



Bernd Müller-Röber

5. Einzelzell-Transkriptomanalyse in Pflanzen

In:

Walter, Jörn / Schickl, Hannah (Hrsg.): Einzelzellanalyse in Forschung und Medizin : eine Stellungnahme der interdisziplinären Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht.

ISBN: 978-3-939818-84-7

Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, 2019. S. 55-59

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:kobv:b4-opus4-32836](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:b4-opus4-32836)

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz zur Verfügung gestellt.



5. EINZELZELL-TRANSKRIPTOMANALYSE IN PFLANZEN

5.1 PFLANZLICHE EINZELZELL-TRANSKRIPTOME

In der Pflanzenforschung wird die Einzelzell-Transkriptomanalyse (single-cell RNA-seq, scRNA-seq, siehe Walter/Gasparoni, Kapitel 1) gerade erst etabliert, gewinnt aber schnell an Bedeutung. Im Unterschied zu tierischen Zellen besitzen Pflanzenzellen eine recht starre Zellwand. Diese besteht aus unterschiedlichen Kohlenhydratpolymeren mit einer variablen Zusammensetzung, je nach Zelltyp und Differenzierungszustand. Dazu gehören Cellulose, Hemicellulose und weitere Komponenten, unter anderem in die Zellwand integrierte Proteine. Die Zellen bilden einen stabilen Gewebsverbund und müssen vor einer typischen Einzelzell-Transkriptomanalyse zunächst einmal voneinander getrennt werden. Dies geschieht durch die Behandlung der pflanzlichen Gewebe mit unterschiedlichen Enzymen, die die Zellwand abbauen; dabei entstehen sogenannte Protoplasten (also Pflanzenzellen ohne Zellwand), die dann einer Einzelzell-Transkriptomanalyse unterzogen werden. Da die Herstellung der Protoplasten selbst bereits zu einer Veränderung der Transkriptionsmuster führen kann, müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt werden, zum Beispiel Vergleiche mit bereits bekannten Genexpressionsmustern von unbehandelten Pflanzenzellen, um herauszufinden, ob sich diese Muster auch bei den Protoplasten erkennen lassen.

Die bisher publizierten Arbeiten zur Einzelzell-Transkriptomanalyse in Pflanzen wurden an Wurzeln der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) durchgeführt (Denyer et al., 2019; Jean-Baptiste et al., 2019; Ryu et al., 2019; Shulze et al., 2019; Turco et al., 2019). Sie stellen ein seit Langem untersuchtes und daher inzwischen gut verstandenes Modellsystem zur Erforschung von Entwicklungsprozessen in Pflanzen dar. Zahlreiche Gene, die die Entwicklung der pflanzlichen Wurzel steuern, sowie ihre Reaktion auf Umwelteinflüsse sind bekannt. Diese Forschung hat auch zur Identifizierung von Markergenen geführt, die nur in bestimmten Zelltypen der Wurzel aktiv sind, zum Beispiel in Stammzellen oder in haarbildenden Zellen der Wurzelepidermis. Die mittels Einzelzell-Transkriptomanalyse erhaltenen Expressionsdaten konnten daher mit früher gewonnenen Genaktivitätskarten der Wurzel verglichen und damit für Gene, deren Expression in unterschiedlichen Zellen bereits bekannt war, validiert werden. In den bisher publizierten Studien gelang es, die Transkriptome von jeweils etwa 400 bis 12.000 einzelnen Zellen zu analysieren.

Die Einzelzell-Transkriptomanalyse in Pflanzen hat bisher unter anderem zu folgenden Erkenntnissen geführt:

- scRNA-seq erfasst raumzeitliche Informationen zur Genexpression mit hoher Präzision;
- scRNA-seq erlaubt die Identifizierung von neuen Regulatoren für Prozesse in einzelnen Zelltypen;
- mittels scRNA-seq lassen sich regulatorische Pfade der zellulären Entwicklung mit höherer Genauigkeit untersuchen, als dies bisher mit anderen Methoden möglich war,
- und es lassen sich bisher nicht bekannte Subtypen von Zellen aufgrund ihrer spezifischen Genexpressionsmuster identifizieren.

