EVELYN VOLLMEISTER, ELISABETH STRATMANN und
MICHAEL FELDBRÜGGE

Langstreckentransport im Mikroorganismus *Ustilago maydis*

Eukaryotische Mikroorganismen haben die Fähigkeit, definierte Entwicklungsprogramme zu steuern. So können beispielsweise pathogene Pilze ihre Morphologie während der Infektion drastisch verändern. Solche Differenzierungsprozesse sind meist essentiell für die Pathogenität und folglich intensiv untersucht. Am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität erforschen wir das Maispathogen *Ustilago maydis*, das in Zukunft auch als System für biotechnologische Fragestellungen dienen soll. Eines unserer Spezialgebiete ist der Langstreckentransport von mRNA-Molekülen in infektiösen Filamenten. Die erzielten Ergebnisse liefern neue Einblicke in zelluläre Transportprozesse und in den Infektionsverlauf. Ähnliche Transportprozesse finden auch in der Embryonalentwicklung beziehungsweise in Säugetier-Neuronen statt. Deshalb dient *U. maydis* – wie viele Mikroorganismen – auch als Modellsystem für komplexere zelluläre Vorgänge höherer Eukaryoten.

Der Modellorganismus *Ustilago maydis*

Ustilago maydis, der Verursacher des Maisbeulenbrands, ist ein biotropher Pflanzenparasit, der mit Ständerpilzen verwandt ist. Für das Auge sichtbar wird dieser einzellige Organismus im Zustand der Sporenreife auf seiner Wirtspflanze. Pflanzliches Gewebe bildet Tumore, die bis zum Platzen mit Sporen gefüllt sind. Die schwarze Farbe der aufbrechenden Sporenlager verleihen den infizierten Pflanzen ein verbranntes Aussehen und den Brandpilzen ihren Namen (Abb. 1A). In Jahren starker Witterungswechsel kann es vermehrt zum Befall von Maispflanzen kommen, wodurch der Landwirtschaft erhebliche Ertragseinbußen entstehen. Größere Verluste werden jedoch durch die Einkreuzung verschiedener Resistenzen in Mais vermieden.¹

In Mexiko gelten befallene Maiskolben gar als Delikatesse. Sie werden als Maistrüffel bezeichnet und von der Nahrungsmittelindustrie auch in Form von Konserven auf den Markt gebracht (Abb. 1B). In vielen Orten Mexikos findet man *U. maydis* als „Huitlacoche“ oder auch „Cuitlacoche“ auf den Speisekarten, beispielsweise als „Quesadillas Cuitlacoche“ (Abb. 1C, D). Die Bedeutung des Namens lässt auf dessen Aussehen schließen und ist damit auf den ersten Blick keine Köstlichkeit: Der Name „Cuitlacoche“ ist aztekischen Ursprungs und bedeutet so viel wie „der schlafende/schlummernde Kot“. Geschmacklich unterscheidet es sich aber erheblich vom Aussehen (Abb. 1D).

U. maydis besitzt ein sehr enges Wirtsspektrum. Das heißt, der Pilz infiziert ausschließlich Mais (*Zea mays* ssp. *mays*) und dessen Urform Teosinte (*Zea mays* ssp.

¹ Vgl. Banuett (1992).

Abb. 1: *Ustilago maydis*. (A) Infizierter Mais in einem Feld bei Marburg, 2009 (Foto: Rolf Rösser). Typische Symptome der Infektion sind Wucherungen des Pflanzengewebes, sogenannte tumorartige Brandgallen, in denen schwarze Teliosporen heranreifen. (B) Konserve gefüllt mit infizierten Maiskolben. In Mexiko und Umgebung gilt dieses infizierte Material als Delikatesse und wird deshalb auch als Maistrüffel (roter Pfeil) bezeichnet. (C) Speisekarte des Straßenrestaurants „Bazaar Sábado“ in Mexiko City. Der rote Pfeil weist auf die „Quesadillas Cuitlacoche“ hin. (D) Die Hand von Michael Feldbrügge hält einen solchen Quesadilla, der im Anschluss mit Genuss verzehrt wurde (Mexiko City, 2009).

parviglumis). Generell kann der Lebenszyklus von *U. maydis* in zwei Phasen gegliedert werden, eine saprophytische und eine parasitische Phase (Abb. 2). Die erste Phase umfasst das Auskeimen der Teliosporen und die Bildung apathogener, haploider (einkerniger) Sporidien, welche sich durch die Zersetzung toter organischer Stoffe ernähren und sich durch Knospung asexuell vermehren. Beim Übergang in die parasitische Phase erfolgt die Paarung zweier kompatibler Sporidien. Es kommt zu einer drastischen Veränderung der Morphologie, da die fusionierten Zellen als langgestrecktes dikaryotisches (zweikerniges) Filament auswachsen, sogenannte Hyphen. In dieser Phase ist der Pilz infektiös für die Maispflanze. Dazu penetrieren die infektiösen Hyphen nach Ausbildung einer speziellen Infektionsstruktur, dem Appressorium, die Pflanzenoberfläche. Diese verzweigen sich innerhalb des Pflanzengewebes, was zu ersten Symptomen führt, wie beispielsweise zur Anthozyan- oder Chlorosebildung an den Blättern. Im weiteren Verlauf der Infektion entstehen die Pflanzentumore, in denen schwarze Teliosporen heranreifen, welche wieder haploide Sporidien hervorbringen (Abb. 2).²

