

Neurodegeneration

Gestörter Kerntransport und Phasentrennung von RNA-Bindeproteinen

SASKIA HUTTEN, DOROTHEE DORMANN

FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT MAINZ UND INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY (IMB) MAINZ

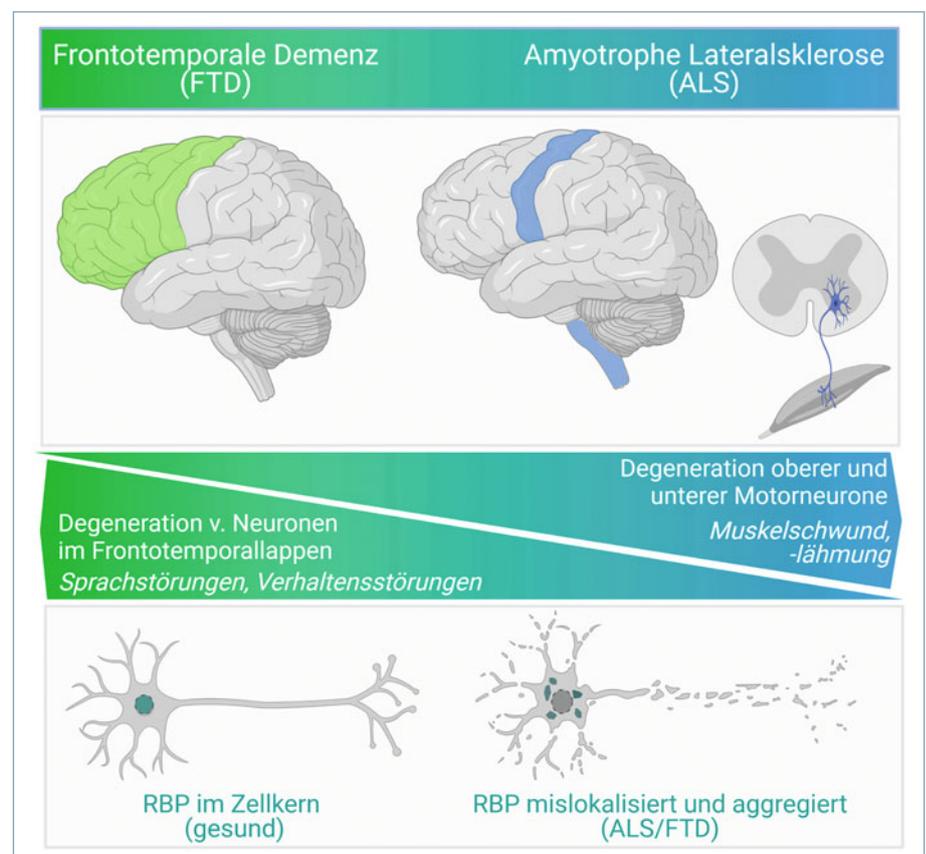
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are fatal neurodegenerative disorders, whose underlying molecular mechanisms are only beginning to emerge. A common molecular hallmark of both diseases is the relocalization of nuclear RNA-binding proteins (RBP) into cytoplasmic aggregates. Defects in nuclear import and aberrant phase separation appear to underlie RBP mislocalization and aggregation and could potentially be targeted in future therapies.

