Bindungsstudien wurden die für die verschiedenen Interaktionen verantwortlichen Domänen von TUBA kartiert. Es stellte sich heraus, dass der N-Terminus von TUBA (Aminosäuren 1-185) für die Interaktion mit TOP3 $\beta$  verantwortlich ist. FMRP wird dagegen am C-terminalen Abschnitt, der auch die Tudor-Domäne des Proteins beinhaltet, gebunden (Abbildung 4-41). Die Tudor-Domäne von SMNrp war als GCN5-Interaktionsdomäne beschrieben worden (s. o.), die Tudor-Domäne von SMN ist für die Bindung an Sm-Proteine verantwortlich (Bühler *et al.*, 1999). Eine genauere Kartierung zeigte, dass FMRP nicht an die Tudor-Domäne von TUBA sondern an eine direkt angrenzende Region (Aminosäuren 707-723) bindet. Die FMRP-Bindung wird dabei durch die Deletion der Tudor-Domäne nicht beeinträchtigt (Abbildung 4-42). Die Funktion der Tudor-Domäne von TUBA ist daher noch nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass sie auch in TUBA eine Funktion als Protein-Protein-Interaktionsdomäne hat und sich daher vermutlich noch weitere Bindungspartner von TUBA finden lassen.

TUBA trägt im mittleren Abschnitt der Primärstruktur (Aminosäuren 288-324) eine Ubiquitin-assoziierte-Domäne (UBA-Domäne). Als mit dieser Arbeit begonnen wurde, war nur bekannt, dass es sich dabei um eine konservierte Domäne mit noch unbekannter Funktion handelt, die in einigen, am Ubiquitin-Stoffwechsel beteiligten Proteinen gefunden wird (Hofmann und Bucher, 1996). Es wurde vermutet, dass UBA-Domänen mit Ubiquitin interagieren können. Durch Bindungsexperimente konnte tatsächlich eindeutig gezeigt werden, dass die UBA-Domäne von TUBA spezifisch an multimere Ubiquitin-Ketten bindet, in denen die einzelnen Monomere über Lys<sub>48</sub> miteinander verknüpft sind (Abbildung 4-43). Auf diese Weise verknüpfte Ubiquitin-Ketten findet man üblicherweise kovalent gekoppelt an

Proteinen vor, die für den Abbau am 26S-Proteasom bestimmt sind. Sie sind das eigentliche Abbausignal und werden von den 19S-Komplexen an den Enden des Proteasoms erkannt (Pickart, 2000). Dagegen konnten Lys<sub>63</sub>-verknüpfte Ubiquitin-Ketten in den Bindungsstudien nicht an TUBA oder die isolierte UBA-Domäne binden. Wie man inzwischen weiß, ist diese alternative Ubiquitin-Verknüpfung kein Abbausignal, sondern dient vermutlich als Signal bei Prozessen wie DNA-Reparatur, mitochondrialer Vererbung oder der Endocytose bestimmter Hefe-Proteine (Pickart, 2000). Demnach interagiert TUBA in der Zelle vermutlich mit Proteinen, die für den Abbau am Proteasom markiert sind. Mit den hier gezeigten Bindungsexperimenten konnte die bis dahin nur postulierte Funktion von UBA-Domänen als Ubiquitin-Bindungsmotiv bewiesen werden. Dieser Befund ist inzwischen für andere Proteine mit UBA-Domänen bestätigt worden. So wurde auch für die Hefe-Proteine Rad23, Mud1 und andere eine Interaktion mit Ubiquitin über ihre UBA-Domänen gezeigt (Bertolaet *et al.*, 2001b; Chen *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001). Wilkinson *et al.* (2001) fanden dabei heraus, dass die UBA-Domäne von Mud1 mit über 300fach höherer Affinität an Lys<sub>48</sub>-verknüpftes Tetra-Ubiquitin als an monomeres Ubiquitin bindet. Dies ist konsistent mit der hier gemachten Beobachtung, dass TUBA (über seine UBA-Domäne) zwar mit Tetra-Ubiquitin, nicht aber mit monomerem Ubiquitin interagiert.

Es bleibt fraglich, welche Funktion die putative Wechselwirkung von TUBA mit abbaumarkierten, multi-ubiquitinierten Proteinen in der Zelle haben könnte. In einer Untersuchung des Hefeproteins Rad23 war festgestellt worden, dass es die Multiubiquitinierung von Proteinen verhindern konnte, offenbar indem es (über seine UBA-Domäne) an naszierende Ubiquitin-Ketten bindet und diese gegen weitere Ubiquitin-Verknüpfungen abschirmt (Ortolan *et al.*, 2000). Es wird diskutiert, dass Rad23 durch die Bindung und damit das „Capping“ von Ubiquitin-Ketten die Stabilität seiner *in-vivo*-Zielproteine regulieren könnte. Eine ähnliche Funktion ist entsprechend auch für TUBA denkbar. Neben noch unbekanntem Proteinen wären mögliche Kandidaten hierfür die bereits identifizierten Bindungspartner TOP3 $\beta$  oder die Proteine der FMRP-Familie. Für alle ist bisher nicht bekannt, ob sie in der Zelle durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse am 26S-Proteasom degradiert werden. Ein weiterer interessanter Befund aus Untersuchungen von Rad23 ist, dass die UBA-Domäne für die Dimerisierung des Proteins essentiell ist und dass die Dimerisierung die Bindung an Ubiquitin ausschließt (Bertolaet *et al.*, 2001a). Danach spielt die Dimerisierung möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Rad23-Funktion. Auch für TUBA konnte in Bindungsexperimenten eine Di- oder Oligomerisierungsaktivität beobachtet werden (nicht

gezeigt). Die dafür verantwortliche Domäne des Proteins ist allerdings bisher noch nicht kartiert.

