

Pathogenese der Spinalen Muskelatrophie

Pathogenesis of Spinal Muscular Atrophy

Autor

P. Claus^{1,2}

Institute

¹ Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover
² Zentrum für Systemische Neurowissenschaften, Hannover

Schlüsselwörter

- Rho-Kinase
- Aktin
- Motoneuron
- Wachstumsfaktor

Key words

- Rho-Kinase
- actin
- motoneuron
- growth factor

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1316308>
 Online-Publikation: 20.7.2012
 Klin Neurophysiol 2012;
 43: 203–205
 © Georg Thieme Verlag KG
 Stuttgart · New York
 ISSN 1434-0275

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Peter Claus
 Institut für Neuroanatomie
 Medizinische Hochschule
 Hannover
 OE 4140
 Carl-Neuberg-Straße 1
 30625 Hannover
 claus.peter@mh-hannover.de

Zusammenfassung

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist in ihrer schwersten Ausprägung (Typ 1) eine letal verlaufende neurodegenerative Erkrankung bei Kindern. Sie stellt die häufigste genetisch-verursachte Todesursache bei diesen Patienten dar und tritt mit einer Häufigkeit von 1:5000 Geburten auf. Eine Therapiemöglichkeit existiert bisher nicht. Die SMA wird durch Mutation bzw. Deletion des survival of motoneuron 1 Gens (Smn1) hervorgerufen und führt zu einer Degeneration der Motoneurone im Rückenmark. Das SMN-Protein hat wahrscheinlich verschiedene Funktionen: Es dient als Plattform zur Bildung von prä-mRNA Splicing-Komplexen – dieser Splicing-Prozess erfolgt im Zellkern. Darüber hinaus spielt SMN auch eine Rolle in Axonen von Nervenzellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass SMN das Wachstum von Neuriten reguliert und eine Dysregulation des Aktin-Cytoskeletts bei der SMA vorliegt. Dabei wurde ein biochemischer Signalweg identifiziert, der für diese Fehlregulation verantwortlich ist. Es handelt sich dabei um den Rho-Kinase (ROCK) Signalweg – einem wichtigen Schalter für verschiedene neuronale Aktin-abhängige Motilitätsprozesse. Das Molekül ROCK ist dabei auch ein geeignetes Zielmolekül für eine pharmakologische Intervention.

Funktionen des Survival of Motoneuron (SMN)-Proteins

Die juvenile spinale Muskelatrophie (SMA; Typ I, II, III; Typ 0 ist embryonal letal) – eine autosomal-rezessive Erkrankung, bei der spinale Motoneurone und motorische Hirnnervenkerne degenerieren – ist mit der Deletion und mit Mutationen des Survival of Motoneurons Gens Smn1 assoziiert. Das Genom weist eine fast identische

Abstract

Spinal muscular atrophy (SMA) in its most severe form (type 1) is a lethal neurodegenerative disease in children. It represents the most frequent genetic cause of death in this patient group and has a prevalence of 1:5000 live births. As yet there are no options for therapy. SMA is caused by a mutation or, respectively, deletion of the survival motoneuron 1 gene (Smn1) and proceeds through degeneration of motor neurons in the spinal cord. The SMN protein presumably has various functions: it serves as a platform for the formation of pre-mRNA splicing complexes – this splicing process takes place in the cell nucleus. Furthermore, SMN also plays a role in the axons of nerve cells. Preliminary work in our group has demonstrated that SMN regulates the growth of neurites and that in SMA there is a dysregulation of the actin cytoskeleton. The biochemical signalling pathway responsible for this dysregulation has been identified. It involves the rho-kinase (ROCK) signalling pathway – an important switch for various neuronal, actin-dependent processes. The ROCK molecule is thus also a suitable target molecule for pharmacological interventions.

Kopie, das Smn2-Gen auf. Der Phänotyp der SMA korreliert mit der vorhandenen Menge des von diesem Gen synthetisierten SMN-Proteins [1,2]. Patienten mit Typ I SMA (Werdnig-Hofmann) zeigen bereits innerhalb der ersten 6 Lebensmonate Symptome und sterben meist im Alter unter 2 Jahren. Typ II und III (Kugelberg-Welander) SMA-Patienten zeigen einen mildereren Verlauf mit Symptomen, die zwischen einem Lebensalter von 6 Monaten und 17 Jahren einsetzen. SMA ist die

häufigste tödlich verlaufende autosomal-rezessive Erkrankung bei Kindern mit einer Inzidenz von 1 auf 6000 Neugeborenen. Das SMN Protein wird ubiquitär exprimiert, jedoch kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Degeneration spinaler Motoneurone. Jüngste Arbeiten zeigen jedoch auch eine Beteiligung anderer Organsysteme und anderer Bereich des ZNS. Die molekulare Pathogenese der Spinalen Muskelatrophie ist noch weitgehend ungeklärt. Weitere Informationen über die zellulären Funktionen des SMN-Proteins sind daher notwendig.

