

## RNA-Lokalisierung in Pflanzenzellen

# Visualisierung von mRNA und mRNP-Komplexen in Pflanzenzellen

ULRICH HAMMES, JOHANNES SCHÖNBERGER, THOMAS DRESSELHAUS  
ZELLBIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER PFLANZEN, UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Lokalisierung von mRNA in subzellulären Kompartimenten ist ein Mechanismus, um Translation räumlich und zeitlich zu regulieren. Mithilfe von viralen RNA-bindenden Proteinen haben wir allgemeine und zellspezifische Vektorserien entwickelt, um die Rolle von lokalen mRNP-Komplexen auch bei Pflanzen untersuchen zu können.

The localization of mRNA to subcellular compartments is a mechanism for the regulation of translation with spatial and temporal control. By means of viral RNA binding proteins we have developed general and cell-specific vector series aiming to elucidate the role of mRNP complexes in plants.

### Polarität von Pflanzenzellen und Bedeutung der Lokalisierung von mRNAs

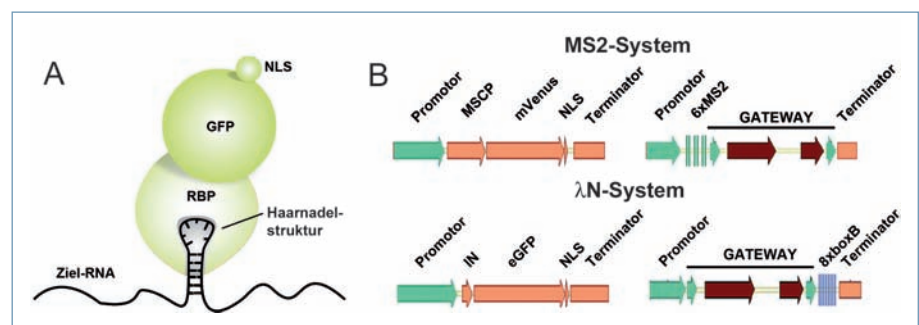
■ Polarität von Zellen ist ein grundlegendes Phänomen, das in allen lebenden Organismen existiert [1]. Bei Entwicklungsprozessen wird durch die Polarität von männlichen und weiblichen Gameten und insbesondere nach Befruchtung durch die Polarität der Zygote und des frühen Embryos die spätere Körperachse definiert. Die polare Lokalisierung von mRNA ist hierbei ein essenzieller Mechanismus, um Translation räumlich und zeitlich zu regulieren und Tochterzellen mit unterschiedlichen Zellschicksalen zu erzeugen. Dieser Mechanismus spielt bei Vertebraten, Invertebraten und Pilzen sowohl während der Entwicklung als auch in voll ausdifferenzierten Zelltypen eine große und gut dokumentierte Rolle [2]. Bei der Taufliege *Drosophila* sind z. B. während der frühen Embryogenese bis zu 70 Prozent der mRNAs polar lokalisiert [3]. Im Gegensatz dazu ist bei Pflanzen nahezu unbekannt, ob mRNAs polar lokalisiert sind, wie dies ggf. reguliert wird und welche Bedeutung dieser Prozess bei der reproduktiven und vegetativen Entwicklung spielt. Insbesondere während der Gametogenese (Bildung von Ei, Zentral- und Spermazellen) und der Embryogenese werden zahlreiche morphologisch unterschiedli-

che polare Zelltypen erzeugt. Auch in der adulten Pflanze werden kontinuierlich durch die Aktivität von Stammzellen in den Meristemen polare Zellen mit unterschiedlichen Zellschicksalen differenziert. Über die molekularen Mechanismen der Polaritätsetablierung ist bisher wenig bekannt. Das Phytohormon Auxin spielt eine zentrale Rolle und definiert als Morphogen Bereiche, in denen genetische Differenzierungsprogramme initiiert und anschließend Polarität innerhalb von Geweben etabliert werden [4]. Ziel unserer Arbeit ist es, die Etablierung der Polarität

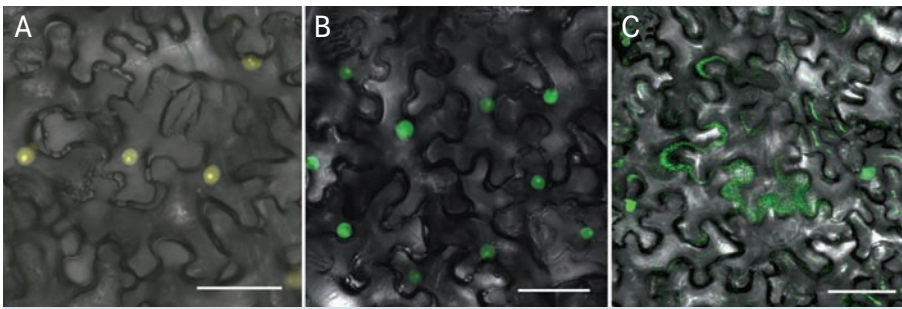
pflanzlicher reproduktiver Zellen zu verstehen und die Beteiligung und Rolle von polar lokalisierten mRNP-Komplexen hierbei zu untersuchen.

