

Diss. Nr.: 11616

**Circadian regulierte Transkripte aus *Sinapis alba*
und ihre funktionelle Analyse in *Arabidopsis thaliana***

A B H A N D L U N G

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Christian Heintzen

Diplom-Biologe, Christian-Albrechts-Universität Kiel
geboren am 10. Juli 1963
in Kiel, Deutschland

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. K. Apel, Referent
Prof. Dr. P. Matile, Korreferent
Dr. D. Staiger, Korreferentin

1996

Zusammenfassung

In der Langtag-Pflanze *Sinapis alba* L. sollten circadiane Phänomene auf molekularer Ebene untersucht werden. Dabei wurden mRNAs gesucht, deren Konzentrationen im Tagesverlauf oszillieren. Gleichzeitig sollten sich die Transkriptmaxima deutlich von denen bekannter, oszillierender Photosynthesetranskripte unterscheiden, um neuartige, rhythmisch organisierte Phänomene molekular zu untersuchen. Ein differentielles Screening führte zur Isolierung von zwei unterschiedlichen circadian regulierten Transkripten mit maximaler Konzentration am subjektiven Abend. Sie wurden *Sagrp* (*Sinapis alba* glycine-rich protein) und *Saglp1* (*Sinapis alba* germin-like protein) benannt.

Im Licht-Dunkelwechsel gezogene Pflanzen zeigen im Northern Blot phasenverschobene Maxima der beiden Transkriptgruppen *Sagrp* und *Saglp*. Die *Sagrp*-Transkripte erreichen ihr Maximum zwischen 8 und 12 Stunden nach Belichtungsbeginn, also zur „Zeitgeber“-Zeit ZT8 bis ZT12 mit einem Minimum um ZT20. Transkripte der *Saglp*-Gruppe erreichen ihr Maximum etwas später, zwischen ZT12 und ZT16 mit einem Minimum um ZT0.

Werden Pflanzen im Licht-Dunkelwechsel angezogen und anschließend unter konstanten Lichtbedingungen weiterkultiviert, finden weiterhin rhythmische Transkriptschwankungen statt. Zieht man dagegen Pflanzen von Anbeginn unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen an, sind keine synchronisierten mRNA-Oszillationen feststellbar. In Pflanzen, die unter konstantem Licht aber rhythmischem Temperaturwechsel angezogen werden, beobachtet man oszillierende mRNA Konzentrationen in beiden Transkriptgruppen. Offensichtlich muß die endogene Uhr durch einen äußeren Zeitgeber induziert und/oder synchronisiert werden. Temperatur kann also als alternativer Zeitgeber zu Licht fungieren. Deutliche Unterschiede finden sich in dem räumlichen Expressionsmuster beider Transkripte. Die *in situ* Hybridisierung zeigt, daß die *Sagrp*-Transkripte hauptsächlich in jungen Geweben von Blättern und Blattprimordien sowie den Meristemen des Apex und Kambialzylinders, die *Saglp1*-Transkripte dagegen in Epidermis und Schwammparenchym junger Blätter und der Rinde des Sprosses exprimiert werden. Offensichtlich werden beide Transkripte in verschiedenen Organen zeitlich synchron reguliert, da in allen untersuchten Geweben die Hybridisierungssignale nur im circadianen Maximum, nicht jedoch im Minimum beobachtet wurden.

Zu beiden Transkripten wurden die entsprechenden cDNAs isoliert. Innerhalb der *Sagrp*-Gruppe lassen sich zwei nahe verwandte Klassen unterscheiden, *Sagrp1* und *Sagrp2*. Für jede dieser Klassen liegen cDNAs vor, die ungespleißten oder partiell gespleißten prä-mRNAs entsprechen. Die vollständig prozessierten Transkripte kodieren für Proteine von 16 kDa, mit N-terminaler RNA-Bindungsdomäne und glycinreichem C-Terminus. Beide Proteine weisen Homologien zu einem ABA-induzierten, glycinreichen Protein des Maisembryos auf. Homologien findet man weiterhin zu hnRNP A1 und Nucleolin aus Säugern, welche an der prä-mRNA- bzw. prä-rRNA-Prozessierung beteiligt sind.

Ein völlig andersartiges Protein von 22 kDa wird von den *Saglp1*-Transkripten kodiert. Ein typisches N-terminales ER-Signalpeptid sowie eine mögliche N-Glykosylierungsstelle sind enthalten. Das Protein zeigt Homologien zu Germin, einer Oxalatoxidase aus Weizen, welche im Keimungsstadium induziert wird.

Mit Hilfe spezifischer Antiseren konnten im Western Blot nur sehr schwache Proteinfluktuationen der *SaGRP*-Proteine im Licht-Dunkelwechsel nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen sind die Konzentrationen der *SaGLP1*-Proteine konstant. Immunogoldmarkierungen weisen die *SaGRP*-Proteine im Zellkern nach, die *SaGLP1*-Proteine sind dagegen in den Primärwänden einiger junger Blattzellen lokalisiert. Um weitere Hinweise über die funktionelle Relevanz der Transkriptschwankungen zu erhalten, wurde ein transgener Ansatz in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gewählt. Die homologen cDNAs wurden zwischen den konstitutiv und ubiquitär exprimierten Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)-Promotor und CaMV-Terminator in Sense- oder Antisense-Orientierung kloniert. Konzentrationsschwankungen der endogenen Transkripte sollten auf diese Weise zu allen Zeitpunkten entweder durch konstitutive Überexpression der Transkripte oder starke Verminderung der Transkriptmenge maskiert werden. Transgene Pflanzen mit drastisch erhöhten und reduzierten Transkriptmengen konnten auf diese Weise isoliert und auf veränderte rhythmische Phänomene, molekularer oder physiologischer Natur, untersucht werden. Im Fall der *Atglp1*-Transkripte konnte ein Einfluß auf physiologisch gemessene Parameter sowie andere circadian regulierte Transkripte nicht beobachtet werden. Wahrscheinlich kodieren diese Transkripte nicht für zentrale Bestandteile einer inneren Uhr. Ihre Transkriptoszillationen sind anscheinend oszillatortriebene Zeigerrhythmen.