Gut untersucht ist eine biochemische Funktion von SMN als Assemblierungsfaktor für prä-messenger RNA-Splicing-Komplexe (small nuclear Ribonucleoprotein-Komplexe, snRNPs). Dabei setzt SMN diese Komplexe im Cytoplasma zusammen und wird mit diesen in den Zellkern transportiert. Dort diffundiert SMN aus den Komplexen und lokalisiert anschließend in endogenen Protein-Aggregaten, die als nuclear bodies bezeichnet werden [3,4]. Eine Reduktion der Anzahl solcher Strukturen (Cajal bodies und nuclear gems) spiegelt das Fehlen von SMN bei der Erkrankung wider. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Stabilität von SMN-haltigen nuclear bodies durch die Interaktion mit einem neurotrophen Wachstumsfaktor, dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2), negativ beeinflusst wird. Bereits seit langem war bekannt, dass FGF-2 nicht nur eine biologische Funktion als extrazelluläres Signalmolekül besitzt, sondern auch intrazellulär im Zellkern vorkommt. Die direkte Interaktion zwischen FGF-2 und SMN konnte als ein neuer Signalweg in mehreren Arbeiten beschrieben werden [5–9].

Im Verlauf der Pathogenese der Motoneurone kommt es zunächst zu einer axonalen Degeneration und wahrscheinlich erst sekundär zu Schädigungen des Zellkörpers [10,11]. Ein motorisches Neuron hat durch seine Größe besondere Leistungen zu erbringen: In der Entwicklung muss das Auswachsen der Axone zum weit entfernten Zielmuskel gesteuert werden. Darüber hinaus sind besondere Transportleistungen anterograd zum Wachstumskegel und retrograd zum Zellkörper erforderlich. Axonale Wachstumsdefekte sind demzufolge auch bei der Pathophysiologie der Spinalen Muskelatrophie von Bedeutung [10]: Wachstumskegel von SMA-Motoneuronen weisen eine geringere Größe auf [10,12]. In einer wichtigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Clustering von Kalzium-Kanälen (Cav2.2) spezifisch in Wachstumskegeln verändert ist [13]. Weitere Daten deuten darauf hin, dass SMN neben seiner Funktion als Splicing-Assemblierungsfaktor auch eine Rolle beim axonalen Transport bestimmter mRNAs spielen könnte [11,12,14,15]. So interagiert SMN mit hnRNP-Q/R-Proteinen [12,15], welche an beta-Aktin mRNA binden. Der Komplex wird möglicherweise im Axon transportiert, und es wird durch axonale Translation Aktin exprimiert. Andere Arbeiten zeigen eine ebenfalls einen Zusammenhang von SMN mit dem Aktin-Cytoskelett: Profilin 2 – ein Aktin bindendes Protein – wurde bereits vor einigen Jahren als Interaktionspartner beschrieben [16,17].

Alle diese Daten deuten sehr stark darauf hin, dass SMN neben einer Funktion als Splicing-Assemblierungsplattform noch eine wichtige Rolle in Axonen spielen könnte. Der Mechanismus der molekularen Steuerung einer Neuritogenese bzw. Axonogenese durch SMN war dabei bisher nicht bekannt. In den Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir einen regulatorischen Effekt auf das Aktin-Cytoskelett beschreiben [18,19]: Die Regulation der Aktin-Dynamik stellt einen Schlüsselmechanismus für das Auswachsen von Neuriten dar. Die Rho/Rho-Kinase (ROCK)-Kaskade nimmt dabei eine zentrale Rolle ein. Dies gilt nicht nur für die initialen Ereignisse beim Auswachsen von Neuriten, sondern

auch für die Dynamik von Wachstumskegeln und die Stabilisierung und Aufrechterhaltung von neuromuskulären Endplatten der Motoneurone.