Obwohl mit TOP3 $\beta$ , den Proteinen der FMRP-Familie und Lys<sub>48</sub>-verknüpften Ubiquitin-Ketten bereits mehrere spezifische Interaktoren von TUBA entdeckt wurden, sind in allen Fällen die Funktionen dieser Interaktionen noch unbekannt. Auch die Funktionen dieser Bindungspartner liegen zum Teil noch im Dunkeln, sie scheinen aber in zelluläre Prozesse involviert zu sein, die bisher als nicht im Zusammenhang stehend betrachtet werden. Es wird daher interessant sein, zu erforschen, ob die verschiedenen Wechselwirkungen gleichzeitig an TUBA erfolgen und ob es dadurch Verbindungen zwischen den unterschiedlichen Prozessen in der Zelle gibt. Ebenso bleibt abzuwarten, welche Rolle die Tudor-Domäne bei diesen Zusammenhängen spielt. Abschließend lässt sich aber bereits festhalten, dass TUBA, wie schon SMN und SMNrp, offenbar ein multifunktionelles Protein in der Zelle ist.

## 6 Zusammenfassung

Spinale Muskelatrophie, die zweithäufigste autosomal rezessive Erbkrankheit mit Todesfolge beim Menschen, wird durch Mutationen im *SMN1*-Gen verursacht, die zu einem Mangel an funktionellem SMN-Protein in den Zellen führen. SMN besitzt eine konservierte Tudor-Domäne und lokalisiert im Cytoplasma und im Zellkern. Das Protein ist Teil makromolekularer Komplexe und wird für die Zusammenlagerung der spleißosomalen snRNPs und vermutlich auch anderer RNA-Protein-Partikel benötigt. Am Anfang dieser Arbeit stand die Frage, ob es verwandte Proteine von SMN im Menschen mit einer möglicherweise ähnlichen Funktion gibt. Durch Datenbanksuchen wurden zwei bisher unbekannte, ubiquitär exprimierte Gene entdeckt, die für Proteine mit signifikanter Homologie zu SMN codieren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Charakterisierung dieser Proteine.

Das *SMN related protein* (SMNrp), das erste der beiden, besteht aus 238 Aminosäuren, und lokalisiert im Zellkern. Hier wird es an Perichromatinfibrillen gefunden, die als aktive Bereiche der Transkription und des prä-mRNA-Spleißens gelten. SMNrp ist mit dem spleißosomalen 17S-U2-snRNP assoziiert. Es konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass das Protein ein essentieller Spleißfaktor ist, der noch vor der ersten Transesterifizierungsreaktion des mehrschrittigen Prozesses benötigt wird. Daneben hat SMNrp möglicherweise auch eine Funktion bei der Aktivierung der Transkription. So wurde durch *Two-Hybrid-Screen* die Histon-Acetyltransferase GCN5-S als putativer Interaktor von SMNrp identifiziert. Bindungsstudien zeigen, dass die Tudor-Domäne von SMNrp für die Bindung an GCN5-S benötigt wird. SMNrp hat einen bedeutenden Einfluss auf die Acetylierungsaktivität von GCN5-S. Ein SMNrp-GCN5-S-Komplex ist in der Lage, *in vitro* Histone zu acetylieren, die in Nucleosomen verpackt sind. Dieses eigentliche *in-vivo*-Substrat der Acetyltransferase kann von GCN5-S alleine nicht modifiziert werden. Demnach könnte SMNrp ein Cofaktor von GCN5-S im Zellkern sein, der die katalytische Aktivität des Enzyms entscheidend moduliert. Mit seiner Rolle beim Spleißen und vermutlich auch bei der Transkriptionsaktivierung wurde mit SMNrp ein Protein beschrieben, das, wie auch das homologe SMN, offenbar verschiedene Funktionen in der Zelle hat.

Das *Tudor and UBA domain-containing protein* (TUBA), das zweite der beiden neu entdeckten Proteine, besteht aus 744 Aminosäuren und lokalisiert im Zellkern und im Cytoplasma. Über seine Ubiquitin-assoziierte (UBA-) Domäne bindet TUBA *in vitro* spezifisch an Lys<sub>48</sub>-verknüpfte Ubiquitin-Ketten. In der Zelle interagiert TUBA dadurch