In den transgenen *Atgrp1a*-Überexprimierern dagegen sind die *Atgrp1a*-Transkripte negativ autoreguliert und damit grundsätzlich zur Erzeugung selbsterregter Oszillationen befähigt. Im Gegensatz zu den Senfproteinen unterliegen die *AtGRP*-Konzentrationen deutlichen circadianen Schwankungen. Damit stehen diese Genprodukte sehr wahrscheinlich dem rhythmusgenerierenden Prozeß nahe oder sind sogar selbst Bestandteil eines rhythmusgebenden Prozesses.

Abstract

To analyze rhythmic phenomena at the molecular level mRNAs whose concentration fluctuates as a function of time of day were isolated in the long-day plant *Sinapis alba*. Differential screening was used to isolate transcripts that are preferentially expressed in the evening and thus might be involved in rhythmic cellular phenomena other than photosynthesis. Two different groups of transcripts, *Sagrp* (*Sinapis alba* glycine-rich protein) and *Saglp* (*Sinapis alba* germin-like protein), both controlled by a circadian rhythm, have been isolated.

RNA blot analysis verified that transcript levels oscillate in plants grown in light/dark cycles with different maxima for the *Sagrp* and *Saglp* transcripts. The *Sagrp* transcripts peak between "Zeitgeber" (ZT) time ZT8 and ZT12 (8-12 h after onset of illumination) and have minima around ZT20 whereas the *Saglp* transcripts peak later in the evening between ZT12 and ZT16 and have minima around ZT0. Both transcripts continue to oscillate in plants shifted from light/dark cycles to continuous light. No synchronous mRNA oscillations are found in plants grown from seed in constant light at constant temperature, suggesting that the clock has to be entrained initially. In contrast, when plants grown in constant light are exposed to rhythmic temperature shifts, oscillations of steady-state mRNA levels are induced, indicating that temperature acts as an alternative external stimulus (zeitgeber) other than light to entrain the clock. *In situ* hybridization revealed strong differences in the spatial expression of both transcripts. Whereas the *Sagrp* transcripts are predominantly expressed in meristematic and growing tissue with strong expression in the leaf primordia of the shoot apex, the procambial strands, cambium, and all cell layers of young leaves, the *Saglp* transcripts are expressed in the epidermis and spongy parenchyma of young leaves and the cortex of stems and petioles. Strong signals are observed in these tissues during the circadian maximum. In contrast, little or no signal is found on all tissue sections isolated at the circadian minimum suggesting that the oscillator(s) regulating *Sagrp* and *Saglp* transcript fluctuations operate(s) synchronously in different organs.

Within the *Sagrp* group two closely related transcripts, *Sagrp1* and *Sagrp2*, were isolated. For each of these transcripts cDNAs were isolated corresponding to unspliced pre-mRNAs or to transcripts generated by the use of a cryptic 5' splice site. The cDNAs corresponding to the fully spliced transcripts encode proteins of 16 kDa, each containing

a putative N-terminal RNA recognition motif and a C-terminal region rich in glycine. The predicted proteins show strong homology to an abscisic acid (ABA)-inducible glycine-rich protein from maize embryos and to the mammalian RNA-binding protein A1 of the hnRNP complex involved in pre-mRNA splicing. Furthermore, there is strong homology to several mammalian nucleolins which are, as major proteins of the nucleolus, involved in pre-rRNA processing.

The cDNA *Saglp1* encodes a different protein of 22 kDa, with an N-terminal signal sequence and an N-linked glycosylation motif. The protein shows homology to germin, an oxalate oxidase that is expressed in wheat embryos after onset of germination. The *SaGRP* protein fluctuates with a very low amplitude over light/dark cycles whereas the *SaGLP1* protein remains constant under these conditions. Immunogold labeling shows that the *SaGRP* protein is located within the nucleus of the investigated meristematic cells of young leaves whereas the *SaGLP1* protein is associated with primary cell walls.

To elucidate the functional significance of the transcript oscillations a transgenic approach was chosen in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* homologs of the mustard cDNAs, *Atgrp1* and *Atglp1*, were cloned downstream of the constitutively and ubiquitously expressed Cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter in sense or antisense orientation to mask rhythmic transcript fluctuations by either constitutive overexpression of the transcripts or downregulation of their transcript levels at all timepoints. Transgenic plants with enhanced or reduced transcript levels for both transcripts were isolated and further characterized for their rhythmic behavior on the physiological and molecular level. Thus far in transgenic *Atglp1* plants, no influences on other investigated circadian regulated transcripts or physiological parameters, such as leaf movement rhythm, were observed. This indicates that probably the *Saglp1* respectively *Atglp1* transcripts are not part of the cellular clock itself but act downstream as molecular hands of the clock. In contrast, the *Sagrp* respectively *Atgrp* transcripts are likely more central to the oscillation-generating process or even part of a central oscillator itself, as the overexpressing transgenic plants show negative autoregulation of the endogenous *Atgrp1* transcript.