### Methoden zum Nachweis von mRNA in Pflanzenzellen

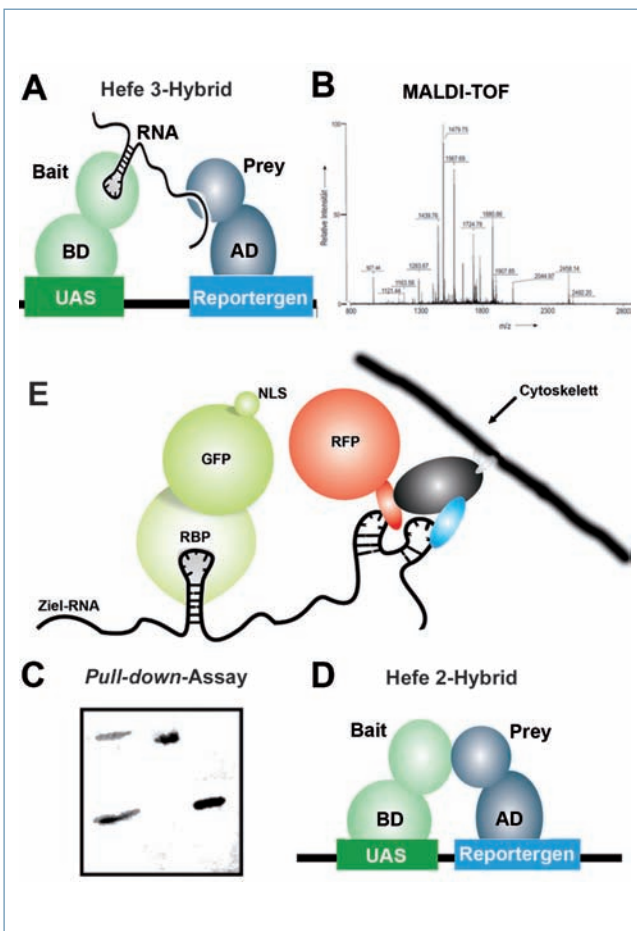
Bei Pflanzen gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keinen eindeutigen Befund für eine polare Verteilung von mRNAs während unterschiedlichster Entwicklungsprozesse. Dies liegt größtenteils in der zurzeit verfügbaren Methodik begründet. mRNA wird auf zellulärer Ebene in der Regel durch *in situ*-Hybridisierungstechniken nachgewiesen. Die Untersuchung von Pflanzenzellen durch *whole mount in situ*-Hybridisierung, bei der Gewebe nicht geschnitten werden, wird jedoch dadurch erschwert, dass insbesondere reproduktive Organe (wie z. B. der Eiapparat) tief in maternale Gewebe eingebettet und daher mit diesem Ansatz experimentell schwer zugänglich sind. Herkömmliche *in situ*-Hybridisierung von Gewebeschnitten ist ebenfalls problematisch, da gametische Zellen bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, sehr klein sind (Eizelle: 12 µm, Spermazellen: etwa 2 µm) und damit nur selten geschnitten werden. Der Arbeitsaufwand macht ein Durchmusterung einer großen Anzahl



▲ **Abb. 1:** A, Schematische Darstellung des Prinzips der Detektion von Ziel-mRNAs durch virale RNA-Bindeproteine (RBP). In Ziel-mRNA intergrierte Haarnadelstrukturen (*hairpin*) werden sequenzspezifisch erkannt und gebunden. Das hier gezeigte RBP ist mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) fusioniert. B, ausgewählte Beispiele verfügbarer Vektorserien. Links: RBP-Fusionen, rechts: *hairloop*-GATEWAY-Vektoren. Weitere Erläuterungen siehe Text.



▲ **Abb. 2:** Transiente Expression ausgewählter Konstrukte in Epidermiszellen aus Tabak (*Nicotiana benthamiana*). **A**, MSCP-mVenus-NLS. **B**, λN-eGFP-NLS. **C**, Ko-Expression von λN-eGFP-NLS und einer Ziel-RNA. Die Fluoreszenz in **A** und **B** ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In Gegenwart der Ziel-RNA ist die Fluoreszenz überwiegend im Zytoplasma zu finden (**C**). Alle Abbildungen sind einzelne konfokale Schnitte, Maßstab: 50 µm.



◀ **Abb. 3:** Schematische Darstellung des Prinzips zur Visualisierung und Charakterisierung von mRNP-Komplexen. **A**, Endogene RBPs können z. B. durch das Hefe 3-Hybrid-System identifiziert werden. Weitere Proteinbestandteile des mRNP-Komplexes können analysiert werden durch: **B**, Massenspektrometrie; **C**, Pull-down-Assays; **D**, Hefe 2-Hybrid-System. **E**, Die Interaktion der Ziel-RNA mit einem endogenen RBP kann durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) analysiert werden, wenn das endogene RBP mit einem FP fusioniert wird, welches mit dem viralen RBP-FP-Komplex kompatibel ist. Hier dargestellt ist das Donor-Akzeptor-Paar GFP und RFP. UAS: *upstream activating sequence*; BD: Binde-domäne, AD: Aktivierungs-domäne.

von Kandidaten-mRNAs daher fast unmöglich. Darüber hinaus verfügen Pflanzenzellen im Gegensatz zu tierischen Zellen über eine Vakuole, die oft den größten Teil des Zellvolumens einnimmt und zusätzlich Probleme bei der Fixierung bereitet. Ein etwaiger Gradient einer Substanz im Zytoplasma ist somit meist nur auf die Peripherie der Zelle beschränkt und schwer zu visualisieren.

Eine alternative Methode, um eine polare Verteilung von mRNA und Ribonukleinsäure-Protein(RNP)-Komplexen zu visualisieren,

stellen das λN- und das MS2-System dar. Diese Systeme beruhen auf der Fähigkeit viraler RNA-Bindeproteine (RBPs), ihre komplementären RNA-*hairpins* sequenzspezifisch in einer Ziel-RNA zu erkennen und mit hoher Affinität zu binden (**Abb. 1A**). Das λN-System stammt aus dem Phagen λ, das MS2-System aus dem Phagen MS2. Die von diesen RBPs erkannten Sequenzen werden auch als *boxB* bzw. *MS2* bezeichnet. Die RBPs λN und das MS *coat protein* (MSCP) wurden hierzu mit einem fluoreszenten Protein (FP) und

einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) fusioniert (**Abb. 1B**). In Abwesenheit einer Ziel-RNA (Kandidaten-mRNAs mit 5' oder 3' eingefügten *boxB*- bzw. *MS2*-RNA-*hairpins*) verbleibt das Bindeprotein im Zellkern. In Gegenwart einer Ziel-RNA wird die Fluoreszenz dieses Fusionsproteins nach Kernexport im Zytoplasma detektierbar. Ungebundenes RBP wird aufgrund der Kernlokalisierungssequenz in den Zellkern zurücktransportiert. Dadurch ist gewährleistet, dass Fluoreszenz im Zytoplasma ausschließlich auf Ziel-RNAs bzw. Ziel-RNA enthaltenden RNPs beruht. Beide Systeme sind im tierischen System gut etabliert [5, 6]. Bei Pflanzen wurde bisher nur das MS2-System einmal erfolgreich zur Lokalisierung eines RNP-Komplexes in Reis-Endosperm angewendet [7].

Um beide Systeme in Pflanzen zur routinierten Durchmusterung einer großen Anzahl an Kandidaten-mRNAs zu etablieren, haben wir verschiedene Vektorserien etabliert (**Abb. 1B**). Das kernlokalisierte MSCP liegt hierbei als Fusion mit dem gelb fluoreszierenden Protein mVenus und das λN-Protein als Fusion mit dem grün fluoreszierenden Protein eGFP vor. Diese Fusionsproteine können prinzipiell unter Kontrolle jedes Promotors exprimiert werden – sinnvollerweise verwendet man den nativen Promotor der Kandidaten-RNA oder zelltypspezifische Promotoren. Um eine große Zahl von Kandidaten-mRNAs untersuchen zu können, wurden die oben beschriebenen Ziel-*hairpins* in GATEWAY®-kompatible Vektoren (Invitrogen) eingebracht. Die *hairpins* befinden sich entweder vor (MS2-System) oder nach (λN-System) der Ziel-RNA. Damit ist gewährleistet, dass die RNPs unabhängig von der Positionierung der viralen RNA-Struktur motive untersucht werden können.

Die Funktionalität beider Systeme wurde durch transiente Ko-Expression von RBP-Konstrukt und Ziel-RNA-Konstrukt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren in *Nicotiana benthamiana*-Epidermiszellen überprüft (**Abb. 2**). Die Fluoreszenz der Fusionsproteine befindet sich in Abwesenheit einer Ziel-RNA ausschließlich im Zellkern (**Abb. 2A, B**). Diese Lokalisierung ändert sich durch Ko-Expression einer Ziel-RNA, die Fluoreszenz ist nun hauptsächlich an der Peripherie der Zellen detektierbar (**Abb. 2C**).

### Fazit und Ausblick

Unsere vorläufigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass beide Systeme in Pflanzen angewendet werden können. Die hohe Variabilität der hergestellten Vektorserien ermög-

licht die Visualisierung von mRNP-Komplexen in den verschiedensten Geweben und die Analyse einer großen Anzahl von Kandidaten-mRNAs durch den Einsatz von GATEWAY-kompatiblen Vektoren. Wenn für eine Kandidaten-mRNA eine polare Verteilung gezeigt werden kann, ist es darüber hinaus möglich endogene Proteinbestandteile des jeweiligen mRNP-Komplexes z. B. durch das Hefe 3-Hybrid-System (**Abb. 3A**), nach Aufreinigung durch Massenspektrometrie (**Abb. 3B**) oder *Pull-down*-Assays (**Abb. 3C**) und Hefe 2-Hybrid-System (**Abb. 3D**) zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Beteiligung einer Kandidaten-mRNA am RNP-Komplex kann darüber hinaus auch durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) gezeigt werden, indem Proteinkomponenten z. B. mit CFP (im MSCP-mVenus-System) bzw. mCherry (im  $\lambda$ N-eGFP-System) markiert werden (**Abb. 3E**). Durch Protein-Protein-Interaktionsstudien können anschließend weitere Proteine und damit die Zusammensetzung pflanzlicher mRNP-Komplexe aufgeklärt werden.

### Danksagung

Diese Arbeit wird durch die DFG unterstützt (DR334/7). ■

### Literatur

- [1] Macara IG, Mili S (2008) Polarity and differential inheritance – universal attributes of life? *Cell* 135:801–812
- [2] Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136:719–730
- [3] Lecuyer E, Yoshida H, Parthasarathy N et al. (2007) Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* 131:174–187
- [4] Moller B, Weijers D (2009) Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 1:a001545
- [5] Daigle N, Ellenberg J (2007) LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods* 4:633–636
- [6] Zimyanin VL, Belaya K, Pecreaux J et al. (2008) *In vivo* imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* 134:843–853
- [7] Hamada S, Ishiyama K, Sakulsingharoj C et al. (2003) Dual regulated RNA transport pathways to the cortical region in developing rice endosperm. *Plant Cell* 15:2265–2272

### Korrespondenzadresse:

Dr. Ulrich Hammes  
 Zellbiologie und Biochemie der Pflanzen  
 Universität Regensburg  
 Universitätsstraße 31  
 D-93053 Regensburg  
 Tel.: 0941-943-3006  
 Fax: 0941-943-3352  
 Ulrich.hammes@biologie.uni-regensburg.de

### AUTOREN



#### Ulrich Hammes

Jahrgang 1973. 1993–1999 Biologiestudium an der Universität Tübingen. 1999–2002 Promotion am ZMBP der Universität Tübingen. 2002–2005 Postdoc am Donald Danforth Center in St. Louis, MO, USA. 2005–2008 Gruppenleiter am Lehrstuhl Molekulare Pflanzenphysiologie der Universität Erlangen. Seit 2008 Gruppenleiter am Lehrstuhl Zellbiologie und Pflanzenbiochemie an der Universität Regensburg.



#### Johannes Schönberger

Jahrgang 1985. 2003–2009 Biochemiestudium an der Universität Regensburg und der University of Colorado, Boulder, CO, USA. Seit 2009 Promotion am Institut für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie in Regensburg.



#### Thomas Dresselhaus

Jahrgang 1964. 1984–1990 Biologiestudium an den Universitäten Münster und Tübingen. 1991–1994 Promotion am Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg. 1995 Forschungsaufenthalt in Adelaide, Australien. 1996–1998 Arbeitsgruppenleiter in der Abteilung Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen II, Universität Hamburg. 1999 Forschungskoordinator bei Agricultural Technologies & Genetics GmbH, Rastatt. 2000–2006 Nachwuchsgruppenleiter am Biozentrum Klein Flottbek, Hamburg. 2003 Habilitation. Seit 2006 Inhaber des Lehrstuhls Zellbiologie und Pflanzenbiochemie an der Universität Regensburg.