

Martin Köhrmann  
Dr. med.

## Die Rolle des Staufens Proteins beim RNA-Transport in Hippocampus Neuronen

Geboren am 23.10.1974 in Heidelberg  
Reifeprüfung am 17.6.1994 in Heidelberg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2002/2003  
Physikum am 23.3.1998 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in New York (USA), Durham (USA) und in Heidelberg  
Staatsexamen am 21.5.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie  
Doktorvater: Prof. Dr. F. Wieland

Eine große Herausforderung in den Neurowissenschaften ist die Erforschung des Zusammenspiels einzelner Nervenzellen, aus dem so komplexe kognitive Funktionen wie z.B. das Lernen oder das Gedächtnis hervorgehen. Hier geht man heute davon aus, dass gezielte morphologische und molekulare Veränderungen an einzelnen Synapsen auftreten. Ein Meilenstein in der Gedächtnisforschung war daher die Entdeckung, dass die Effizienz der synaptischen Übertragung reguliert werden kann und von der Synthese neuer Proteine abhängig ist. Diese Neusynthese ist offenbar nicht nur auf den Zellkörper der Nervenzelle beschränkt, sondern kann auch direkt an einzelnen Synapsen unabhängig voneinander vonstatten gehen. Daher kommt dem dendritischen mRNA Transport, sowie die anschließende lokale Translation bestimmter Transkripte an der Synapse eine zentrale Bedeutung für die Funktion der Nervenzellen zu. Der diesem Transport zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt.

Ein erster Kandidat für ein bei diesem Transport beteiligtes Protein ist das vor kurzem identifizierte Doppelstrang-RNA-Bindeprotein Staufen. In der Entwicklung der Fliege ist Staufen für die Ausbildung der embryonalen Achsen essentiell. Es transportiert dabei sowohl *oskar* RNA an den hinteren als auch in einem späteren Schritt *bicoid* RNA an den vorderen Pol der sich entwickelnden Eizelle. In der Folge wurden von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Säugetier-Homologe von Staufen identifiziert und in verschiedenen Zelltypen näher charakterisiert. In hippocampalen Neuronen der Ratte in Zellkultur wird das Säugetier-Staufen als 65 kDa großes Protein bereits in sehr frühen Entwicklungsstadien exprimiert. In ausgereiften Neuronen liegt Staufen in Partikeln vor, welche im Zellkörper und in den Dendriten der Zellen vorkommen. Zu diesem Zeitpunkt werden auch eine Reihe von mRNAs selektiv in die Dendriten dieser Zellen transportiert. Diese Partikel koloalisieren mit einem Marker für das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) und enthalten RNA, wie durch Doppelfärbungen mit dem RNA-spezifischen Farbstoff SYTO14 gezeigt werden konnte.

Um die Dynamik der Staufen enthaltenden Partikel in lebenden hippocampalen Neuronen zu studieren, galt es, ein Fusionsprotein bestehende aus humanem Staufen und dem Grün-fluoreszierenden Protein (hStaufen-GFP) in adulte hippocampale Neuronen transient zu transfizieren und den Transport der Staufen-Partikel per Video-Mikroskopie in lebenden Neuronen zu verfolgen. Dazu bedurfte es einer neuen, einfachen und effizienten Transfektions-Methode. Dieses auf der bekannten  $Ca^{2+}$ -Phosphat Methode basierende Transfektionsprotokoll wurde von mir selbst auf polarisierte Nervenzellen adaptiert.

In transient transfizierten Neuronen findet man Staufen-GFP – wie auch das endogene Staufen – in RNA-enthaltenden Partikeln im Zellkörper sowie in den Dendriten der Zellen. Die Partikel bewegten sich mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 6.4  $\mu\text{m}/\text{min}$  in die Dendriten. Der beobachtete Transport erfolgt jedoch nicht kontinuierlich, sondern sprunghaft. Die gemessenen Werte sind um Größenordnungen langsamer als bekannte vesikuläre Transportgeschwindigkeiten, wie z.B. schneller axonaler Transport von rund 280  $\mu\text{m}/\text{min}$ , oder dendritischer vesikulärer Transport von rund 120  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Vergleicht man die beobachtete Geschwindigkeit jedoch mit Untersuchungen von RNA-Transport in Oligodendrozyten oder kortikalen Neuronen, so ergibt sich eine auffallend gute Übereinstimmung. Diese Experimente deuten auf eine Beteiligung eines (bisher unbekanntes) Kinesins hin, dass die beobachteten Staufen-Partikel entlang von Mikrotubuli transportieren könnte. Mittlerweile untermauern zahlreiche experimentelle Hinweise diese neue Hypothese. Erstens enthalten alle Säugetier-Staufen Homologe eine mögliche konservierte Mikrotubuli-Bindestelle, die zu der Tubulin-Bindedomäne des Mikrotubuli assoziierten Proteins 1B (MAP1B) homolog ist. Zweitens fand man in immunoelektronenmikroskopischen Aufnahmen Staufen stets in der Nähe von Mikrotubuli in Dendriten hippocampaler Neuronen. Drittens konnte ich mit dem oben beschriebenen Transfektionssystem zeigen, dass sowohl die Rekrutierung von Staufen in die RNA-enthaltenden Partikel wie auch den anschließende Transport der Staufen-GFP Partikel in die Dendriten unterbleiben, wenn das Mikrotubuli-Netzwerk vorher pharmakologisch depolymerisiert wurde.

Zusammenfassend deuten all die von mir erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei Staufen tatsächlich um die erste Komponente der dendritischen RNA-Transportmaschinerie handelt. Staufen bindet die bisher ausnahmslos unbekanntes Ziel-mRNAs, und assembliert diese in RNA-enthaltende Partikel, welche entlang von Mikrotubuli in die Dendriten von hippocampalen Neuronen transportiert werden. Weitere Studien sind notwendig, um sowohl die von Staufen erkannten mRNAs wie auch die weiteren Bestandteile der beobachteten Ribonukleopartikel zu identifizieren.