vermutlich mit Proteinen, die für den Abbau am 26S-Proteasom markiert sind. Darüberhinaus konnten noch weitere Interaktionspartner von TUBA identifiziert werden: Über seinen N-Terminus bindet TUBA an die erst kürzlich entdeckte DNA-Topoisomerase-III-beta (TOP3 $\beta$ ). Die Bedeutung dieser Interaktion ist noch unklar. So zeigt TUBA keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität von TOP3 $\beta$  in Decatenierungsexperimenten. Außerdem wurden FMRP, das Produkt des Krankheitsgens des Fragilen-X-Syndroms, und seine Homologen FXR1 und FXR2 als TUBA-Interaktoren identifiziert. TUBA und FMRP zeigen ein ähnliches Sedimentationsverhalten bei der Dichtegradienten-Zentrifugation und colokalisieren partiell im Cytoplasma. Ein Einfluss von TUBA auf die Funktion von FMRP als Inhibitor der Translation *in vitro* konnte nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise kann aber die Austauschmutante FMRP-I304N nicht mehr mit TUBA interagieren. Diese Mutante stammt aus einem Patienten mit einem stark ausgeprägten Fragilen-X-Syndrom. Der beobachtete TUBA-Bindungsdefekt könnte daher eine Rolle bei der Entstehung der Krankheitssymptome spielen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Achsel T., Brahm H., Kastner B., Bachi A., Wilm M. und Lührmann R. (1999): A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *Embo J* **18**: 5789-5802.
- Adinolfi S., Bagni C., Musco G., Gibson T., Mazzarella L. und Pastore A. (1999): Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains. *Rna* **5**: 1248-1258.
- Allfrey V., Faulkner R.M. und Mirsky A.E. (1964): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Amikura R., Hanyu K., Kashikawa M. und Kobayashi S. (2001): Tudor protein is essential for the localization of mitochondrial RNAs in polar granules of *Drosophila* embryos. *Mech Dev* **107**: 97-104.
- Anderson J.D., Lowary P.T. und Widom J. (2001): Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol* **307**: 977-985.
- Andrade L.E., Chan E.K., Raska I., Peebles C.L., Roos G. und Tan E.M. (1991): Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* **173**: 1407-1419.
- Andreassi C., Jarecki J., Zhou J., Covert D.D., Monani U.R., Chen X., Whitney M., Pollok B., Zhang M., Androphy E. und Burghes A.H. (2001): Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* **10**: 2841-2849.
- Ashley C.T., Jr., Wilkinson K.D., Reines D. und Warren S.T. (1993): FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**: 563-566.
- Bardsley A., McDonald K. und Boswell R.E. (1993): Distribution of tudor protein in the *Drosophila* embryo suggests separation of functions based on site of localization. *Development* **119**: 207-219.
- Barlev N.A., Poltoratsky V., Owen-Hughes T., Ying C., Liu L., Workman J.L. und Berger S.L. (1998): Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol* **18**: 1349-1358.
- Behrens S.E., Tyc K., Kastner B., Reichelt J. und Lührmann R. (1993): Small nuclear ribonucleoprotein (RNP) U2 contains numerous additional proteins and has a bipartite RNP structure under splicing conditions. *Mol Cell Biol* **13**: 307-319.
- Berger S.L. (2002): Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 142-148.
- Bertolaet B.L., Clarke D.J., Wolff M., Watson M.H., Henze M., Divita G. und Reed S.I. (2001a): UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J Mol Biol* **313**: 955-963.
- Bertolaet B.L., Clarke D.J., Wolff M., Watson M.H., Henze M., Divita G. und Reed S.I. (2001b): UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* **8**: 417-422.
- Brahms H., Meheus L., de Brabandere V., Fischer U. und Lührmann R. (2001): Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* **7**: 1-12.

- Brand M., Yamamoto K., Staub A. und Tora L. (1999): Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J Biol Chem* **274**: 18285-18289.
- Brown V., Jin P., Ceman S., Darnell J.C., O'Donnell W.T., Tenenbaum S.A., Jin X., Feng Y., Wilkinson K.D., Keene J.D., Darnell R.B. und Warren S.T. (2001): Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**: 477-487.
- Brown V., Small K., Lakkis L., Feng Y., Gunter C., Wilkinson K.D. und Warren S.T. (1998): Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* **273**: 15521-15527.
- Brzustowicz L.M., Lehner T., Castilla L.H., Penchaszadeh G.K., Wilhelmsen K.C., Daniels R., Davies K.E., Leppert M., Ziter F., Wood D. und et al. (1990): Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* **344**: 540-541.
- Bühler D. (2001): "Untersuchungen zur Funktion von SMN während der U snRNP Biogenese" Dissertation am Fachbereich Biologie - Chemie - Pharmazie, Freie Universität Berlin.
- Bühler D., Raker V., Lührmann R. und Fischer U. (1999): Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **8**: 2351-2357.
- Burd C.G. und Dreyfuss G. (1994): Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.
- Burge C., Tuschl T. und Sharp P.A. (1999): Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In "The RNA World" (R.F. Gesteland, T.R. Cech und J.F. Atkins, Ed.), S. 525-560. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Callebaut I. und Mornon J.P. (1997): The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochem J* **321 ( Pt 1)**: 125-132.
- Campbell L., Hunter K.M., Mohaghegh P., Tinsley J.M., Brasch M.A. und Davies K.E. (2000): Direct interaction of Smn with dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum Mol Genet* **9**: 1093-1100.
- Carvalho T., Almeida F., Calapez A., Lafarga M., Berciano M.T. und Carmo-Fonseca M. (1999): The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN. A link between snrnp biogenesis and the cajal (coiled) body. *J Cell Biol* **147**: 715-728.
- Caspary F. und Seraphin B. (1998): The yeast U2A/U2B complex is required for pre-spliceosome formation. *Embo J* **17**: 6348-6358.
- Caspary F., Shevchenko A., Wilm M. und Seraphin B. (1999): Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *Embo J* **18**: 3463-3474.
- Ceman S., Brown V. und Warren S.T. (1999): Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* **19**: 7925-7932.
- Champoux J.J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**: 369-413.
- Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A., Shevchenko A., Mann M. und Dreyfuss G. (1999): Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol* **147**: 1181-1194.

- Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A., Yong J., Shevchenko A., Mann M. und Dreyfuss G. (2000): Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol* **148**: 1177-1186.
- Chen L., Shinde U., Ortolan T.G. und Madura K. (2001): Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* **2**: 933-938.
- Claret F.X., Hibi M., Dhut S., Toda T. und Karin M. (1996): A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* **383**: 453-457.
- Coovert D.D., Le T.T., McAndrew P.E., Strasswimmer J., Crawford T.O., Mendell J.R., Coulson S.E., Androphy E.J., Prior T.W. und Burghes A.H. (1997): The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **6**: 1205-1214.
- Cramer P., Caceres J.F., Cazalla D., Kadener S., Muro A.F., Baralle F.E. und Kornblihtt A.R. (1999): Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol Cell* **4**: 251-258.
- Darnell J.C., Jensen K.B., Jin P., Brown V., Warren S.T. und Darnell R.B. (2001): Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**: 489-499.
- Das B.K., Xia L., Palandjian L., Gozani O., Chyung Y. und Reed R. (1999): Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155. *Mol Cell Biol* **19**: 6796-6802.
- De Boulle K., Verkerk A.J., Reyniers E., Vits L., Hendrickx J., Van Roy B., Van den Bos F., de Graaff E., Oostra B.A. und Willems P.J. (1993): A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* **3**: 31-35.
- de Vries B.B., van den Ouweland A.M., Mohkamsing S., Duivenvoorden H.J., Mol E., Gelsema K., van Rijn M., Halley D.J., Sandkuijl L.A., Oostra B.A., Tibben A. und Niermeijer M.F. (1997): Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* **61**: 660-667.
- DiDonato C.J., Chen X.N., Noya D., Korenberg J.R., Nadeau J.H. und Simard L.R. (1997): Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res* **7**: 339-352.
- Dignam J.D., Lebovitz R.M. und Roeder R.G. (1983): Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**: 1475-1489.
- Eberhart D.E., Malter H.E., Feng Y. und Warren S.T. (1996): The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* **5**: 1083-1091.
- Eckerskorn C. und Lottspeich F. (1989): Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia* **28**: 92-94.
- Ellis N.A., Groden J., Ye T.Z., Straughen J., Lennon D.J., Ciocci S., Proytcheva M. und German J. (1995): The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655-666.
- Fakan S. (1994): Perichromatin fibrils are *in situ* forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol* **4**: 86-90.
- Feng Y., Absher D., Eberhart D.E., Brown V., Malter H.E. und Warren S.T. (1997a): FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell* **1**: 109-118.

- Feng Y., Gutekunst C.A., Eberhart D.E., Yi H., Warren S.T. und Hersch S.M. (1997b): Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* **17**: 1539-1547.
- Fields S. und Song O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fischer U., Huber J., Boelens W.C., Mattaj I.W. und Lührmann R. (1995): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483.
- Fischer U., Liu Q. und Dreyfuss G. (1997): The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90**: 1023-1029.
- Fischer U. und Lührmann R. (1990): An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus. *Science* **249**: 786-790.
- Friesen W.J. und Dreyfuss G. (2000): Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem* **275**: 26370-26375.
- Friesen W.J., Massenet S., Paushkin S., Wyce A. und Dreyfuss G. (2001): SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell* **7**: 1111-1117.
- Gangloff S., McDonald J.P., Bendixen C., Arthur L. und Rothstein R. (1994): The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* **14**: 8391-8398.
- Gangwani L., Mikrut M., Theroux S., Sharma M. und Davis R.J. (2001): Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol* **3**: 376-383.
- Giesemann T., Rathke-Hartlieb S., Rothkegel M., Bartsch J.W., Buchmeier S., Jockusch B.M. und Jockusch H. (1999): A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* **274**: 37908-37914.
- Gietz R.D. und Woods R.A. (1994): High efficiency transformation with lithium acetate. In "Molecular genetics of yeast, a practical approach" (J.R. Johnston, Ed.), S. 121-134. Oxford University Press, Oxford.
- Gillespie D.E. und Berg C.A. (1995): Homeless is required for RNA localization in *Drosophila* oogenesis and encodes a new member of the DE-H family of RNA-dependent ATPases. *Genes Dev* **9**: 2495-2508.
- Gilliam T.C., Brzustowicz L.M., Castilla L.H., Lehner T., Penchaszadeh G.K., Daniels R.J., Byth B.C., Knowles J., Hislop J.E., Shapira Y. und et al. (1990): Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* **345**: 823-825.
- Golumbeski G.S., Bardsley A., Tax F. und Boswell R.E. (1991): tudor, a posterior-group gene of *Drosophila melanogaster*, encodes a novel protein and an mRNA localized during mid-oogenesis. *Genes Dev* **5**: 2060-2070.
- Grant P.A., Duggan L., Cote J., Roberts S.M., Brownell J.E., Candau R., Ohba R., Owen-Hughes T., Allis C.D., Winston F., Berger S.L. und Workman J.L. (1997): Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**: 1640-1650.
- Grant P.A., Schieltz D., Pray-Grant M.G., Steger D.J., Reese J.C., Yates J.R., 3rd und Workman J.L. (1998a): A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**: 45-53.

- Grant P.A., Sterner D.E., Duggan L.J., Workman J.L. und Berger S.L. (1998b): The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol* **8**: 193-197.
- Gubitz A.K., Mourelatos Z., Abel L., Rappsilber J., Mann M. und Dreyfuss G. (2002): Gemin5, a Novel WD Repeat Protein Component of the SMN Complex That Binds Sm Proteins. *J Biol Chem* **277**: 5631-5636.
- Hamm J., Darzynkiewicz, E., Tahara, S. M. and Mattaj, I. W. (1990): The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal. *Cell* **62**: 569-577.
- Hannus S. (2001): "Funktionsanalyse zweier *S. pombe* Proteine mit Homologie zu SMN, dem Krankheitsgen der spinalen Muskelatrophie" Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und vorklinische Medizin, Universität Regensburg.
- Hannus S., Bühler D., Romano M., Seraphin B. und Fischer U. (2000): The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1. *Hum Mol Genet* **9**: 663-674.
- Harlow E. und Lane D.P. (1988): "Antibodies. A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Hebert M.D., Szymczyk P.W., Shpargel K.B. und Matera A.G. (2001): Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev* **15**: 2720-2729.
- Hirose T., Kawabuchi M., Tamaru T., Okumura N., Nagai K. und Okada M. (2000): Identification of tudor repeat associator with PCTAIRE 2 (Trap). A novel protein that interacts with the N-terminal domain of PCTAIRE 2 in rat brain. *Eur J Biochem* **267**: 2113-2121.
- Hirose Y. und Manley J.L. (2000): RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**: 1415-1429.
- Hodges P.E. und Beggs J.D. (1994): RNA splicing. U2 fulfils a commitment. *Curr Biol* **4**: 264-267.
- Hofmann K. und Bucher P. (1996): The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci* **21**: 172-173.
- Hofmann Y., Lorson C.L., Stamm S., Androphy E.J. und Wirth B. (2000): Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9618-9623.
- Horiuchi J., Silverman N., Pina B., Marcus G.A. und Guarente L. (1997): ADA1, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than GCN5, ADA2, or ADA3. *Mol Cell Biol* **17**: 3220-3228.
- Hsieh-Li H.M., Chang J.G., Jong Y.J., Wu M.H., Wang N.M., Tsai C.H. und Li H. (2000): A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **24**: 66-70.
- Imbert G., Feng Y., Nelson D.L., Warren S.T. und Mandel J.L. (1998): FMR1 nd mutations in fragile X syndrome: molecular biology, biochemistry and genetics. In "Genetic Instabilitites and Hereditary Neurological Disorders" (R.D. Wells und S.T. Warren, Ed.), S. 27-53. Academic Press, San Diego, USA.
- Innis M.A. und Gelfand D.H. (1990): "PCR protocols: a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego.
- Jablonka S., Rossoll W., Schrank B. und Sendtner M. (2000a): The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol* **247 Suppl 1**: I37-42.

