

Posttranskriptionelle Regulierung

Kontrolle der Pflanzenentwicklung durch MikroRNAs

DETLEF WEIGEL, PATRICIA LANG

ABTEILUNG MOLEKULARBIOLOGIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR ENTWICKLUNGSBIOLOGIE, TÜBINGEN

Small, 21–22 nucleotide long RNAs called microRNAs play an essential role in the spatial and temporal regulation of gene expression. They are often part of complex gene networks. By controlling the stability or translation of their target mRNAs they have an influence on many developmental pathways. Juvenile to adult transition, initiation of flowering or plant architecture and leaf morphology are examples of miRNA-regulated processes during plant development.

DOI: 10.1007/s12268-013-0363-4
© Springer-Verlag 2013

■ MikroRNAs (miRNAs) wurden erstmals vor 20 Jahren als Kontrollfaktoren innerhalb der Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Mittlerweile sind die nicht-codierenden, doppelsträngigen Ribonukleinsäuren als elementare posttranskriptionelle Regulatoren eukaryotischer Genome bekannt. Sie binden im Komplex mit Proteinen sequenzspezifisch an die Boten-RNA (mRNA) eines Zielgens und verhindern dadurch dessen Translation oder führen zum Zerschneiden oder beschleunigten Abbau der jeweiligen mRNA. Dies ermöglicht eine zeitnahe und flexible Feinjustierung von Genexpression, die die Wirkung von Transkriptionsfaktoren ergänzt. Die miRNAs spielen daher in nahezu jedem biologischen Kontext eine fundamentale Rolle. Hier diskutieren wir die Effekte von miRNAs an einem besonders gut verstandenen Beispiel, der Pflanzenentwicklung.

miRNA-Biogenese in Pflanzen

Die Synthese von miRNAs beginnt im Zellkern mit der Herstellung des Primärtranskripts (*primary*-miRNA) durch die RNA-Polymerase II (Pol II) (**Abb. 1**). Das Enzym DICER LIKE-1 (DCL1) ist für die anschließende Prozessierung innerhalb der subnuklearen *dicing bodies* (*D-bodies*) verantwortlich. Dort reift das *foldback*-Molekül der Vorläufer-miRNA

(*precursor*-miRNA) zum fertigen, 21 bis 22 Basenpaare langen miRNA:miRNA*-Duplex. DCL1 wird hierbei in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, der Ackerschmalwand, durch weitere Faktoren wie HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), SERRATE (SE), den *nuclear cap-binding complex* (CBC) und *C-terminal domain phosphatase-like 1* (CPL1) unterstützt. Die reife miRNA wird zur Erhöhung der Stabilität methyliert und in das Zytoplasma transportiert. Gemeinsam mit einem der zehn ARGONAUTE(AGO)-Proteine bildet dort der *guide*-Strang der reifen miRNA (miRNA-Strang) einen aktiven *RNA-induced silencing complex* (RISC). Dieser bindet komplementäre mRNAs und ist für deren posttranslationale Kontrolle verantwortlich. Die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulierung von miRNAs hilft, die zeitliche und räumliche Spezifität der Genaktivität zu gewährleisten [1].

Phasen der Pflanzenentwicklung

Die Wachstumszeit einer Pflanze nach der Keimung kann in zwei Hauptstadien, den vegetativen und reproduktiven Abschnitt, eingeteilt werden. Im Laufe der vegetativen Entwicklung tritt die Pflanze von der juvenilen zur adulten Phase über. Diese ist durch äußerliche Veränderungen gekennzeichnet. Am wichtigsten ist jedoch, dass die Pflanze nun auf das Blühen induzierende Stimuli reagieren kann. Mit Beginn der Blüte werden dann die vegetativen Scheitelmeristeme, die die

Stammzellen der Pflanzen beherbergen, zu Infloreszenzmeristemen, und die Pflanze geht in die reproduktive Phase über. Zahlreiche miRNAs sind wichtiger Bestandteil der hierfür zuständigen regulatorischen Netzwerke.