Das Fehlen von SMN beeinflusst die Aktin-Dynamik

▼ Unsere Arbeitsgruppe hat die axonale Funktion des Survival of Motoneuron (SMN)-Proteins untersucht und eine neue Verbindung zum Aktin-Cytoskelett entdeckt [18,19]. Dazu wurde ein Zellkulturmodell (PC12-Zellen) gewählt, das die Analyse der neuronalen Differenzierung unter dem Einfluss von SMN ermöglichte. Zunächst wurde die Expression von SMN und verschiedener, bekannter Assoziationspartner untersucht. Dabei ließ sich ein Expressionsmuster beobachten, welches auf eine unabhängige Regulation von SMN im Vergleich zu snRNP-Proteinen hinweist. Daher haben wir den Effekt von SMN auf das Neuritenwachstum untersucht. Durch siRNA war es möglich, ein Zellkulturmodell für die Spinalen Muskelatrophie zu etablieren. Damit ließ sich zeigen, dass SMN einen positiv regulierenden Einfluss auf das Neuritenwachstum in einem Zell-autonomen Prozess ausübt. Das Fehlen von SMN führt zu kürzeren, eine Überexpression zu längeren Neuriten. Das unter knock-down Bedingungen zu beobachtende verkürzte Neuritenwachstum kann interessanterweise durch Co-Expression des C-Terminus des SMN-Proteins funktionell wiederhergestellt werden (rescue). Damit lassen sich Splicing-Assemblierung, an der eine zentrale Domäne von SMN beteiligt ist, und Regulation des Neuritenwachstums (C-Terminus) funktionell voneinander trennen. Diese und weitere Daten deuten darauf hin, dass SMN mehrere Funktionen ausüben kann. Das Aktin-Cytoskelett ist eine dynamische Struktur, die für verschiedene Motilitäts- und Wachstumsprozesse benötigt wird. Aktin kann entweder als Monomer (globuläres Aktin, G-Aktin) oder filamentös (F-Aktin) vorliegen. Wir haben in unserem SMA-Zellkulturmodell einen signifikant höheren Anteil des F-Aktins im Vergleich zum G-Aktin gefunden. Dieser biochemische Befund wird durch die Analyse von Wachstumskegeln auswachsender Motoneurone aus einem SMA-Mausmodell gestützt [20]. Auch diese wiesen einen signifikant erhöhten Anteil des F-Aktins auf.

Dysregulation des Rho-Kinase (ROCK) Signalwegs

▼ Über welchen Mechanismus greift SMN in das Neuritenwachstum ein? Hier haben wir deutliche Hinweise gefunden, dass die Regulation des Aktin-Cytosketts über die Rho-Kinase (ROCK) Kaskade eine wichtige Rolle spielt [20]. ROCK integriert stromaufwärts gelegene Signale von kleinen GTPasen und reguliert die Aktivität verschiedener Signalmoleküle. Verschiedene Zielproteine stromabwärts von ROCK zeigten im SMA-Zellkulturmodell keine Expressionsunterschiede, aber ein signifikant anderes Phosphorylierungs-Muster. Stromaufwärts von ROCK konnten in vorangegangenen Analysen keine Unterschiede auf der Ebene der kleinen GTPasen gefunden werden. Es lag daher die Vermutung nahe, dass ROCK eine molekulare Schaltstelle bildet und über eine SMN-Defizienz ein Effekt auf das Aktin-Cytoskelett ausgeübt wird. Als molekulare Brücke zwischen SMN und ROCK könnte dabei das Protein Profilin2a dienen. Dieses Protein war bereits als SMN-Interaktionspartner beschrieben worden, aber auch als ein direkter Bindungspartner von ROCK. Unsere Arbeitsgruppe hat in einem neuartigen zellulären