In den bisherigen scRNA-seq-Studien an Pflanzen wurden neben Wildtyp-Pflanzen auch bereits Mutanten bzw. transgene Pflanzen mit Defekten in der Wurzelentwicklung untersucht (Ryo et al., 2019; Turco et al., 2019) sowie die Effekte von externen Faktoren wie Verfügbarkeit von Saccharose im Wachstumsmedium (Shulse et al., 2019) oder Hitzestress (Jean-Baptiste et al., 2019) analysiert. Pflanzen – als ortsgebundene Organismen – können sich den Umweltbedingungen, denen sie ausgesetzt sind, nicht durch Mobilität entziehen. Jedoch besitzen sie eine ausgeprägte Entwicklungsplastizität, d.h. sie können sich in vielfältiger Weise durch Veränderung ihres Wachstums und ihrer Morphologie an unterschiedliche Umweltsituationen anpassen, und zwar ohne Veränderungen ihrer genetischen Konstitution (Sequenz der Erbinformation) (Bradshaw, 2006; Salazar-Henao et al., 2016). Diese unterschiedlichen Anpassungsszenarien und die ihnen zugrunde liegenden Gene haben sich im Laufe der Evolution etabliert und zur Anpassung der Pflanzen an bestimmte ökologische Nischen geführt. Die Einzelzell-Transkriptomanalyse wird es in Zukunft erlauben, die diesen komplexen – und variablen – Entwicklungsprozessen zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen mit deutlich höherer Detailtreue als bisher zu analysieren.

5.2 TRANSKRIPTOMANALYSEN MITTELS ISOLIERTER ZELLKERNE

Wie oben erläutert, erfordert die Einzelzell-Transkriptomanalyse in Pflanzen bisher noch die Protoplastierung pflanzlicher Gewebe. Da die Zusammensetzung der Zellwand zwischen unterschiedlichen Zellen einer Pflanze bzw. Zellen in verschiedenen Pflanzen variiert, und darüber hinaus durch Umwelteinwirkungen

moduliert wird, müssen zunächst jeweils geeignete Protoplastierungsprotokolle entwickelt werden. Allein dies kann bereits viel Zeit beanspruchen, was den Zugang zu Einzelzell-Transkriptomen in nicht zu vernachlässigender Weise erschwert. Eine mögliche Alternative könnte darin bestehen, anstelle von Protoplasten als Untersuchungsobjekt direkt auf die Transkripte in den Zellkernen der untersuchten Pflanzen und ihren Geweben zuzugreifen. Dies hätte zum einen den Vorteil, dass nicht für jede Pflanze und jedes Gewebe genau adaptierte Protoplastierungsprotokolle entwickelt werden müssten. Zum anderen liegen bereits gut etablierte Protokolle für eine rasche und unkomplizierte Anreicherung von Zellkernen aus komplexen pflanzlichen Geweben oder Organen vor. Mithilfe solcher Methoden könnte es in naher Zukunft möglich werden, die Einzelzell-Transkriptome auch solcher Pflanzen zu analysieren, die bisher nicht zu den typischen Modellsystemen zählen, aber die in ökologischer Hinsicht oder in Bezug auf ihre speziellen physiologischen oder biotechnologischen Eigenschaften von besonderer Relevanz sind. Zum Beispiel ist es prinzipiell möglich, Zellkerne quasi „en bloc“ aus einem Organ (mit seinen unterschiedlichen Zelltypen) zu isolieren, um sie anschließend weiteren Analysen zu unterziehen. Bei dieser Methode kann gänzlich ohne transgene Pflanzen gearbeitet werden. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, gezielt Zellkerne aus bestimmten Zelltypen zu isolieren. Dazu ist es notwendig, Zellkerne entsprechender Zelltypen zu markieren. Dies kann unter anderem dadurch erreicht werden, dass die Zellkerne mittels bestimmter Proteine, zum Beispiel dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), versehen werden (dazu werden die Pflanzen mit geeigneten Genkonstruktionen gentechnisch modifiziert). Auf diese Weise gekennzeichnete Zellkerne können dann mit geeigneten biochemischen Methoden, zum Beispiel mittels Immunpräzipitation unter Verwendung von Antikörpern, die GFP erkennen, oder durch FACS („fluorescence-activated cell sorting“), isoliert und anschließend einer Transkriptomanalyse unterzogen werden. Allerdings werden dabei die Genexpressionsmuster in anderen Zellen, deren Zellkerne nicht spezifisch markiert sind, nicht erfasst, wodurch dem Experimentator möglicherweise wichtige Informationen für eine umfassendere Interpretation zellulärer Prozesse in Gewebeverbänden entgehen.