Der Lebenszyklus unterliegt einer komplizierten Kontrolle und ist ohne die Wirtspflanze nicht möglich.³ So kann die Verschmelzung zweier haploider Sporidien nur dann ablaufen, wenn sich die Sporidien in ihrem *a*- sowie in ihrem *b*-Paarungstyplocus unterscheiden. Der *a*-Paarungstyplocus kodiert für ein Pheromon sowie einen Pheromonrezeptor.⁴ Erkennen Sporidien das Pheromon des kompatiblen Partners bilden sie Konjugationshyphen aus, die aufeinander zuwachsen und an ihren Spitzen verschmelzen (Abb. 2). Unterscheiden sich die beiden Partner ebenfalls in ihren *b*-Loci, bildet sich das dikaryotische Filament aus. Der *b*-Locus kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der nur als Heterodimer aktiv ist. Das heißt, zwei verschiedene Untereinheiten müssen von den unterschiedlichen Paarungspartnern zur Verfügung gestellt werden. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass der Transkriptionsfaktor das zugrunde liegende Genexpressionsprogramm ausschließlich anschaltet, nachdem die Zellen fusioniert sind.⁵ Im Rahmen dieses transkriptionellen Programms werden circa 350 Gene reguliert. Darunter sind eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die wiederum zu späteren Zeitpunkten weitere Regulationsprozesse durchführen. Es kommt also zu einer Kaskade der Transkriptionsregulation.

In den letzten Jahren entwickelte sich *U. maydis* mehr und mehr zu einem Modellorganismus für verschiedenste zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel Rekombination, Pathogenität, Signaltransduktion oder zellulärer Transport. Am bekanntesten sind die wegweisenden Studien zur Aufklärung der homologen Rekombination, die durch Robin Holliday um 1974 erforscht wurden.⁶ Ihm zu Ehren wurde die bei der homologen Rekombination entstehende Kreuzstruktur zur Entstehung neuen genetischen Materials als Holliday-Struktur benannt. Schon damals wurde erkannt, dass sich *U. maydis* aufgrund seiner kurzen Generationszeit, der Kultivierbarkeit im Labor und dank der homologen Rekombination einfachen genetischen Manipulation als Modellorganismus eignet. Durch ausgereifte molekularbiologische Methoden können Gene deletiert oder

² Vgl. Brefort *et al.* (2009).

³ Vgl. Feldbrügge *et al.* (2004).

⁴ Vgl. Bölker *et al.* (1992).

⁵ Vgl. Kämper *et al.* (1995).

⁶ Vgl. Holliday (2004).

Abb. 2: Der pflanzenabhängige Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte. Phasen, die nicht ohne die Anwesenheit der Wirtspflanze Mais ablaufen, sind grün hinterlegt. Haploide Sporidien, die sich durch Knospung vermehren, fusionieren über Konjugationshyphen zu einem filamentös wachsenden Dikaryon. Dieses dringt über eine spezielle Infektionsstruktur, das Appressorium, in die Pflanze ein und bildet ein multizelluläres Myzel, welches die Entwicklung von Pflanzentumoren auslöst, in denen schwarze Teliosporen heranreifen. Nach der Reifung platzen die Tumore auf, und nach dem Auskeimen der freigesetzten Sporen bilden sich wieder einzellige Sporidien; der Kreis schließt sich. Kerne unterschiedlicher Paarungstypen sind blau beziehungsweise rot markiert (modifizierte Version der Abbildung aus *Current Opinion in Microbiology*, 2004).

gezielt verändert werden. Beispiele hierfür sind unter anderem die Expression von Fusionsproteinen mit dem grün fluoreszierenden Protein (Gfp) aus Quallen oder dem rot fluoreszierenden Protein (Rfp) aus Korallen. Darüber hinaus sind eine Reihe von Resistenz- und Auxotrophiemarkern etabliert, durch die mehrere Veränderungen gleichzeitig durchgeführt werden können (siehe beispielsweise Abb. 4C).⁷ Auf dem Gebiet der Zellbiologie ermöglichen verschiedene Färbemethoden den Nachweis bestimmter Zellorganellen. Eine der wichtigsten Errungenschaften ist jedoch die Sequenzierung des Genoms von *U. maydis*, welches 20,5 Megabasenpaare umfasst.⁸ In einer *Tour de Force* wurde es manuell annotiert und im Rahmen einer benutzerfreundlichen Datenbank zur Verfügung gestellt.⁹ Derzeit sind 6.786 proteinkodierende Gene bekannt.

mRNA-Transport in Mikroorganismen

Der Fluss der Erbinformation beginnt in der eukaryotischen Zelle mit der RNA-Synthese im Zellkern. Die prä-mRNA wird prozessiert und als reife mRNA („messenger“ RNA) in das Zytoplasma exportiert, wo sie zu einem Protein translatiert wird. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass mRNAs nicht einfach im Zytoplasma abgeladen, sondern häufig innerhalb der Zelle an spezifischen Stellen platziert werden.¹⁰ Dies dient der lo-

⁷ Vgl. Brachmann *et al.* (2004).