Zucker-induzierte miRNA lässt Pflanzen altern

Beim Wechsel zwischen den Entwicklungsphasen spielt die miR156-Familie eine über Artengrenzen konservierte Rolle. Die Mitglieder dieser Familie regulieren die Expression von SPL-Transkriptionsfaktoren (SPL = SQUAMOSA PROMOTER-BINDING [SPB] PROTEIN-LIKE), die über die Aktivierung von miR172 und mehreren MADS-Box-Genen am Phasenwechsel und an der Blühkontrolle beteiligt sind (**Abb. 2**). Das in juvenilen Pflanzen hohe Expressionsniveau von miR156 sinkt mit dem entwicklungsbiologischen Alter der Pflanze. Dadurch wird mehr SPL-Protein produziert, und die Pflanze tritt irreversibel in die adulte Phase ein. In mehrjährigen Bäumen gibt es darüber hinaus nicht nur einen Gradienten von miR156- und SPL-Aktivität entlang der Hauptachse, sondern auch entlang aller seitlichen Zweige.

Die Abnahme von miR156 ist auf Glukose zurückzuführen, welche die Unterdrückung der Transkription der miRNA und den Abbau fertiger miR156-Transkripte unabhängig von der miRNA-Maschinerie reguliert. Mit zunehmender Blattoberfläche aufgrund des Pflanzenwachstums steigt die Photosyntheseleistung und damit die Glukoseproduktion. Der Zucker fungiert als mobiles Signal, dessen Aktivität hier den Übergang von juveniler zu adulter Phase fördert. Dieser Mechanismus konnte inzwischen in vielen Arten einschließlich des Blasenmützenmooses *Physcomitrella patens* nachgewiesen werden [2].

miR156 als Jungbrunnen?

Eine Überexpression von miR156 führt im Umkehrschluss zur „ewigen Jugend“ von Pflanzen, welche somit nie die adulte Phase erreichen. In *Zea mays* (Mais) sowie in *Panicum virgatum* (Chinaschilf) bewirkt die Über-

expression des Mais-miRNA-Gens *Corngrass1* (*Cg1*) aus der miR156-Familie auch in alten Pflanzen ein für juvenile Blätter typisches biochemisches Profil sowie eine entsprechende Morphologie und Zellidentität. Konkret erhöht *Cg1* den Stärkegehalt in Chinaschilf um 250 Prozent, während der Ligningehalt zurückgeht und die totale Biomasse der Pflanzen durch kontinuierliche Neubildung von Seitensprossen und Blättern zunimmt. Die so verbesserten Fermentationseigenschaften der Energiepflanze verringern die Notwendigkeit einer aufwendigen chemischen Vorbehandlung für die Verzuckerung. Da das hohe Niveau an *Cg1* außerdem die Ausbildung von Blüten in Chinaschilf verhindert, besteht nicht die Gefahr der Verbreitung transgener Pollen oder Samen [3].