DOI: 10.1007/s12268-021-1599-z
© Die Autorinnen 2021

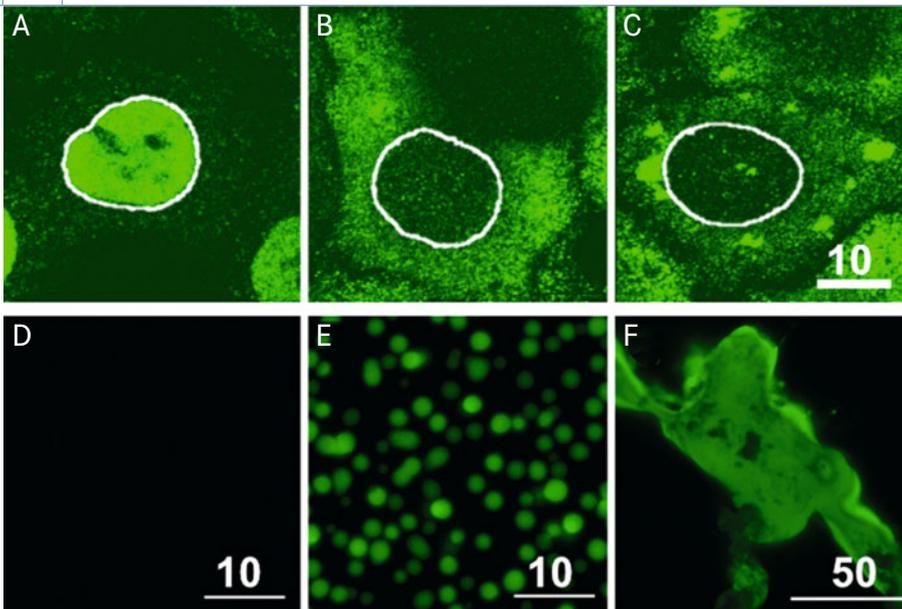
in den degenerierenden Gehirnregionen. Bei den meisten ALS- und FTD-Patienten handelt es sich hierbei um RNA-Bindeproteine (RBP), vor allem TDP-43 (*TAR DNA binding protein of 43 kDa*) und FUS (*fused in sarcoma*) [2]. TDP-43-Aggregate findet man in mehr als 95 Prozent aller ALS-Patienten und ca. 50 Prozent aller FTD-Patienten. FUS-Aggregate kommen in ca. zwei Prozent der ALS- und ca. zehn Prozent der FTD-Patienten vor. Beide RBP sind ubiquitär exprimiert, maßgeblich an RNA-Prozessierung beteiligt (u. a. mRNA-Splicing, RNA-Stabilität und -Transport) und fungieren außerdem bei der Reparatur von DNA-Schäden [3]. Sie liegen normalerweise überwiegend im Zellkern vor, in den betrof-

■ Frontotemporale Demenz (FTD) und amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sind tödliche, bislang unheilbare Krankheiten. Bei FTD, einer häufig noch vor dem 65. Lebensjahr auftretenden Demenz, degenerieren Neurone im Stirn- und Schläfenlappen des Gehirns, wodurch es zu einer fortschreitenden Veränderung der Persönlichkeit, des Sozialverhalten und der Sprachfähigkeit kommt (**Abb. 1**). Bei ALS sterben die für die willkürliche Steuerung der Muskulatur verantwortlichen Motoneurone, was zu einer zunehmenden Muskelschwäche und letztlich einer vollkommenen Lähmung der Skelettmuskulatur führt. ALS- und FTD-Patienten sterben in der Regel wenige Jahre nach der Diagnose.

ALS und FTD sind Ausprägungen eines fließenden Krankheitsspektrums (**Abb. 1**, [1]). Oft weisen FTD-Patienten milde ALS-Symptome auf, während viele ALS-Patienten kognitive Beeinträchtigungen zeigen, die auf eine frontotemporale Lobardegeneration hindeuten. Daher spricht man auch vom „ALS/FTD-Spektrum“. Beide Krankheiten überlappen sich nicht nur hinsichtlich ihres klinischen Bilds, sie haben auch gemeinsame genetische Ursachen und können die gleichen Proteinaggregate aufweisen (**Abb. 1**). Wie in allen neurodegenerativen Erkrankungen, findet man auch bei ALS- und FTD-Patienten charakteristische Proteinablagerungen



▲ **Abb. 1:** Das Krankheitspektrum FTD/ALS – Krankheitsbild und molekulare Ursache. FTD und ALS betreffen unterschiedliche Gehirnregionen (FTD: grün, ALS: blau), aber stellen ein kontinuierliches Krankheitspektrum mit überlappender Symptomatik dar (oben/Mitte). Sie weisen die gleichen cytoplasmatisch mislokalisierten und aggregierten RNA-Bindeproteine (RBP) auf (unten). Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.



▲ **Abb. 2:** Mislokalisierung und Phasentrennung von FUS in Zellen und *in vitro*. Oben: Zelluläre Expression von EGFP-FUS in HeLa-Zellen. **A**, FUS ist normalerweise im Zellkern lokalisiert. **B**, ALS-assoziierte Mutationen in der FUS-NLS führen zur cytoplasmatischen Mislokalisierung. **C**, FUS wird durch zusätzliche Stressstimuli in Stressgranula (SG) rekrutiert. Unten: *In vitro*-Experimente mit rekombinantem MBP-FUS-EGFP (7 μ M). **D**, Durch das MBP-Protein wird FUS-EGFP in Lösung gehalten. **E**, Nach Abspaltung des MBP bildet FUS-EGFP durch Phasentrennung tröpfchenartige Strukturen. **F**, Diese wandeln sich durch Alterungsprozesse in großflächige Aggregate um. Maßstabsbalken in μ m.

