



Doctoral Thesis

Isolierung und Charakterisierung von Arabidopsis-Mutanten mit veränderten circadianen Rythmen

Author(s):

Dreesmann, Daniel C.

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003881634> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. Nr.:13415

**Isolierung und Charakterisierung
von *Arabidopsis*-Mutanten mit
veränderten circadianen Rhythmen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Daniel C. Dreesmann

Diplom-Biologe, Georg-August-Universität Göttingen
geboren am 19. September 1967
in Bonn, Deutschland

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Klaus Apel, Referent
Prof. Dr. Nikolaus Amrhein, Korreferent

1999

Zusammenfassung

Nahezu alle Lebewesen besitzen eine „innere Uhr“, mit deren Hilfe sie Stoffwechsel, Fortpflanzung oder Verhaltensweisen optimal an die auf der Erde vorhandenen geophysikalischen Zyklen wie den Tag-Nacht-Wechsel oder die Jahreszeiten anpassen können. Die durch die „innere Uhr“ kontrollierten Prozesse mit einer Periodenlänge von 24 Stunden werden als circadiane Rhythmen bezeichnet. Zu den wichtigsten Eigenschaften dieser endogen gesteuerten Phänomene zählt, dass sie auch unter konstanten Umweltbedingungen weiter ablaufen, wobei die Periodenlängen dann um bis zu mehrere Stunden von der ursprünglichen Tageslänge abweichen können.

Obwohl es die rhythmischen Blattbewegungen von Pflanzen waren, welche erstmals auf das Vorhandensein einer „inneren Uhr“ hinwiesen, ist im Vergleich zu anderen Untersuchungssystemen wie *Neurospora crassa* und *Drosophila melanogaster* weit weniger darüber bekannt, wie bei ihnen die biologische Zeitmessung auf molekularer Ebene erfolgt. Mit Hilfe von Mutanten gelang es dort, Gene zu klonieren, die Bestandteile des zentralen Oszillators der „inneren Uhr“ sind. Lange Zeit stand bei Pflanzen jedoch kein geeigneter Modellorganismus für die Suche nach Genen zur Verfügung, die unmittelbar an der Erzeugung circadianer Rhythmen beteiligt sind. Mit *Arabidopsis thaliana* lassen sich Screening-Verfahren nach Mutanten jedoch leicht durchführen. Aus diesem Grund sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Vorteile dieser Pflanze genutzt werden, um Mutanten mit veränderten circadianen Rhythmen zu isolieren.

Zunächst wurde deshalb ein gut handhabbares Screening-Verfahren entwickelt, welches die Tatsache ausnutzt, dass auch der Transkriptgehalt zahlreicher pflanzlicher Gene im Tagesverlauf rhythmische Schwankungen aufweist. Nahezu 2000 mit EMS mutagenisierte Einzelpflanzen wurden dann in bezug auf den Transkriptgehalt des circadian regulierten Gens *Atgrp7* untersucht. Für jede Pflanze mussten hierzu die vorhandenen Transkriptmengen im circadianen Maximum und circadianen Minimum mittels Northern Blot analysiert und mit dem Minimum-Maximum-Verhalten von Wildtyppflanzen verglichen werden. Dabei konnten zwei Mutanten isoliert werden, die durch ihren veränderten „molekularen Phänotyp“ auffielen.

Die weitere molekularbiologische Charakterisierung ergab, dass in beiden Fällen neben der Transkriptszillation von *Atgrp7* auch andere circadian regulierte Gene in derselben Weise verändert sind. Während Mutante 1203 beispielsweise im Dauerlicht eine um drei Stunden verkürzte Periodenlänge aufweist, ist bei Mutante 1054 das circadiane Maximum um mehrere Stunden in den Abend verschoben. Eine erste physiologische Charakterisierung zeigte, dass bei beiden Mutanten die photoperiodische Kontrolle des Blühbeginns in unterschiedlicher Weise verändert ist. Während Mutante 1054 unter Langtagbedingungen etwas früher als der Wildtyp blüht, lassen sich zwischen Mutante 1203 und Kontrollpflanzen dramatische Unterschiede beobachten, wobei diese Mutante wesentlich später mit der Blütenbildung beginnt. Bei beiden Mutanten sind mehrere „Output“-Wege der „inneren Uhr“ verändert, so dass davon auszugehen ist, dass Gene

getroffen wurden, die an der Synchronisation der „inneren Uhr“ mit der Aussenwelt beteiligt sind. Beide Mutanten bieten somit eine Möglichkeit, durch weitere Experimente noch unbekannte Bestandteile der „inneren Uhr“ von *Arabidopsis* identifizieren zu können.

Abstract

Almost all organisms possess an internal timekeeper, the circadian clock, which allows an optimal coordination of metabolism, reproduction or behavior with the geophysical cycles on earth such as the day and night cycle or the seasons. Rhythmic phenomena with a period length of approximately 24 hours are referred to as circadian rhythms. One of their most important characteristics is that they persist even under constant environmental conditions but with period lengths deviating up to several hours from a 24 hour cycle.

Although it was the rhythmic leaf movements of plants which first suggested the existence of an endogenous timekeeper, far less is known about how the plant circadian clock operates at the molecular level. In *Neurospora crassa* and *Drosophila melanogaster* for example, mutants have already helped to clone genes which are part of the central oscillator of their circadian clocks. For plants however, a model organism has not been available until recently, when *Arabidopsis thaliana* became the organism of choice for mutant analyses. It was the aim of this project to use the advantages of this plant to isolate mutants with altered circadian rhythms.

Therefore a screening protocol was established which was based on the observation that transcripts of numerous plant genes undergo rhythmic circadian oscillations. Almost 2000 EMS-mutagenized plants were subjected to a so-called “brute force approach” with the expression of the circadian gene *Atgrp7* being used as a “molecular phenotype”. Each plant was analyzed by Northern blotting at the circadian minimum and the circadian maximum. The transcript abundance at these two time points was compared with that of wildtype controls. Two mutants were isolated according to their strikingly different “molecular phenotype”.

The molecular characterization of both mutants revealed that altered rhythmic transcript oscillations are not only observed for *Atgrp7* but also for other circadian genes. Under continuous illumination, the period length of mutant 1203 is two to three hours shorter than wildtype, whereas the circadian maximum of mutant 1054 is shifted by several hours towards midnight. A first analysis at the physiological level showed that flowering time is also altered in both mutants. Under long days, mutant 1054 flowers slightly earlier than the controls. A more severe effect is observed for mutant 1203 which flowers much later than wildtype.

Both mutants are altered in more than one circadian output pathway suggesting that upstream processes are affected which are involved in the entrainment of the circadian clock to the environment. Further experiments with these mutants may lead to the identification of yet unidentified components of the *Arabidopsis* circadian clock.