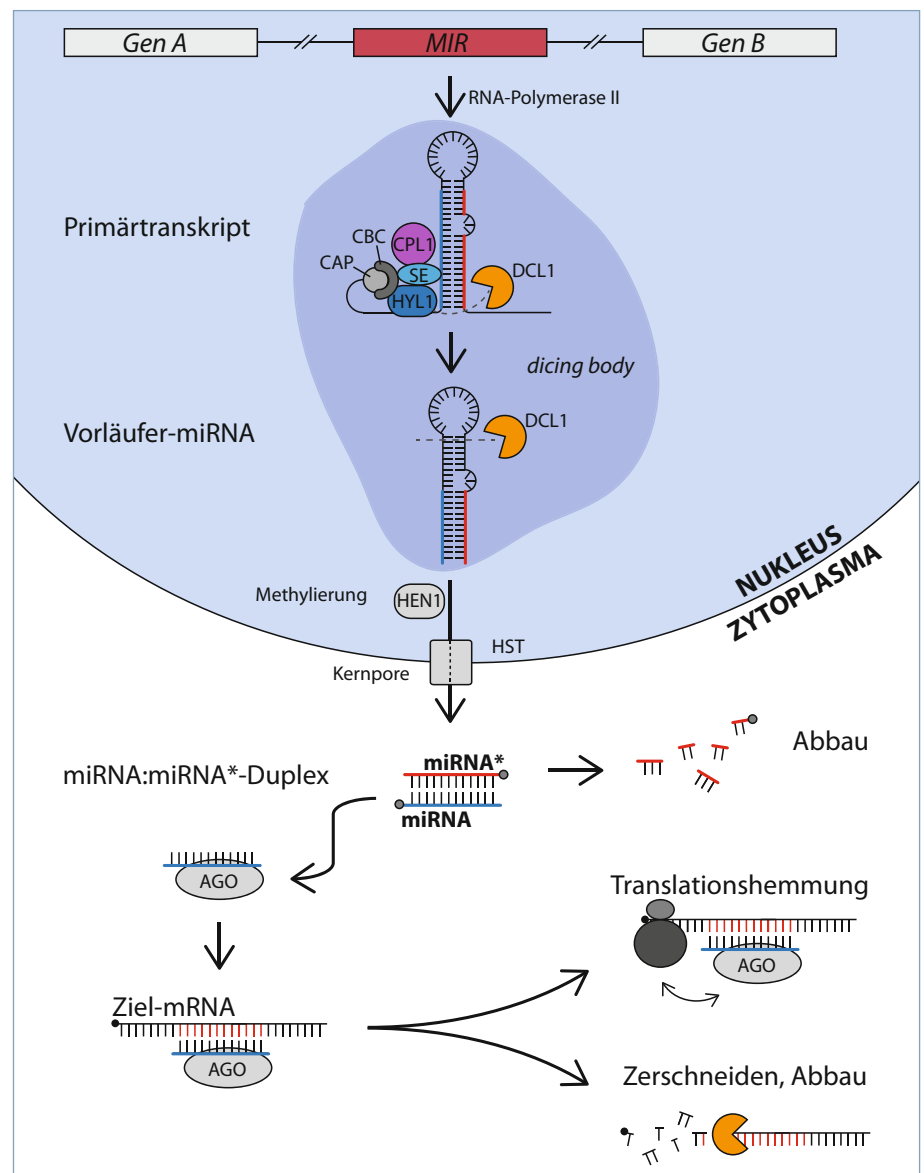
miR156 und miR172 regulieren die Blühzeit

Im Gegensatz zu miR156, deren Expression sich mit zunehmendem Alter der Pflanze verringert, steigt der Spiegel von miR172 mit der fortschreitenden Entwicklung der Pflanze an. miR172 fördert den Übergang zur adulten Phase und ist ein Antagonist der APETALA2 (AP2)-Transkriptionsfaktor-Familie, die in der Ackerschmalwand neben der Aufrechterhaltung von Stammzellidentität und Blütendifferenzierung unter anderem bei der Samenentwicklung eine Rolle spielt. In Mais geht die Zunahme von miR172 mit einer deutlichen Abnahme des AP2-Homologen *glossy15* (*gl15*) einher. In Übereinstimmung damit kann bei einem Fehlen von miR172 durch gesteigerte *gl15*-Aktivität der Beginn der reproduktiven Entwicklung verzögert und die Anzahl der gebildeten juvenilen Blätter erhöht werden [4].

Gleiches geschieht in der Ackerschmalwand, wo die Transkription von miR172 und von Blüh- und Blütenfaktoren wie *SOC1* und *AGAMOUS* durch AP2 unterdrückt wird, was die Entwicklung von Blüten und das Blühen selbst verhindert. Zusätzlich aktiviert AP2 miR156. Da diese über die SPLs ein negativer Regulator von miR172 ist, entsteht dadurch eine positive Rückkopplung. Dieses Element ist ein wichtiger Teil des regulatorischen Netzwerks, das den Übergang von der juvenilen zur adulten Phase mit dem Beginn des Blühens und der Blütendifferenzierung integriert [5].