⁸ Vgl. Kämper *et al.* (2006).

⁹ Vgl. <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/> (18.11.2010).

¹⁰ Vgl. Martin und Ephrussi (2009).

kalen Translation der kodierten Proteine, die damit dort entstehen, wo sie gebraucht werden. Darüber hinaus wird die Lokalisation von Proteinen an falschen Orten vermieden, an denen sie erheblichen Schaden anrichten könnten. Bei der Embryonalentwicklung der Taufliege wurde zum Beispiel entdeckt, dass circa 70 Prozent aller mRNAs ein spezifisches Lokalisationsmuster aufweisen.¹¹ Somit sind mRNA-Lokalisation und lokale Translation keine seltenen Ereignisse, sondern vermutlich weitverbreitete Phänomene. Der mit Abstand häufigste Mechanismus der mRNA-Lokalisation ist der aktive Transport entlang von Aktinfilamenten und Mikrotubuli, die der Zelle als mechanische Stabilisatoren dienen. Diese werden für den Kurz- beziehungsweise Langstreckentransport benötigt. Dafür sind molekulare Motoren notwendig, die unter Energieverbrauch und mithilfe von Adaptoren sowie RNA-bindenden Proteinen die mRNAs in Form von großen Ribonukleoprotein-Komplexen transportieren, sogenannten mRNPs. RNA-bindende Proteine, die sequenzspezifisch RNA binden, spielen dabei eine entscheidende Rolle. Sie erkennen Lokalisations-Elemente in den Transkripten und bestimmen somit, welche mRNAs vermehrt transportiert werden sollen. Um zu verdeutlichen, dass mRNA-Lokalisation gekoppelt mit lokaler Translation ein aktiver Prozess ist, wird der Begriff „lokalisierte Translation“ verwendet.¹²

Ein gut untersuchtes Beispiel für das zelluläre Programm der lokalisierten Translation ist der Paarungstypwechsel in der Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Hier gibt es zwei Paarungstypen, a und α (vergleichbar mit männlich und weiblich). Bei der Vermehrung bildet die Mutterzelle eine Tochterzelle in Form einer Knospe, die sich letztlich durch das Ausbilden eines Septums abschnürt. Mutterzellen können ihren Paarungstyp wechseln, Tochterzellen hingegen nicht. Das heißt, obwohl erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Zellteilung das gemeinsam genutzte Zytoplasma getrennt wird, in dem zum Beispiel gemeinsame Transkriptionsfaktoren vorliegen, gibt es Genexpressionsprogramme, die sich in Mutter- und Tochterzellen unterscheiden. Wie wird dieser asymmetrische Prozess vermittelt? Die Lösung liegt in der lokalisierten Translation der *ASH1*-mRNA, die den Schlüsseltranskriptionsfaktor kodiert (Abb. 3A, oben links).

Über einen aktiven Transportmechanismus wird die *ASH1*-mRNA von der Mutterzelle in die Knospe der Tochterzelle über Aktinfilamente transportiert. Am distalen Pol wird die mRNA translatiert, so dass das Protein zuerst auf den Zellkern der Tochter trifft. Ist der mRNA-Transport gestört, weil beispielsweise wichtige RNA-bindende Proteine fehlen, wird die mRNA an falschen Stellen translatiert. Auf diese Weise gelangt der Transkriptionsfaktor in den Zellkern der Mutter- und der Tochterzelle. Die Asymmetrie ist verloren gegangen und beide Zellen unterdrücken den Paarungstypwechsel mit gleicher Rate (Abb. 3A, oben rechts).¹³

Intensive Forschung in der Folgezeit hat einiges über die zellulären Mechanismen aufgedeckt und zu folgender Modellvorstellung geführt: Die zu transportierende mRNA enthält vier Sequenzelemente, die eine definierte Sekundärstruktur eingehen und in der Lage sind, eine Tochterzell-Lokalisation der mRNA zu vermitteln. Diese Elemente werden von dem neuartigen RNA-bindenden Protein (She2p) erkannt. Der resultierende mRNP-Komplex wird über ein Adaptorprotein (She3p) an den molekularen Motor

¹¹ Vgl. Lécuyer *et al.* (2007).

¹² Vgl. St Johnston (2005).

¹³ Vgl. Jansen (2001).