- Jablonka S., Schrank B., Kralewski M., Rossoll W. und Sendtner M. (2000b): Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet* **9**: 341-346.
- Jin P. und Warren S.T. (2000): Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 901-908.
- Jones K.W., Gorzynski K., Hales C.M., Fischer U., Badbanchi F., Terns R.M. und Terns M.P. (2001): Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem* **276**: 38645-38651.
- Kambach C., Walke S. und Nagai K. (1999): Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 222-230.
- Kastner B., Bach M. und Lührmann R. (1990): Electron microscopy of small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) particles U2 and U5: evidence for a common structure-determining principle in the major U snRNP family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1710-1714.
- Khandjian E.W., Corbin F., Woerly S. und Rousseau F. (1996): The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* **12**: 91-93.
- Kiss T. (2001): Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *Embo J* **20**: 3617-3622.
- Kouzarides T. (1999): Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 40-48.
- Kozak M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**: 8125-8148.
- Krämer A. (1996): The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* **65**: 367-409.
- Kuo M.H., Zhou J., Jambeck P., Churchill M.E. und Allis C.D. (1998): Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* **12**: 627-639.
- Kwan K.Y. und Wang J.C. (2001): Mice lacking DNA topoisomerase IIIbeta develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5717-5721.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laggerbauer B., Ostareck D., Keidel E.M., Ostareck-Lederer A. und Fischer U. (2001): Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* **10**: 329-338.
- Lamb F.S., Barna T.J., Goud C., Marenholz I., Mischke D. und Schutte B.C. (2000): Complex RNA processing of TDRKH, a novel gene encoding the putative RNA-binding tudor and KH domains. *Gene* **246**: 209-218.
- Lee D.Y., Hayes J.J., Pruss D. und Wolffe A.P. (1993): A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**: 73-84.
- Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M. und et al. (1995): Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene [see comments]. *Cell* **80**: 155-165.
- Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A., Dreyfuss G. und Melki J. (1997): Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **16**: 265-269.
- Li W. und Wang J.C. (1998): Mammalian DNA topoisomerase IIIalpha is essential in early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1010-1013.
- Li Z., Zhang Y., Ku L., Wilkinson K.D., Warren S.T. und Feng Y. (2001): The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* **29**: 2276-2283.

- Lindor N.M., Furuichi Y., Kitao S., Shimamoto A., Arndt C. und Jalal S. (2000): Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. *Am J Med Genet* **90**: 223-228.
- Liu Q. und Dreyfuss G. (1996): A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J* **15**: 3555-3565.
- Liu Q., Fischer U., Wang F. und Dreyfuss G. (1997): The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **90**: 1013-1021.
- Lorson C.L. und Androphy E.J. (2000): An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* **9**: 259-265.
- Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J. und Wirth B. (1999): A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6307-6311.
- Lorson C.L., Strasswimmer J., Yao J.M., Baleja J.D., Hahnen E., Wirth B., Le T., Burghes A.H. und Androphy E.J. (1998): SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* **19**: 63-66.
- MacKenzie A. und Gendron N.H. (2001): Tudor reign. *Nat Struct Biol* **8**: 13-15.
- Marmorstein R. und Roth S.Y. (2001): Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 155-161.
- Martinez E., Kundu T.K., Fu J. und Roeder R.G. (1998): A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* **273**: 23781-23785.
- Martinez E., Palhan V.B., Tjernberg A., Lyman E.S., Gamper A.M., Kundu T.K., Chait B.T. und Roeder R.G. (2001): Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* **21**: 6782-6795.
- Matera A.G. (1999): RNA splicing: more clues from spinal muscular atrophy. *Curr Biol* **9**: R140-142.
- Matera A.G. und Frey M.R. (1998): Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *Am J Hum Genet* **63**: 317-321.
- Mattaj I.W. (1986): Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46**: 905-911.
- Mattaj I.W. (1998): Ribonucleoprotein assembly: clues from spinal muscular atrophy. *Curr Biol* **8**: R93-95.
- McAllister G., Amara S.G. und Lerner M.R. (1988): Tissue-specific expression and cDNA cloning of small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5296-5300.
- Meister G., Bühler D., Laggerbauer B., Zobawa M., Lottspeich F. und Fischer U. (2000): Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet* **9**: 1977-1986.
- Meister G., Bühler D., Pillai R., Lottspeich F. und Fischer U. (2001a): A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *submitted*.
- Meister G., Eggert C., Bühler D., Brahm H., Kambach C. und Fischer U. (2001b): Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol* **11**: 1990-1994.