miRNA und Blattmorphologie

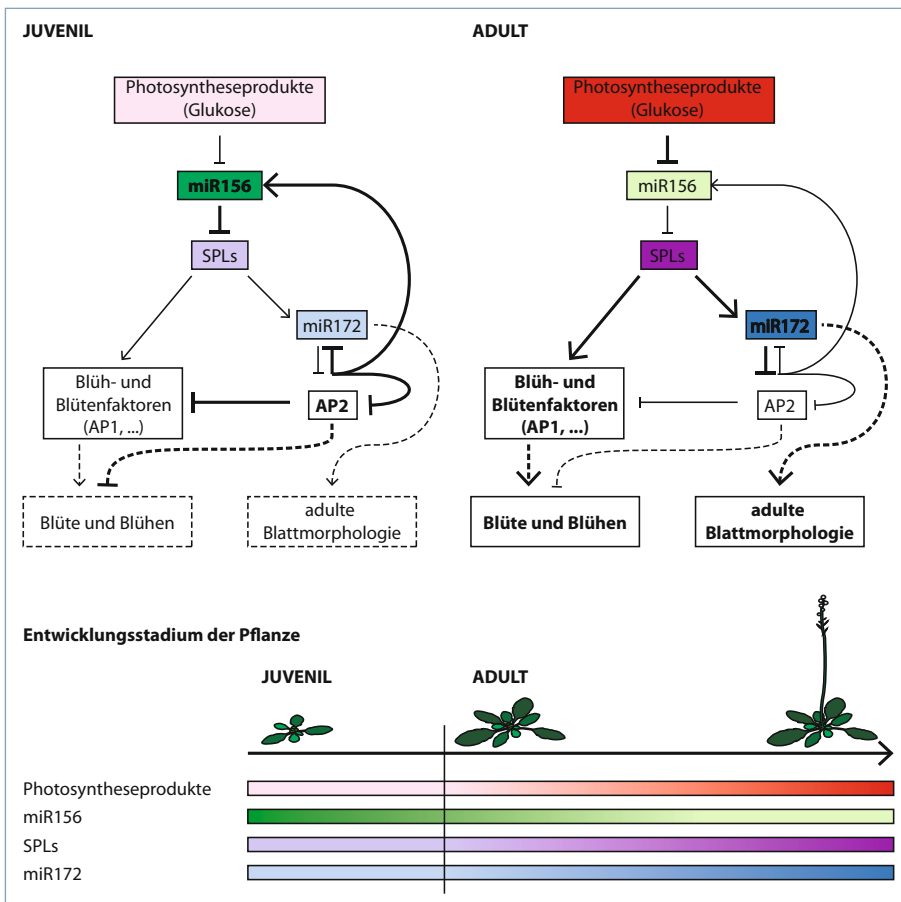
Die miRNAs spielen bei der Regulation der pflanzlichen Entwicklung nicht nur auf zeit-



▲ **Abb. 1:** Synthese von miRNAs. Das miRNA-Primärtranskript wird im Zellkern durch das Enzym DCL1 (DICER LIKE-1) und zahlreiche Kofaktoren zur Vorläufer-miRNA verarbeitet. Der reife miRNA-miRNA*-Duplex wird methyliert und in das Zytoplasma transportiert, wo der miRNA-Strang mit einem ARGONAUTE (AGO)-Protein den aktiven RNA-induced silencing complex (RISC) bildet. Dieser bindet zur miRNA komplementäre mRNA und ist für deren posttranslationale Kontrolle verantwortlich.

licher, sondern auch auf räumlicher Ebene eine wichtige Rolle. So reguliert die Aktivität von miR164 beispielsweise bei der Ackerschmalwand die Ausdehnung und Anzahl von Lateralmeristemen über die *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*)-Zielgene. Zusätzlich zu *CUP-SHAPED COTYLEDON 3* (*CUC3*) werden zur Bildung von Lateralmeristemen die redundanten Funktionen von *CUC1* und *CUC2* benötigt. Die Expression der *CUC1*- und *CUC2*-Transkriptionsfaktoren wird posttranskriptionell durch die teils redundanten, teils spezialisiert arbeitenden miR164-Gene *MIR164A*, *MIR164B* und

MIR164C reguliert. Ein Ausfall der miR164-abhängigen Kontrolle führt zur Bildung weit ausgedehnter Meristeme und zusätzlicher Seitentriebe [6]. Die Balance zwischen ko-exprimierter miR164a und *CUC2* beeinflusst außerdem die Entwicklung der Blattränder. Nachdem, zunächst unabhängig von *miR164a*, die Anzahl und Lokalisierung der Blattränder festgelegt wird, bestimmt die lokale Unterdrückung der *CUC2*-Aktivität durch miR164a, wie stark diese ausgeprägt werden. Je weniger miR164a und je mehr *CUC2* vorhanden sind, desto stärker gezähnt wird der Blattrand [7].