Abb. 3: Aktinabhängiger mRNA-Transport in Pilzen. (A) Schematische Darstellung des mRNA-Transports während der Zellteilung in *S. cerevisiae*. (Oben) mRNA-Transport fördert die asymmetrische Verteilung des kodierten Proteins Ash1p. *ASH1*-mRNA (rote Wellenlinie) wird entlang von Aktinfilamenten (schwarzer Balken) von der Mutter- zur Tochterzelle transportiert. Aktiver Transport wird über die SHE-Maschinerie vermittelt (dunkelroter Kreis), bestehend aus dem RNA-bindenden Protein She2p, dem potentiellen Adaptor She3p und dem Myosinmotor Myo4p. Nach der Translation am distalen Pol der Tochterzelle akkumuliert der Transkriptionsfaktor hauptsächlich im Kern der Tochterzelle. Der Verlust von She2p (*she2Δ*; oben rechts) verursacht die Fehllokalisation der mRNA sowie des Proteins. (Unten) mRNA-Transport ist wichtig für die symmetrische Verteilung von kodierten Proteinen. *IST2*-mRNA wird von der gleichen Maschinerie zur Tochterzelle transportiert. Das Translationsprodukt lokalisiert in der Zellmembran. Ohne mRNA-Transport (*she2Δ*; unten rechts) wird Ist2p hauptsächlich in die Membran der Mutterzelle eingebaut. (B) mRNA-Transport in Filamenten von *Candida albicans*. (Oben) *ASH1*-mRNA wird höchstwahrscheinlich von einer verwandten SHE-Maschinerie zur Hyphenspitze transportiert. Dadurch akkumuliert Ash1p hauptsächlich im vordersten Kern des Filaments (Abbildung aus *Eukaryotic Cell*, 2010).

angehängt. Dieser Motor transportiert die molekulare Fracht entlang des Aktinzytoskeletts an den distalen Pol der Tochterzelle. Während des Transports wird die Translation durch ein weiteres RNA-bindendes Protein inhibiert. Am Bestimmungsort wird dieses durch eine membranständige Kinase phosphoryliert, wodurch sich die Affinität zur mRNA ändert. Die RNA-Bindung und folgende Translationsinhibition wird somit aufgehoben und die mRNA wird vor Ort translatiert (Abb. 3A, oben links).¹⁴

Neben der *ASH1*mRNA werden noch circa 20 weitere mRNAs transportiert. Bei Untersuchungen einer dieser mRNAs wurde gezeigt, dass ohne den Transport dieser mRNA in die Tochterzelle, eine symmetrische Verteilung des kodierten Proteins in Mutter- und Tochterzelle gewährleistet wird. Folglich dient lokalisierte Translation sowohl der asymmetrischen als auch der symmetrischen Verteilung von Proteinen (siehe unten).

Neueste Studien zeigten, dass dieser aktinabhängige Transport auch in Filamenten des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* abläuft.¹⁵ Somit sind mRNA-Transportprozesse vermutlich für das filamentöse Wachstum von Pilzen wichtig. Die *ASH1*-mRNA von *C. albicans* wird aktiv zur Hyphenspitze transportiert und dort translatiert. Auf diese Weise akkumuliert das Ash1p-Protein in dem vordersten Zellkern, welcher der Wachstumszone am nächsten liegt. Dies spricht dafür, dass in diesem Zellkern andere Genexpressionsprogramme ablaufen als in den restlichen Kernen (Abb. 3B). Ein vergleichbares Lokalisationsmuster von Transkriptionsfaktoren wurde kürzlich auch in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* beschrieben.

Langstreckentransport in filamentösen Pilzen

Die Etablierung und Aufrechterhaltung einer definierten Polaritätsachse bestimmt Wachstum und Form von filamentösen Pilzen. Hyphen expandieren am apikalen Pol und werden durch Septen unterteilt, die als molekulare Barrieren dienen.¹⁶ Hyphales Spitzenwachstum wird durch lokale Sekretion über Vesikel vermittelt. Der Langstreckentransport von Vesikeln, die vermutlich molekulare Bausteine für die Membran- und Zellwandsynthese enthalten, versorgt die Wachstumszone mit Zellwandmaterial.

Aktiver Transport durch molekulare Motoren ist essentiell für das schnelle polare Wachstum, das man vergleichbar nur in pflanzlichen Pollenschläuchen oder Säugetierneuronen findet. Transport findet entlang eines Zytoskelett-Netzwerks statt, das aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli besteht. Das Aktin-Zytoskelett ist essenziell für das polare Wachstum, während das Mikrotubuli-Zytoskelett Wachstumsrichtung und -geschwindigkeit vermittelt.¹⁷ In den filamentösen Pilzen *A. nidulans* und *Neurospora crassa* führt beispielsweise der Verlust der Mikrotubuli zu gestörtem Filamentwachstum. Hyphen wachsen langsamer und sind nicht mehr rein linear, sie mäandern.

Mikrotubuli sind ebenfalls polar. Ihr wachsendes Plusende weist in Richtung der Zellpole und ihre jeweiligen Entstehungspunkte, die Minusenden, befinden sich in der Nähe der zentralen Zellkerne. Der Transport von molekularer Fracht, wie beispielswei-

¹⁴ Vgl. Müller *et al.* (2007).

¹⁵ Vgl. Elson *et al.* (2009).

¹⁶ Vgl. Fischer *et al.* (2008).