fenen Gehirnregionen von ALS- und FTD-Patienten findet man sie jedoch in cytoplasmatischen Aggregaten in Neuronen und Gliazellen (**Abb. 1**). Man geht davon aus, dass die mislokalisierten und aggregierten RBP einerseits ihre essenziellen Funktionen im Zellkern nicht mehr korrekt ausüben (*loss-of-function*), andererseits im Cytoplasma eine schädliche Wirkung entfalten (*gain-of-function*) und es so zur neuronalen Dysfunktion und Neurodegeneration kommt.

Gestörter Kernimport von RNA-Bindeproteinen als Krankheitsmechanismus

Die cytoplasmatische Ablagerung von TDP-43 und FUS in FTD- und ALS-Patienten wurde erstmals 2006 bzw. 2009 beschrieben [2] – seitdem wurde intensiv nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen gesucht. Eine wichtige Erkenntnis lieferten bei dieser Suche genetische Mutationen im *FUS*-Gen, die zu familiärer ALS führen und das Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) von FUS so verändern, dass der Kernimport von FUS gestört wird [4]. Dies führt zur Akkumulation des mutierten FUS-Proteins im Cytoplasma (**Abb. 2A, B**). Die Stärke des Kernimportdefekts korreliert mit dem klinischen Schweregrad, d. h. FUS-NLS-Mutationen mit besonders starkem Kernimportdefekt verursachen einen außergewöhnlich frühen Krankheitsbeginn und

schnellen Krankheitsverlauf. Mausmodelle mit FUS-NLS-Mutation entwickeln ebenfalls ALS-Phänotypen, was die Hypothese untermauert, dass gestörter Kernimport von FUS zur Degeneration von Motoneuronen führt. Inzwischen wurden auch in anderen Formen von ALS und FTD (ohne *FUS*-Mutation) Veränderungen und Störungen verschiedener Kerntransportfaktoren beschrieben [5], jedoch sind die molekularen Ursachen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen, oft noch nicht gut verstanden. Diese neuropathologischen Befunde deuten darauf hin, dass Störungen im Kerntransport ein allgemeiner Krankheitsmechanismus in ALS und FTD sein könnte, der zur cytoplasmatischen Mislokalisierung der krankheitstypischen RBP führt.

Stressgranula und abnormale Phasentrennung von RNA-Bindeproteinen

Wie aber kommt es zur Aggregation der cytoplasmatisch mislokalisierten RBP? Ein möglicher Weg scheint die Rekrutierung der RBP in Stressgranula (SG) zu sein. Diese membranlosen Organellen (MLO) bilden sich unter zellulärem Stress durch den Mechanismus der Phasentrennung (*liquid-liquid phase separation*) und enthalten zahlreiche RBP sowie mRNAs. FUS liegt normalerweise überwiegend im Zellkern vor und wird daher unter Stress nicht oder nur wenig in SG rekrutiert;

cytoplasmatisch mislokalisiertes FUS dagegen reichert sich unter zellulärem Stress massiv in SG an (**Abb. 2C**, [4]). Interessanterweise enthalten pathologische FUS- und TDP-43-Aggregate in ALS/FTD-Patienten auch typische SG-Markerproteine, was darauf hindeutet, dass diese Aggregate sich aus SG entwickelt haben könnten [4, 6].

In vitro-Rekonstitutionsexperimente haben gezeigt, dass viele RBP, u. a. FUS und TDP-43, bei physiologischen Konzentrationen eine Phasentrennung durchlaufen und tröpfchenartige Kondensate bilden (**Abb. 2D, E**, [7]). Diese können sich durch Alterungsprozesse, Mutationen, veränderte posttranslationale Modifikationen (PTM) oder erhöhte Proteinkonzentration verfestigen (*liquid-to-solid transition*) und fibrilläre oder amorphe unlösliche Aggregate bilden (**Abb. 2F**). Es wird vermutet, dass solche abnormalen Phasenübergänge in SG oder anderen MLO mit hoher RBP-Konzentration ablaufen und es so zur Bildung pathologischer RBP-Aggregate kommt. Dadurch wird vermutlich die Dynamik und physiologische Funktion der RBP sowie der MLO gestört und es kommt zur Funktionsstörung und Degeneration der betroffenen Zellen.

Kernimportrezeptoren und posttranslationale Modifikationen regulieren RBP-Lokalisierung und -Löslichkeit

Wie oben beschrieben, sind effizienter Kernimport von FUS und TDP-43 sowie eine genaue Kontrolle der RBP-Phasentrennung essenziell für die Funktion und das Überleben bestimmter Nervenzellen. Zwei wichtige Regulatoren, die sowohl Kernimport als auch Phasentrennung der beiden RBP kontrollieren, sind Kernimportrezeptoren (auch Importine oder Karyopherine genannt) und PTM (**Abb. 3**). Importine binden RBP über deren NLS und transportieren sie durch die Kernporen in den Zellkern. Die Importin-Bindung im Cytoplasma hält die aggregationsfreudigen RBP außerdem in Lösung und verringert ihre Phasentrennung und Akkumulation in SG oder anderen MLO [8, 9]. Auch verschiedene PTM, wie Arginin-Methylierung oder Phosphorylierung, können die Phasentrennung und MLO-Akkumulation der beiden RBP effizient reduzieren [9, 10].

In ALS- und FTD-Patienten können sowohl die Bindung von RBP an Importine als auch die Kontrolle durch PTM gestört sein (**Abb. 3**): Mutationen in der FUS-NLS stören die Bindung von FUS an sein Importin und

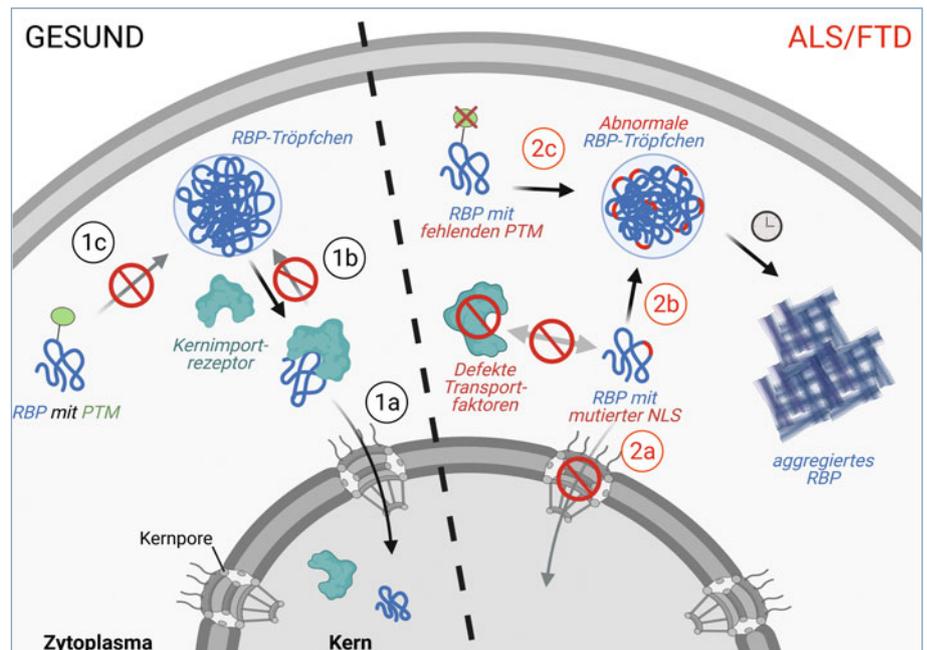
führen so zu Importdefekten und abnormaler Phasentrennung des mutierten FUS-Proteins [9]. Ebenso sind Importine und weitere Kerntransportfaktoren pathologisch verändert [5], was zu ähnlichen RBP-Störungen führen könnte. Das Fehlen bestimmter PTM (z. B. Argininmethylierung von FUS oder Phosphorylierung von TDP-43), das in FTD/ALS-Patienten auftritt [10], könnte ebenfalls die RBP-Phasentrennung verändern und so zu pathologischen Veränderungen auf Ebene der RBP und MLO beitragen.