in vivo System nachgewiesen, dass Profilin2a tatsächlich mit SMN interagiert. Die Bindungsstelle auf dem SMN-Protein konnte durch Deletionsanalysen eingrenzt werden. Profilin2a bindet dabei an Prolin-Reste, sodass gezielte Mutagenesen mehrerer Prolin-Reste vorgenommen wurden. Das SMN-Protein weist im C-terminalen Bereich mehrere Poly-Prolin Sequenzen auf. Eine dieser Sequenzen konnte mit dem neuen Protein-Interaktionsassay als wichtig für die Profilin2a-Bindung bestimmt werden und damit der Poly-Prolin Region im SMN-Protein erstmals eine Funktion zugewiesen werden. Interessanterweise wurde in unmittelbarer Nähe eine Punktmutation eines Serin-Restes bei einer SMA-Patientin Typ II gefunden. Diese Punktmutation und weitere Punktmutationen des SMN-Proteins wurden generiert und im Protein-Interaktionsassay getestet. Dabei zeigte sich, dass nur bei Veränderung des Serin-Restes 230 in einen Leucin-Rest in der Nähe der Poly-Prolin-Sequenz eine Abnahme der Profilin-Bindung gefunden werden konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung der Befunde. Hinsichtlich der Verteilung der mutierten Proteine im Zellkern zeigten sich keine Unterschiede zum Wildtyp-Protein, wohl aber hinsichtlich der neuronalen Differenzierung: Die Serin-Mutante wies hier ein deutlich verringertes Neuritenwachstum auf, welches als morphologisches Kriterium für neuronale Differenzierung herangezogen wurde. Profilin ist selbst ein Substrat von ROCK und wird bei der SMA differentiell phosphoryliert. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass es in einem zellulären SMA-Modell zu einer Hyperphosphorylierung kommt. Wir konnten nun im Rückenmark von SMA-Mäusen diesen Effekt ebenfalls deutlich beobachten. Da kein anti-Phospho-Profilin-Antikörper verfügbar war, wurden diese Analysen in einem 2D-Gelsystem durchgeführt. Es ließ sich ebenfalls zeigen, dass die Phosphorylierung von Profilin das Neuritenwachstum beeinflusst. Dazu wurden Mutanten hergestellt und getestet, die eine konstitutive bzw. eine fehlende Phosphorylierung simulierten. Diese Befunde gestatten einen neuen Blick auf die molekulare Pathogenese der Spinalen Muskelatrophie und definieren ROCK als eine potentielle Zielstruktur für eine therapeutische Intervention [20].

Zur Person



Foto: J. Funk

Prof. Dr. **Peter Claus** Seit 1999 Leiter einer Arbeitsgruppe am Institut für Neuroanatomie (C. Grothe) der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Venia legendi für Anatomie 2005 mit einer Habilitationsschrift über zelluläre Lokalisation und Protein-Interaktionen des nukleären Fibroblasten-Wachstumsfaktors-2 (FGF-2).

Interessenkonflikt: Der Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- 1 Jablonka S, Rossell W, Schrank B *et al.* The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol* 2000; 247 (Suppl 1): 137–142
- 2 Jablonka S, Schrank B, Kralewski M *et al.* 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* 2000; 9 (3): 341–346
- 3 Terns MP, Terns RM. Macromolecular complexes: SMN – the master assembler. *Curr Biol* 2001; 11 (21): R862–R864
- 4 Meister G, Eggert C, Fischer U. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol* 2002; 12 (10): 472–478
- 5 Bruns AF, Grothe C, Claus P. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) is a novel substrate for arginine methylation by PRMT5. *Biol Chem* 2009; 390 (1): 59–65
- 6 Bruns AF, van Bergeijk J, Lorbeer C *et al.* Fibroblast growth factor-2 regulates the stability of nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106 (31): 12747–12752
- 7 Claus P, Bruns AF, Grothe C. Fibroblast growth factor-2(23) binds directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem J* 2004; 384 (Pt 3): 559–565
- 8 Claus P, Doring F, Gringel S *et al.* Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem* 2003; 278 (1): 479–485
- 9 Gringel S, van Bergeijk J, Haastert K *et al.* Nuclear fibroblast growth factor-2 interacts specifically with splicing factor SF3a66. *Biol Chem* 2004; 385 (12): 1203–1208
- 10 Jablonka S, Wiese S, Sendtner M. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* 2004; 58 (2): 272–286
- 11 Zhang HL, Pan F, Hong D *et al.* Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 2003; 23 (16): 6627–6637
- 12 Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C *et al.* Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 2003; 163 (4): 801–812
- 13 Jablonka S, Beck M, Lechner BD *et al.* Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 2007; 179 (1): 139–149
- 14 Zhang H, Xing L, Rossoll W *et al.* Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci* 2006; 26 (33): 8622–8632
- 15 Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM *et al.* 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* 2002; 11 (1): 93–105
- 16 Sharma A, Lambrechts A, Haole T *et al.* A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res* 2005; 309 (1): 185–197
- 17 Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M *et al.* *J Biol Chem* 1999; 274: 37908–37914
- 18 van Bergeijk J, Haastert K, Grothe C *et al.* Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67 (3): 244–247
- 19 van Bergeijk J, Rydel-Konecke K, Grothe C *et al.* The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus. *FASEB J* 2007; 21 (7): 1492–1502
- 20 Nölle A, Zeug A, Vanbergeijk J *et al.* The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet* 2011; 20 (24): 4865–4878