¹⁷ Vgl. Harris (2006).

se von Vesikeln, in beide Richtungen entlang der Mikrotubuli wird durch zwei verschiedene molekulare Motoren vermittelt. Das Kinesin Kin3 transportiert Vesikel Richtung Plusende, und der molekulare Gegenspieler Dynein (Dyn1/2) bewegt die Fracht in die entgegengesetzte Richtung. Zurzeit wird intensiv erforscht, welche molekularen Komponenten über Vesikel transportiert werden, um die Verknüpfung zwischen Langstreckentransport von Vesikeln und polarem Wachstum aufzudecken.

mRNA-Longstreckentransport in *U. maydis*

Neben dem Vesikelverkehr spielt auch der Transport von mRNAs eine entscheidende Rolle für das polare Wachstum.¹⁸ So beobachtet man in Abwesenheit des Schlüsselregulators Rrm4, ein sequenzspezifisch RNA-bindendes Protein, dass sowohl das Wachstum der infektiösen Filamente als auch die Infektionsrate gestört ist. Es wurden keine Defekte während der hefeartigen Vermehrung beobachtet, was dafür spricht, dass der zugrunde liegende zelluläre Prozess besonders während der Filamentbildung wichtig ist.¹⁹ Eine detailliertere Analyse des polaren Wachstums ergab, dass in *rrm4*-Mutanten Filamente vermehrt an beiden Enden auswachsen und keine basalen Septen eingezogen werden (Abb. 4A). Demzufolge ist die Ausbildung der Polaritätsachse gestört.

Das Protein Rrm4 enthält drei RNA-Erkennungsdomänen (*RNA recognition motifs*, RRM)s am N-Terminus und eine Peptid-Interaktionsdomäne am C-Terminus (eine sogenannte MadmoiseLLE-Domäne, MLLE; Abb. 4B). Die Analyse der subzellulären Lokalisation mithilfe von Fusionsproteinen mit fluoreszierenden Proteinen ergab, dass Rrm4 *in vivo* in Form von definierten Partikeln entlang von Mikrotubuli pendelt.²⁰ Diese Partikel bewegen sich mit hoher Prozessivität zu den Polen, wo sie die Richtung ändern und zurückkehren (Abb. 4C). Mutationen in der MLLE-Domäne führen zum Funktionsverlust. Man beobachtet die Bildung von großen unbeweglichen Partikeln. Folglich ist diese Domäne essentiell für die Bildung von mobilen Einheiten. Das Pendeln von Rrm4-Partikeln ist ein aktiver Prozess, da der Verlust des konventionellen Kinesins dazu führt, dass Rrm4 an den Polen akkumuliert. Diese Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass Rrm4 den Longstreckentransport von mRNAs vermittelt.²¹

Diese Annahme konnten wir kürzlich durch die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Poly(A)-bindenden Proteins Pab1 bekräftigen. Pab1 bindet an die 3'-Enden von mRNAs und kann somit als molekularer Marker für die subzelluläre Lokalisation von mRNAs dienen. Pab1 wird ebenfalls in Filamenten in Form von Partikeln entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts transportiert und das Protein ko-lokalisiert mit Rrm4 *in vivo* in fast allen Partikeln. Folglich handelt es sich um mRNPs. Interessanterweise wird Pab1-gebundene mRNA nicht mehr transportiert, wenn Rrm4 fehlt. Das besagt, dass Rrm4 die Haupttransporteinheit für den mRNA-Longstreckentransport darstellt.²²

Um die Ziel-mRNAs von Rrm4 zu identifizieren, haben wir eine UV-Kreuzvernetzungsmethode angewandt (*crosslinking and immunoprecipitation*, CLIP).²³ Durch die

¹⁸ Vgl. Zarnack und Feldbrügge (2010).

¹⁹ Vgl. Feldbrügge *et al.* (2008).

²⁰ Vgl. Becht *et al.* (2006).

²¹ Vgl. Zarnack und Feldbrügge (2007).

²² Vgl. König *et al.* (2009).

²³ Vgl. Ule (2009).

Abb. 4: Rrm4 vermittelt den mikrotubuliabhängigen Transport von mRNAs in *U. maydis*. (A) Filamente wachsen mit einer definierten Polaritätsachse. An der Wachstumszone (Stern) findet die Neusynthese von Zellmembran und -wand statt. Am distalen Pol werden in regelmäßigen Abständen Begrenzungssepten eingezeichnet (Pfeilköpfe). Es kommt zur Ausbildung von charakteristischen leeren Abschnitten. Der Verlust von Rrm4 (*rrm4Δ*) führt zu einer gestörten Polaritätsachse. Filamente von Mutanten (*rrm4Δ*) wachsen überwiegend an beiden Polen (Sterne) der initialen Zelle aus (Maßstab, 10 Mikrometer; Abbildung veröffentlicht in der Zeitschrift *Molecular General Genomics*, 2007). (B) Schematische Darstellung des RNA-bindenden Proteins Rrm4 (graues Band, die Zahlen stehen für Aminosäurepositionen). Drei RRM- (grün) und eine MLE-Domäne (blau) befinden sich am N- beziehungsweise C-Terminus des Proteins. Die beiden N-terminalen RRM-Domänen binden vermutlich CA-reiche Sequenzen in Ziel-mRNAs (Wellenlinie). (C) Rrm4-enthaltende Partikel (rot) pendeln entlang von Mikrotubuli (grün). Die gestrichelte Linie gibt die Umrisse einer Filamentspitze wieder. Der Stamm exprimiert Rrm4, und Tub1 fusioniert mit dem rot beziehungsweise grün fluoreszierenden Protein (Maßstab, 10 Mikrometer). (D) Schematische Darstellung des Systems zur RNA-Lebendbeobachtung. Ziel-mRNAs von Rrm4 (rot) enthalten sowohl ein endogenes CA-reiches Motiv sowie heterologe Bindestellen für λN-Gfp (Haarnadelstruktur). Auf diese Weise wird das „fluoreszierende“ heterologe RNA-bindende Protein zur Ziel-mRNA rekrutiert und für Lebendaufnahmen sichtbar gemacht (Abbildung aus *Eukaryotic Cell*, 2010). (E) Rrm4 und *ubi1*-mRNA sind Bestandteil der gleichen Partikel. Aufnahmen sind Echtzeit-Filmen entnommen, die mit abwechselndem Fluoreszenz-Nachweis (grün und rot) aufgenommen wurden. Schwarze und weiße Pfeile verweisen auf Protein beziehungsweise mRNA. Die abgelaufene Zeit ist in Sekunden angegeben. Ko-Lokalisation ist erkennbar, wenn Partikel der gleichen Bahn folgen (Maßstäbe, 10 Mikrometer im oberen Teil und 2 Mikrometer im unteren Teil; Abbildung aus *EMBO Journal*, 2009).