Ausblick: Mögliche Therapieansätze zur Behandlung der ALS und FTD

Ein genaues Verständnis der molekularen Pathomechanismen, die ALS und FTD zugrunde liegen, ist unabdingbar für neue Therapieansätze zur Behandlung dieser fatalen Erkrankungen. Die Mislokalisierung und abnormale Phasentrennung der krankheitsassoziierten RBP abzumildern oder gänzlich zu verhindern, sind wünschenswerte Ziele, die an den Wurzeln beider Krankheiten ansetzen würden. Chemische Wirkstoffe, die eine abnormale Phasentrennung und RBP-Verfestigung verringern oder verhindern (etwa durch Modulation essenzieller PTM), könnten in neue Therapien einfließen. Die Bindung von Importinen an die betroffenen RBP zu verbessern, ist ein weiterer vielversprechender Behandlungsansatz, der gleich an zwei wichtigen Pathomechanismen, dem gestörten Kernimport und der abnormalen Phasentrennung, ansetzen würde [8]. Es bleibt zu hoffen, dass die Erkenntnisse aus der molekularen ALS/FTD-Forschung zukünftig zu neuen Behandlungsmöglichkeiten führen werden.

Literatur

- [1] van Langenhove T, van der Zee J, van Broeckhoven C (2012) The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann Med* 44: 817–828
- [2] Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9: 995–1007
- [3] Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79:416–438
- [4] Dormann D, Rodde R, Edbauer D et al. (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* 29:2841–2857
- [5] Hutten S, Dormann D (2020) Nucleocytoplasmic transport defects in neurodegeneration – Cause or consequence? *Semin Cell Dev Biol* 99: 151–162
- [6] Bentmann E, Haass C, Dormann D (2013) Stress granules in neurodegeneration—lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J* 280: 4348–4370
- [7] Alberti S, Hyman AA (2016) Are aberrant phase transitions a driver of cellular aging? *Bioessays* 38: 959–968
- [8] Guo L, Fare CM, Shorter J (2019) Therapeutic dissolution of aberrant phases by nuclear-import receptors. *Trends Cell Biol* 29: 308–322



▲ **Abb. 3:** Kontrolle von RBP durch Kernimportrezeptoren und posttranslationale Modifikationen (PTM) und Störungen dieser Kontrollmechanismen in ALS/FTD. In gesunden Zellen binden Kernimportrezeptoren an das RBP, importieren es in den Zellkern (1a) und unterdrücken seine Phasentrennung und die Bildung von RBP-Tröpfchen (1b). Bestimmte posttranslationale Modifikationen (PTM) am RBP unterdrücken ebenfalls die RBP-Tröpfchenbildung (1c). In ALS und FTD können Mutationen im Kernlokalisierungssignal (NLS) des RBP oder defekte Kerntransportfaktoren zu reduziertem Kernimport des RBP führen (2a) sowie die Bildung von RBP-Tröpfchen begünstigen (2b). Fehlende PTM können ebenfalls die RBP-Phasentrennung begünstigen (2c). RBP-Tröpfchen können sich mit der Zeit in feste RBP-Aggregate verwandeln. Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

[9] Hofweber M, Hutten S, Bourgeois B et al. (2018) Phase separation of FUS is suppressed by its nuclear import receptor and arginine methylation. *Cell* 173: 706–719

[10] Hofweber M, Dormann D (2019) Friend or foe-post-translational modifications as regulators of phase separation and RNP granule dynamics. *J Biol Chem* 294:7137–7150

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der

genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dorothee Dormann
Biozentrum
Johannes Gutenberg-Universität (JGU) Mainz
Hanns-Dieter Hüscher-Weg 15
D-55 128 Mainz
ddormann@uni-mainz.de

AUTORINNEN



Saskia Hutten

1998–2003 Studium der Biologie an der Universität Heidelberg. 2007 Promotion bei Prof. Dr. R. Kehlenbach an der Universität Göttingen. 2008–2013 Postdoktorandin bei Prof. Dr. A. Lamond, Universität Dundee, Schottland. Ab 2014 Postdoktorandin an der LMU München. Seit 2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Dormann an der LMU München bzw. seit April 2021 an der Universität Mainz.



Dorothee Dormann

1996–2002 Studium der Biochemie an der Universität Tübingen, Diplomarbeit und Promotion (PhD) an der Rockefeller University New York, USA. 2007–2013 Postdoktorandin, LMU München. 2014–2021 Emmy-Noether-Gruppenleiterin am Biomedizinischen Zentrum, LMU München. Seit April 2021 Heisenberg-Professorin im Fachbereich Biologie der Universität Mainz und Adjunct Director am Institut für Molekulare Biologie (IMB), Mainz.