5.3 ZUKÜNFTIGE FORSCHUNG

Künftige wissenschaftliche Fragestellungen, die mithilfe der Einzelzell-Transkriptomanalyse in der Pflanzenforschung angegangen werden können, sind äußerst vielfältig und zum jetzigen Zeitpunkt nur ansatzweise abschätzbar. Beispiele sind, neben vielen anderen:

1. die Analyse der Genexpressionsmuster in Pflanzen, deren Wachstum und Entwicklung sich aufgrund von Umwelteinwirkungen verändern;
2. die Entschlüsselung von genregulatorischen Netzwerken mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision – davon wird in besonderem Maße auch die Bioinformatik profitieren.
3. Durch den Vergleich der Einzelzell-Genexpressionsmuster in diversen Pflanzen wird es möglich werden, die Evolution der Pflanzen und deren Diversifizierung und Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen auf molekularer Ebene besser zu verstehen.
4. Zunehmend gewinnen synthetisch-biologische Ansätze auch in Pflanzen an Bedeutung. Zweifelsohne werden Einzelzell-Transkriptomanalysen erheblich dazu beitragen, die Variabilität zwischen Zellen hierbei besser zu verstehen. Dadurch wird es möglich werden, die Robustheit synthetisch-biologischer Modifikationen in Pflanzen auf eine solidere Basis zu stellen.

5.4 FAZIT

Im Bereich der Pflanzenforschung wurde über Einzelzell-Transkriptomanalysen bisher ausschließlich für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* in wissenschaftlichen Publikationen berichtet, und hier lediglich in Hinblick auf Prozesse in der Wurzel. Somit stehen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine umfangreichen Datensätze für eine weitergehende Analyse durch die wissenschaftliche Gemeinschaft zur Verfügung. Jedoch kann trotz der zurzeit noch geringen Anzahl an Publikationen in diesem Forschungsgebiet davon ausgegangen werden, dass die Einzelzell-Transkriptomanalyse einen wesentlichen Einfluss auf die zukünftige Pflanzenforschung haben wird. Dies betrifft in besonderer Weise auch die Forschung an für die menschliche und tierische Ernährung wichtigen Kulturpflanzen. Besonders interessant ist dabei, dass nicht nur „traditionelle“ Kulturpflanzen in die Analysen einbezogen werden können, sondern auch solche, die bisher in der Forschung eher unterrepräsentiert sind und noch einer weiteren züchterischen Optimierung in den kommenden Jahren bedürfen. Hierfür sollten hinreichend Forschungsmittel zur Verfügung gestellt werden.

5.5 LITERATUR

Bradshaw, A. D. (2006): Unravelling phenotypic plasticity – why should we bother? In: *New Phytol* 170(4): 644–648.

Denyer, T. et al. (2019): Spatiotemporal developmental trajectories in the arabidopsis root revealed using high-throughput single-cell RNA sequencing. In: *Dev Cell* 48(6): 840–852.e5.

Jean-Baptiste, K. et al. (2019): Dynamics of gene expression in single root cells of arabidopsis thaliana. In: *Plant Cell* 31(5): 993–1011.

Ryu, K. H. et al. (2019): Single-cell RNA sequencing resolves molecular relationships among individual plant cells. In: *Plant Physiol* 179(4): 1444–1456.

Salazar-Henao, J. E. et al. (2016): The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. In: *Development* 143(11): 1848–1858.

Shulse, C. N. et al. (2019): High-throughput single-cell transcriptome profiling of plant cell types. In: *Cell Rep* 27(7): 2241–2247.e4.

Turco, G. M. et al. (2019): Molecular mechanisms driving switch behavior in xylem cell differentiation. In: *Cell Report* 28 (2): 342–351.e4.