UV-Bestrahlung wird RNA kovalent mit Proteinen verknüpft, die sich in direkter Nähe befinden. Auf diese Weise wird ein zellulärer „Schnappschuss“ der Protein-RNA-Interaktionen generiert. Protein-RNA-Komplexe werden im Anschluss aufgereinigt und die RNA kloniert und sequenziert. Auf diese Weise wurden circa 50 mögliche Ziel-mRNAs identifiziert, die für Proteine funktioneller Gruppen kodieren, wie zum Beispiel mitochondrielle Proteine und Translations- sowie Polaritätsfaktoren. Eine bioinformatische Suche nach gemeinsamen Mustern ergab ein CA-reiches Motiv in den identifizierten mRNAs. Dieses Motiv könnte eine mögliche Bindestelle für Rrm4 darstellen (Abb. 4B). In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass das menschliche RRM-

Protein hnRNP L ebenfalls CA-reiche Elemente bindet. Darüber hinaus sind CA-reiche Sequenzen als RNA-Lokalisations-elemente beschrieben worden.

Zur Prüfung der Frage, ob diese potentiellen Ziel-mRNAs als molekulare Fracht des Rrm4-Transportsystems funktionieren, haben wir RNA-Lebendzellbeobachtungen durchgeführt.²⁴ Kernaspekte dieser Technik sind erstens die Expression eines heterologen RNA-bindenden Proteins λ N, welches mit Gfp fusioniert wurde, und zweitens die Einfügung der Bindungsstelle von λ N in die zu untersuchende mRNA. Auf diese Weise wird das „fluoreszierende“ RNA-bindende Protein spezifisch an die Ziel-mRNA rekrutiert (Abb. 4D). So kann die subzelluläre Lokalisation einer definierten mRNA-Spezies *in vivo* verfolgt werden (Abb. 4E).

Mithilfe dieser Technik haben wir die subzelluläre Lokalisation der *ubi1*-mRNA untersucht, welche für ein natürliches Fusionsprotein aus Ubiquitin und dem ribosomalen Protein Rpl40 kodiert. Die Lebendzellbeobachtung ergab, dass diese mRNA entlang von Mikrotubuli pendelt. Das gleiche trifft für die ebenfalls getestete *rho3*-mRNA zu, die für einen Polaritätsfaktor kodiert. Die Negativkontrolle hingegen wird kaum transportiert. Das Einfügen der CA-reichen regulatorischen 3' untranslatierten Region (UTR) von *ubi1*-mRNA in die Kontroll-mRNA führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl an Transporteinheiten und deren Prozessivität. Dieses wichtige Schlüsselexperiment zeigt, dass die CA-reiche Region wie ein mRNA-Lokalisations-element funktioniert. Im Prinzip können auf diese Weise alle mRNAs verteilt werden, aber Rrm4 Ziel-mRNAs werden deutlich effizienter transportiert.

Eine Kombination von Protein- und RNA-Lebendzellbeobachtung ergab, dass *ubi1*-mRNAs und Rrm4 ko-lokalisieren. Ebenso führt das Fehlen von Rrm4 zum Verlust der pendelnden mRNPs.²⁵ Letztendlich konnten wir zeigen, dass bei Entfernen der RNA-Bindungsdomäne von Rrm4 der mRNA-Transport nicht mehr stattfindet. Dessen ungeachtet fährt eine verkürzte Variante des Rrm4-Proteins immer noch entlang von Mikrotubuli. Dies verdeutlicht, dass Rrm4 ein integraler Bestandteil der Transportmaschinerie ist (Abb. 5B).

Die Daten zweier unabhängiger *In-vivo*-Techniken belegen, dass Rrm4 den mikrotubuliabhängigen Transport bestimmter mRNAs in infektiösen Filamenten vermittelt (Abb. 5A). Warum aber werden bestimmte mRNAs über weite Strecken transportiert? Die einfachste Antwort wäre, dass der mRNA-Transport für die asymmetrische und/oder symmetrische Verteilung von Proteinen verantwortlich ist. So könnte beispielsweise der Transport der *rho3*-mRNA dazu führen, dass Rho3 hauptsächlich an den basalen Septen lokalisiert (Abb. 5A). In Zukunft wird wichtig sein, diese verschiedenen Möglichkeiten zu untersuchen und den Transportmechanismus genauer zu erforschen. Hierzu gehört die Identifizierung der Adaptorproteine sowie der beteiligten molekularen Motoren.

Schlussfolgerungen

Die Untersuchung der Bildung von infektiösen Filamenten in *U. maydis* hat ergeben, dass der Mikrotubuli-abhängige mRNA-Transport wichtig für das polare Wachstum

²⁴ Vgl. Daigle und Ellenberg (2007).

²⁵ Vgl. König *et al.* (2009).

Abb. 5: Modell für den RNA-Longstreckentransport während des filamentösen Wachstums in *U. maydis*. (A) Rrm4-Partikel (rote Kreise) transportieren mRNAs (rote Schlangenlinien), die Pab1 tragen (blaue Kreise), bidirektional vom Zellkern (grauer Kreis) zu den Zellpolen entlang von Mikrotubuli (schwarze Linien mit Plus- und Minuspol). Der Transport der *rho3*-mRNA fördert vermutlich die Lokalisation von Rho3 an den Begrenzungssepten. (B) Das Entfernen der RNA-Bindungsdomänen (Rrm4 Δ RRM) führt zum Funktionsverlust von Rrm4. Die Zellen weisen eine gestörte Polaritätsachse auf und wachsen an beiden Polen filamentös aus. Die mRNAs akkumulieren im Zentrum des Filaments. Rrm4 pendelt dennoch entlang der Mikrotubuli, was dafür spricht, dass es sich um einen integralen Bestandteil der Transporteinheit handelt (Abbildung aus *Eukaryotic Cell*, 2010).

ist.²⁶ Obwohl das Schlüsselprotein Rrm4 spezifisch für Pilze ist, ähneln die zugrundeliegenden molekularen Konzepte des Langstreckentransports bemerkenswert den Vorgängen in höheren Eukaryonten: (i) mRNPs pendeln in beiden Richtungen entlang von Mikrotubuli. (ii) Spezifische RNA-bindende Proteine erkennen Lokalisationselemente in Ziel-mRNAs. (iii) mRNA-Transportaktivität kann moduliert werden. So ist beispielsweise zu beobachten, dass die RNA-Bindung von Rrm4 während des Wechsels zum filamentösen Wachstum ansteigt. Dies ist analog zu dem verstärkten mRNA-Transport während der synaptischen Stimulierung in Neuronen.²⁷ (iv) Ziel-mRNAs kodieren ähnliche Proteine, wie zum Beispiel Rho3 in *U. maydis* und RhoA in Säugern. Diese Beispiele verdeutlichen, dass *U. maydis* ein vielversprechendes Modellsystem für den Langstreckentransport in Eukaryoten ist. Wie so oft können Mikroorganismen dazu dienen, Basiskonzepte biologischer Prozesse aufzudecken.

Literatur

- BANUETT, F. (1992). „*Ustilago maydis*, the delightful blight“, *Trends in Genetics* 8, 174–180.
- BÖLKER, M., M. URBAN und R. KAHMANN (1992). „The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components“, *Cell* 68, 441–450.
- BRACHMANN, A., J. KÖNIG, C. JULIUS und M. FELDBRÜGGE (2004). „A reverse genetic approach for

²⁶ Vgl. Zarnack und Feldbrügge (2010).

²⁷ Vgl. Dichtenberg *et al.* (2008).

- generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*", *Molecular Genetics and Genomics* 272, 216–226.
- BECHT, P., J. KÖNIG und M. FELDBRÜGGE (2006). „The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules", *Journal of Cell Science* 119, 4964–4973.
- BREFORT, T., G. DOEHLEMAN, A. MENDOZA-MENDOZA, S. REISSMANN, A. DJAMEI und R. KAHMANN (2009). „*Ustilago maydis* as a Pathogen", *Annual Review Phytopathology* 47, 423–445.
- DAIGLE, N. und J. ELLENBERG (2007). „LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging", *Nature Methods* 4, 633–636.
- DICTENBERG, J. B., S. A. SWANGER, L. N. ANTAR, R. H. SINGER und G. J. BASSELL (2008). „A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome", *Developmental Cell* 14, 926–99.
- ELSON, S. L., S. M. NOBLE, N. V. SOLIS, S. G. FILLER und A. D. JOHNSON (2009). „An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth", *Public Library of Science Genetics* 5, e1000664, doi:10.1371/journal.pgen.1000664.
- FELDBRÜGGE, M., J. KÄMPER, G. STEINBERG und R. KAHMANN (2004). „Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*", *Current Opinion in Microbiology* 7, 666–672.
- FELDBRÜGGE, M., K. ZARNACK, E. VOLLMEISTER, S. BAUMANN, J. KOEPKE, J. KÖNIG, M. MÜNSTER-KÖTTER und G. MANNHAUPT (2008). „The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*", *Fungal Genetics and Biology* 45, 40–46.
- FISCHER, R., N. ZEKERT und N. TAKESHITA (2008). „Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains", *Molecular Microbiology* 68, 813–826.
- HARRIS, S. D. (2006). „Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold", *International Review of Cytology* 251, 41–77.
- HOLLIDAY, R. (2004). „Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*", *DNA Repair* 3, 671–682.
- JANSEN, R. P. (2001). „mRNA localization: message on the move", *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 247–256.
- KÄMPER, J., M. REICHMANN, T. ROMEIS, M. BÖLKER und R. KAHMANN (1995). „Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*", *Cell* 81, 73–83.
- KÄMPER, J., R. KAHMANN, M. BÖLKER, L. J. MA, T. BREFORT, B. J. SAVILLE, F. BANUETT, J. W. KRONSTAD, S. E. GOLD, O. MÜLLER, M. H. PERLIN, H. A. WÖSTEN, R. DE VRIES, J. RUIZ-HERRERA, C. G. REYNAGA-PENA, K. SNETSELAAR, M. MCCANN, J. PÉREZ-MARTÍN, M. FELDBRÜGGE, C. W. BASSE, G. STEINBERG, J. I. IBEAS, W. HOLLOMAN *et al.* (2006). „Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*", *Nature* 444, 97–101.
- KÖNIG, J., S. BAUMANN, J. KOEPKE, T. POHLMANN, K. ZARNACK und M. FELDBRÜGGE (2009). „The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs", *EMBO Journal* 28, 1855–1866.
- LÉCUYER, E., H. YOSHIDA, N. PARTHASARATHY, C. ALM, T. BABAK, T. CEROVINA, T. R. HUGHES, P. TOMANCAK und H. M. KRAUSE (2007). „Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function", *Cell* 131, 174–187.
- MARTIN, K. C. und A. EPHRUSSI (2009). „mRNA localization: gene expression in the spatial dimension", *Cell* 136, 719–730.
- MÜLLER, M., A. HEUCK und D. NIESSING (2007). „Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast", *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 171–180.

- ST JOHNSTON, D. (2005). „Moving messages: the intracellular localization of mRNAs“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 363–375.
- ULE, J. (2009). „High-throughput sequencing methods to study neuronal RNA-protein interactions“, *Biochemical Society Transactions* 37, 1278–1280.
- ZARNACK, K. und M. FELDBRÜGGE (2007). „mRNA trafficking in fungi“, *Molecular Genetics and Genomics* 278, 347–359.
- ZARNACK, K. und M. FELDBRÜGGE (2010). „Microtubule-dependent mRNA transport in fungi“. *Eukaryotic Cell* 9, 982–990.

Prof. Dr. Dr. h. c. Helmut Ritter

Helmut Ritter studierte ab 1967 Chemie an der Universität Marburg und erwarb 1972 den Abschluss Diplom-Chemiker. 1975 promovierte er mit dem Thema „Synthesis of polymeric drugs“ bei Prof. Ringsdorf an der Universität Mainz. Von 1976 bis 1981 arbeitete er in der Zentralen Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Bayer AG in Krefeld-Uerdingen. 1986 lehrte er an der Universität Bayreuth Polymerchemie.

Helmut Ritter arbeitete von 1982 bis 1997 an der Universität Wuppertal und habilitierte sich dort 1989 in Organischer Chemie und Polymerchemie. Von 1998 bis 2001 arbeitete er als Professor am Institut für Organische Chemie der Universität Mainz.

Seit Oktober 2001 ist Helmut Ritter Inhaber des Lehrstuhls für Präparative Polymerchemie am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Dr. Monir Tabatabai

Monir Tabatabai wurde am 8. August 1961 in Teheran geboren. Nach Ihrem Abitur, das sie im Jahr 1979 ablegte, zog sie im Jahr 1981 nach Deutschland. Nach dem Erwerb der Sprachkenntnisse nahm sie das Chemie-Studium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz auf. Sie spezialisierte sich im Hauptstudium auf die organische Synthese und erhielt 1991 ihr Diplom. Im Jahr 1994 promovierte sie im gleichen Teilgebiet mit dem Thema „Dissymmetrische Calix[n]arene“ bei Prof. Dr. W. Vogt an der Universität Mainz. Von Mai 1995 bis September 1997 arbeitete sie als Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Stadler an den Universitäten Mainz beziehungsweise Bayreuth. Sie befasste sich in dieser Zeit mit der Synthese und Modifizierung von SBM-Dreiblockcopolymeren mit einer helikalen Morphologie. Von Mai 1998 bis Oktober 2001 war sie als Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h. c. H. Ritter in Mainz beschäftigt. Seit November 2001 ist sie als Wissenschaftliche Angestellte an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie am Lehrstuhl für Präparative Polymerchemie tätig.

Dipl.-Chem. Gero Maatz

Gero Maatz wurde am 9. April 1982 in Datteln geboren. Nach seinem Wehrdienst im 6. Wachbataillon BMVg Siegburg (2002–2003) absolvierte er von 2003 bis 2007 das Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2008 verfasste er seine Diplomarbeit am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie zu dem Thema „Titan und Zirkonium modifizierte Polymethacrylate“. Seit November 2008 promoviert er am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu dem Thema „Optische Polymere für medizinische Anwendungen“.