- Meister G., Hannus S., Plöttner O., Baars T., Hartmann E., Fakan S., Lagerbauer B. und Fischer U. (2001c): SMNrp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *Embo J* **20**: 2304-2314.
- Melki J., Abdelhak S., Sheth P., Bachelot M.F., Burllet P., Marcadet A., Aicardi J., Barois A., Carriere J.P., Fardeau M. und et al. (1990): Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* **344**: 767-768.
- Merril C.R., Goldman D. und Van Keuren M.L. (1983): Silver staining methods for polyacrylamid gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **96**: 230-239.
- Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W., Prior T.W., Androphy E.J., Burghes A.H. und McPherson J.D. (1999): A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* **8**: 1177-1183.
- Monani U.R., Sendtner M., Coovert D.D., Parsons D.W., Andreassi C., Le T.T., Jablonka S., Schrank B., Rossol W., Prior T.W., Morris G.E. und Burghes A.H. (2000): The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **9**: 333-339.
- Morinaga T., Yasuda H., Hashimoto T., Higashio K. und Tamaoki T. (1991): A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers. *Mol Cell Biol* **11**: 6041-6049.
- Morita T., Sato T., Nyunoya H., Tsujimoto A., Takahara J., Irino S. und Shimotohno K. (1993): Isolation of a cDNA clone encoding DNA-binding protein (TAXREB107) that binds specifically to domain C of the tax-responsive enhancer element in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**: 115-121.
- Mourelatos Z., Abel L., Yong J., Kataoka N. und Dreyfuss G. (2001): SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *Embo J* **20**: 5443-5452.
- Munsat T.L. und Davies K.E. (1992): International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* **2**: 423-428.
- Neubauer G., King A., Rappsilber J., Calvio C., Watson M., Ajuh P., Sleeman J., Lamond A. und Mann M. (1998): Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* **20**: 46-50.
- Ng S.W., Liu Y., Hasselblatt K.T., Mok S.C. und Berkowitz R.S. (1999): A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. *Nucleic Acids Res* **27**: 993-1000.
- Ogryzko V.V., Kotani T., Zhang X., Schiltz R.L., Howard T., Yang X.J., Howard B.H., Qin J. und Nakatani Y. (1998): Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**: 35-44.
- Orphanides G. und Reinberg D. (2002): A unified theory of gene expression. *Cell* **108**: 439-451.
- Ortolan T.G., Tongaonkar P., Lambertson D., Chen L., Schaubert C. und Madura K. (2000): The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol* **2**: 601-608.
- Owen N., Doe C.L., Mellor J. und Davies K.E. (2000): Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum Mol Genet* **9**: 675-684.
- Pearn J. (1978): Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* **10**: 260-265.
- Pearn J.H. (1973): The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England. *J Med Genet* **10**: 260-265.

- Pellizzoni L., Baccon J., Charroux B. und Dreyfuss G. (2001a): The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol* **11**: 1079-1088.
- Pellizzoni L., Baccon J., Rappsilber J., Mann M. und Dreyfuss G. (2001b): Purification of native SMN complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem*.
- Pellizzoni L., Charroux B. und Dreyfuss G. (1999): SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11167-11172.
- Pellizzoni L., Charroux B., Rappsilber J., Mann M. und Dreyfuss G. (2001c): A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol* **152**: 75-85.
- Pellizzoni L., Kataoka N., Charroux B. und Dreyfuss G. (1998): A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* **95**: 615-624.
- Pickart C.M. (2000): Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**: 544-548.
- Ponting C.P. (1997): Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci* **22**: 51-52.
- Porta A., Colonna-Romano S., Callebaut I., Franco A., Marzullo L., Kobayashi G.S. und Maresca B. (1999): An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 605-613.
- Proudfoot N.J., Furger A. und Dye M.J. (2002): Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**: 501-512.
- Puvion E. und Puvion-Dutilleul F. (1996): Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp Cell Res* **229**: 217-225.
- Raker V.A., Plessel G. und Lührmann R. (1996): The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *Embo J* **15**: 2256-2269.
- Rappsilber J., Ajuh P.M., Lamond A.I. und Mann M. (2001): SPF30, an essential human splice factor required for assembly of U4/U5/U6 tri-snRNP into the spliceosome. *J Biol Chem* **30**: 30.
- Recht J. und Osley M.A. (1999): Mutations in both the structured domain and N-terminus of histone H2B bypass the requirement for Swi-Snf in yeast. *Embo J* **18**: 229-240.
- Reed R. (1996): Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 215-220.
- Roberts D.G., Chavez J. und Court S.D.M. (1970): The genetic component in child mortality. *Arch. Dis. Child* **45**: 33-38.
- Rossoll W., Kroning A.K., Ohndorf U.M., Steegborn C., Jablonka S. und Sendtner M. (2002): Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* **11**: 93-105.
- Roth S.Y., Denu J.M. und Allis C.D. (2001): Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.
- Saleh A., Lang V., Cook R. und Brandl C.J. (1997): Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J Biol Chem* **272**: 5571-5578.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Schenck A., Bardoni B., Moro A., Bagni C. und Mandel J.L. (2001): A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8844-8849.
- Schmalbruch H. und Haase G. (2001): Spinal muscular atrophy: present state. *Brain Pathol* **11**: 231-247.
- Schrank B., Gotz R., Gunnensen J.M., Ure J.M., Toyka K.V., Smith A.G. und Sendtner M. (1997): Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9920-9925.
- Segault V., Will C.L., Sproat B.S. und Lührmann R. (1995): In vitro reconstitution of mammalian U2 and U5 snRNPs active in splicing: Sm proteins are functionally interchangeable and are essential for the formation of functional U2 and U5 snRNPs. *Embo J* **14**: 4010-4021.
- Seki T., Seki M., Onodera R., Katada T. und Enomoto T. (1998): Cloning of cDNA encoding a novel mouse DNA topoisomerase III (Topo IIIbeta) possessing negatively supercoiled DNA relaxing activity, whose message is highly expressed in the testis. *J Biol Chem* **273**: 28553-28556.
- Selenko P., Sprangers R., Stier G., Bühler D., Fischer U. und Sattler M. (2001): SMN Tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol* **8**: 27-31.
- Sendra R., Tse C. und Hansen J.C. (2000): The yeast histone acetyltransferase A2 complex, but not free Gcn5p, binds stably to nucleosomal arrays. *J Biol Chem* **275**: 24928-24934.
- Sewack G.F., Ellis T.W. und Hansen U. (2001): Binding of TATA binding protein to a naturally positioned nucleosome is facilitated by histone acetylation. *Mol Cell Biol* **21**: 1404-1415.
- Shimamoto A., Nishikawa K., Kitao S. und Furuichi Y. (2000): Human RecQ5beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3alpha and 3beta. *Nucleic Acids Res* **28**: 1647-1655.
- Silverman N., Agapite J. und Guarente L. (1994): Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11665-11668.
- Siomi H., Siomi M.C., Nussbaum R.L. und Dreyfuss G. (1993): The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**: 291-298.
- Siomi M.C., Siomi H., Sauer W.H., Srinivasan S., Nussbaum R.L. und Dreyfuss G. (1995): FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *Embo J* **14**: 2401-2408.
- Smith E.R., Belote J.M., Schiltz R.L., Yang X.J., Moore P.A., Berger S.L., Nakatani Y. und Allis C.D. (1998): Cloning of Drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res* **26**: 2948-2954.
- Stark H., Dube P., Lührmann R. und Kastner B. (2001): Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **409**: 539-542.
- Steen R.L., Martins S.B., Tasken K. und Collas P. (2000): Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**: 1251-1262.
- Strahl B.D. und Allis C.D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.

- Strasswimmer J., Lorson C.L., Breiding D.E., Chen J.J., Le T., Burghes A.H. und Androphy E.J. (1999): Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum Mol Genet* **8**: 1219-1226.
- Struhl K. (1998): Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**: 599-606.
- Struhl K. und Moqtaderi Z. (1998): The TAFs in the HAT. *Cell* **94**: 1-4.
- Talbot K., Miguel-Aliaga I., Mohaghegh P., Ponting C.P. und Davies K.E. (1998): Characterization of a gene encoding survival motor neuron (SMN)-related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Hum Mol Genet* **7**: 2149-2156.
- Talbot K., Ponting C.P., Theodosiou A.M., Rodrigues N.R., Surtees R., Mountford R. und Davies K.E. (1997): Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* **6**: 497-500.
- Tamanini F., Meijer N., Verheij C., Willems P.J., Galjaard H., Oostra B.A. und Hoogeveen A.T. (1996): FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet* **5**: 809-813.
- Taunton J., Hassig C.A. und Schreiber S.L. (1996): A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**: 408-411.
- Terns M.P. und Terns R.M. (2001): Macromolecular complexes: SMN - the master assembler. *Curr Biol* **11**: R862-864.
- Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tong X., Drapkin R., Yalamanchili R., Mosialos G. und Kieff E. (1995): The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol Cell Biol* **15**: 4735-4744.
- Trendelenburg G., Hummel M., Riecken E.O. und Hanski C. (1996): Molecular characterization of AKAP149, a novel A kinase anchor protein with a KH domain. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 313-319.
- Tucker K.E., Berciano M.T., Jacobs E.Y., LePage D.F., Shpargel K.B., Rossire J.J., Chan E.K., Lafarga M., Conlon R.A. und Matera A.G. (2001): Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J Cell Biol* **154**: 293-307.
- Turner B.M. (2000): Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**: 836-845.
- Turner G., Webb T., Wake S. und Robinson H. (1996): Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **64**: 196-197.
- Verheij C., Bakker C.E., de Graaff E., Keulemans J., Willemsen R., Verkerk A.J., Galjaard H., Reuser A.J., Hoogeveen A.T. und Oostra B.A. (1993): Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**: 722-724.
- Verkerk A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F.P. und et al. (1991): Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**: 905-914.
- Vettese-Dadey M., Grant P.A., Hebbes T.R., Crane- Robinson C., Allis C.D. und Workman J.L. (1996): Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J* **15**: 2508-2518.

- Viollet L., Bertrand S., Bueno Brunialti A.L., Lefebvre S., Burlet P., Clermont O., Cruaud C., Guenet J.L., Munnich A. und Melki J. (1997): cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn). *Genomics* **40**: 185-188.
- Wang H., Di Gate R.J. und Seeman N.C. (1996): An RNA topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9477-9482.
- Wang J.C. (1996): DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**: 635-692.
- Watt P.M., Hickson I.D., Borts R.H. und Louis E.J. (1996): SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**: 935-945.
- Weinstein L.B. und Steitz J.A. (1999): Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 378-384.
- Wilkinson C.R., Seeger M., Hartmann-Petersen R., Stone M., Wallace M., Semple C. und Gordon C. (2001): Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* **3**: 939-943.
- Will C.L. und Lührmann R. (2001): Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 290-301.
- Winston F. und Allis C.D. (1999): The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* **6**: 601-604.
- Wirth B. (2000): An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* **15**: 228-237.
- Workman J.L. und Kingston R.E. (1998): Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **67**: 545-579.
- Xu W., Edmondson D.G. und Roth S.Y. (1998): Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* **18**: 5659-5669.
- Yang H., Moss M.L., Lund E. und Dahlberg J.E. (1992): Nuclear processing of the 3'-terminal nucleotides of pre U1 snRNA in *Xenopus laevis* Oocytes. *Mol Cell Biol* **12**: 1553-1560.
- Yang X.J., Ogryzko V.V., Nishikawa J., Howard B.H. und Nakatani Y. (1996): A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**: 319-324.
- Young P.J., Le T.T., thi Man N., Burghes A.H. und Morris G.E. (2000): The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* **256**: 365-374.
- Yu C.E., Oshima J., Fu Y.H., Wijsman E.M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G.M., Mulligan J. und Schellenberg G.D. (1996): Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**: 258-262.
- Zeller R., Nyffenegger T. und De Robertis E.M. (1983): Nucleocytoplasmic distribution of snRNPs and stockpiled snRNA-binding proteins during oogenesis and early development in *Xenopus laevis*. *Cell* **32**: 425-434.
- Zhang Y.Q., Bailey A.M., Matthies H.J., Renden R.B., Smith M.A., Speese S.D., Rubin G.M. und Broadie K. (2001): *Drosophila* fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* **107**: 591-603.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
<sup>14</sup> C	Kohlenstoffisotop 14
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	complementäre DNA
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 × 10 <sup>10</sup> Bq)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (engl.: <i>counts per minute</i> )
Da	Dalton (Atommasse-einheit, u)
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	exprimierter Sequenzabschnitt (engl.: <i>expressed sequence tag</i> )
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	<i>bei Massenangaben:</i> Gramm
	<i>bei Zentrifugationen:</i> einfache Erdbeschleunigung (9,81 ms <sup>-2</sup> )
m <sup>7</sup> GpppG	7-Methyl-guanylyl-(5'-5')-guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde

---

HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser (zweifach destilliert)
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
KAc	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen(paare)
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Konz.	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter (dm <sup>3</sup> )
LiAc	Lithiumacetat
M	mol dm <sup>-3</sup>
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (engl.: <i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i> )
MgAc	Magnesiumacetat
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i> )
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaF	Natriumfluorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ( <a href="http://www.ncbi.nih.gov">http://www.ncbi.nih.gov</a> )
NMR	magnetische Kernresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NTP	Nucleosidtriphosphat
<sup>32</sup> P	Phosphorisotop 32
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

---

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
pCp	Cytidin-3'-5'-bisphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVA	Polyvinylalkohol
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden (engl.: <i>rapid amplification of cDNA ends</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
RNP	Ribonucleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
<sup>35</sup> S	Schwefelisotop 35
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SMA	spinale Muskelatrophie
snRNA	kleine nukleäre RNA (engl.: <i>small nuclear RNA</i> )
snRNP	kleines nukleäres RNP (engl.: <i>small nuclear RNP</i> )
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (engl.: <i>small nucleolar RNP</i> )
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u	Enzymeinheit, <i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i> )
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

## 8.2 Buchstabensymbole für Aminosäuren und Nucleotide

### Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

### Nucleotidbasen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## 8.3 Veröffentlichungen

### Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Meister G., Hannus S., Plöttner O., Baars T., Hartmann E., Fakan S., Laggerbauer B. und Fischer U. (2001): SMNrp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *Embo J* **20**: 2304-2314.

### Weitere Veröffentlichungen:

Kögel D., Plöttner O., Landsberg G., Christian S. und Scheidtmann K.H. (1998): Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* **17**: 2645-2654

Hannus S., Fischer U. und Plöttner O. (1999): Searching for the cause of spinal muscular atrophy. *Innovation* **7**: 4-6.

Malatesta M., Scassellati C., Fakan S., Meister G., Plöttner O., Bühler D., Martin T.E. und Fischer U. (2002): Survival of motor neuron (SMN) protein accumulates in nuclear domains different from coiled (Cajal) bodies. *Publikation zur Veröffentlichung eingereicht.*

## 8.4 Danksagungen

Bei allen, die auf irgendeine Weise zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen haben, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Utz Fischer, der mir die Bearbeitung des Themas in seiner Arbeitsgruppe angeboten hat. Durch seine Begeisterung an der Sache („Weißt du, was wir unbedingt mal testen müssen...“) gelang es ihm auch in schwierigen Phasen immer wieder aufs Neue zu motivieren.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Volker Herzog bedanken, nicht nur dafür, dass er sich bereit erklärt hat, die Arbeit an der Universität Bonn zu vertreten, sondern vor allem auch für seinen persönlichen Einsatz und seine Hilfsbereitschaft während meines ganzen Studiums.

Besonders verbunden bin ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „RNA-Metabolismus und neuronale Krankheiten“ am MPI in Martinsried, für ihre Geduld, ihre Hilfe und die lockere und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Speziell geht hier mein Dank an:

Gunter Meister, dem „einzig normalen“ in der Arbeitsgruppe, für die gute Zusammenarbeit auf dem 1s1-Projekt,

Eva Keidel und Dr. Bernhard Laggerbauer, für ihre mehrjährigen Beratungen bei wichtigen Entscheidungen und den „alltäglichen Wahnsinn“ in Labor L4 (ich werd's vermissen...!),

Dr. Michael Bandilla, für seine bandillige Art und seine Hilfe in den ersten zwei Jahren,

Stefan Hannus, für die politischen Auseinandersetzungen und die schönen Kindergeschichten,

Dirk Bühler, für manchen Spaß und dafür, dass einem nie der Gesprächsstoff ausging,

Marta Romano, für den Grundkurs in italienischer Lebensart,

Farah Badbanchi, für die hervorragende Einführung in die persische Küche,

Gabi Sowa, Brigitta Richter, Jana Köhler, Evelyn Stieger und Massimo Bossi für die exzellente technische Unterstützung und das „Amlaufenhalten“ des Laborbetriebs,

Christian Eggert, Martin Schäfer und Agata Smialowska für ihre Hilfe und die gute Atmosphäre in den letzten Monaten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei:

meinen Eltern und meiner Familie, für alle Hilfe und Unterstützung,

Jochen Streicher, für die Lösung aller Hard- und Softwareprobleme und das im nächsten Abschnitt gesagte,

meinen Freundinnen und Freunden in München, Heidelberg, Bonn, Sankt Augustin und sonstwo, für die vielen guten Gespräche und die vielen schönen Stunden der letzten Jahre, die mir immer wieder klarmachten, dass es wichtigere Dinge im Leben gibt als die Forschung.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.