▲ **Abb. 2:** Die Rolle von miRNAs in der Pflanzenentwicklung. In juvenilen Pflanzen wird miR156 durch AP2 positiv reguliert und unterdrückt die Expression von SPL-Transkriptionsfaktoren. Gleichzeitig hemmt AP2 die miR172-Expression und verhindert die Aktivität von Blüh- und Blütenfaktoren. Mit vergrößerter Pflanzenoberfläche steigt die Glukoseproduktion durch Photosynthese, wodurch miR156 ab-, SPLs und miR172 hingegen zunehmen. Die Pflanze tritt irreversibel in die adulte Phase ein, was zu Veränderungen in der Blattmorphologie sowie dem Beginn der reproduktiven Entwicklung führt.

Eine Überexpression von *miR319* hingegen verursacht gekräuselte Blattränder und verbreiterte Blätter – sowohl in zwei- als auch einkeimblättrigen Pflanzen wie Reis. Die hochkonservierte *miR319*-Familie reguliert TCP-Transkriptionsfaktoren, die speziell die Morphogenese und das Wachstum von Blättern beeinflussen [8].

Auch *miR396* hat durch die Regulierung der Transkriptionsfaktor-Familie GROWTH-REGULATING FACTORS (GRF) Einfluss auf das generelle Blattwachstum. Mit zunehmendem Blattalter häuft sich *miR396* an, unterdrückt die *GRF*-Expression und verringert die Zellzahl in Blättern. Ab einem bestimmten Spiegel führt außerdem ein starker Überschuss von *miR396* *per se* zur Ausbildung nadelartiger Blätter [9].

Fazit

Die zeitliche und räumliche Feinregulierung der Genexpression mithilfe von miRNAs ist

folglich essenziell für eine reibungslose Entwicklung von Pflanzen und wichtiger Bestandteil komplexer Regulationsmechanismen. Das Wissen um die Rollen und Funktionsweisen von miRNAs ist untrennbar mit einem tieferen Verstehen der Entwicklung von Organismen verbunden. Zusätzlich kann es die Basis für anwendungsorientierte For-

schung in Nutzpflanzen sein. Für Reis wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Überexpression des *miR319*-Homologen zu erhöhter Kältetoleranz führt [8]. Ihr ubiquitäres Vorhandensein ebenso wie die relativ hohe Konservierung von miRNA-Regulationsmechanismen machen miRNAs daher zu wertvollen Werkzeugen auf dem Weg zur Verbesserung der ernährungsrelevanten und Wachstumseigenschaften von Nutzpflanzen. ■

Literatur

[1] Voinnet O (2009) Origin, biosynthesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669–687
 [2] Yu S, Cao L, Zhou C-M et al. (2013) Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *ELife*, doi: 10.7554/eLife.00269
 [3] Chuck GS, Tobias C, Sun L et al. (2011) Overexpression of the maize *Corngrass1* microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of switchgrass. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:17550–17555
 [4] Lauter N, Kampani A, Carlson S et al. (2005) *microRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9412–9417
 [5] Yant L, Mathieu J, Dinh TT et al. (2010) Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* 22:2156–2170
 [6] Raman S, Greb T, Peaucelle A et al. (2008) Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55:65–76
 [7] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A et al. (2006) The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2929–2945
 [8] Yang C, Li D, Mao D et al. (2013) Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ*, doi: 10.1111/pce.12130
 [9] Mecchia MA, Debernardi JM, Rodriguez RE et al. (2012) MicroRNA miR396 and *RDR6* synergistically regulate leaf development. *Mech Dev* 130:2–13

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Detlef Weigel
 Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie
 Abteilung für Molekularbiologie
 Spemannstraße 37–39
 D-72076 Tübingen
 Tel.: 07071-601-1411
 Fax: 07071-601-1412
 weigel@tue.mpg.de
 www.eb.tuebingen.mpg.de
 www.weigelworld.org

AUTOREN



Detlef Weigel
 Jahrgang 1961. 1986 Diplom in Biologie, Universität zu Köln. 1988 Promotion, Universität Tübingen. 1989–1993 Postdoktorand, California Institute of Technology, Pasadena, USA. 1993–2002 Assistant und Associate Professor am Salk Institute, La Jolla, CA, USA. Seit 2002 Direktor der Abteilung Molekularbiologie am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen.



Patricia Lang
 Jahrgang 1987. 2010 Master in Pflanzen- und Waldbiotechnologie, Umeå Plant Science Center, Umeå Universität, Schweden. Seit 2012 Promotion, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen.