

Am Puls des Lebens

Biologische Zeitmessung bei *Arabidopsis thaliana*

Mensch, Tier und Pflanze haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, die ihr Verhalten, ihren Stoffwechsel und ihre Entwicklung so steuern, dass diese synchron zu den 24-h-Zyklen der Umwelt ablaufen. Die Prozesse werden nicht durch den Licht-Dunkel-Wechsel selbst gesteuert. Stattdessen misst eine innere Uhr die Länge des Tages und organisiert den Tagesablauf eines Organismus dadurch, dass bestimmte Gene zu einer definierten Tageszeit abgelesen werden und damit die entsprechenden Genprodukte zu einer bestimmten Zeit aktiv sind [1, 2].

Da die Tageslänge sich im Laufe des Jahres systematisch ändert, kann die innere Uhr auch als Kalender dienen. Viele Pflanzen bestimmen die optimale Jahreszeit zur Blüte und zur Samenproduktion mit Hilfe der inneren Uhr, ein Phänomen, das als photoperiodische Blühinduktion bezeichnet wird [3].



Dorothee Staiger

In Zeiten, in denen Fernreisen nach Amerika oder Asien für uns alltäglich geworden sind, ist der Jet lag ein bekanntes Phänomen. Er entsteht dadurch, dass unsere körpereigene Uhr aus dem Takt gerät. Diese innere Uhr organisiert den Tagesablauf unseres Körpers, so dass bestimmte molekulare und biochemische Prozesse und Verhaltensmuster mit einem 24-h-Rhythmus ablaufen, also jeweils zu den optimalen Tageszeiten an- und abgeschaltet werden. Man spricht

auch von einer circadianen Rhythmik, von lat. *circa* = etwa und *dies* = Tag.

Eine besondere Bedeutung kommt der inneren Uhr bei Pflanzen zu: aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen gezwungen, sich fortlaufend auf wechselnde Bedingungen rasch einzustellen. Ein wichtiger Standortfaktor für Pflanzen ist das Licht: Die Energiegewinnung mittels Photosynthese, d.h. die Umwandlung der Energie des Sonnenlichts in chemische Energie in Form von Zuckern, läuft nur bei ausreichender Beleuchtung ab. Andererseits ist zu viel Licht oder ein zu hoher UV-Anteil schädlich.

Genes Around the Clock

Die innere Uhr versetzt die Pflanzen in die Lage, sich auf die täglichen Phasen von Licht und Dunkelheit vorzubereiten anstatt nur passiv auf sie zu reagieren. Nach Vorliegen der Genomsequenz der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* war es möglich, systematisch zu untersuchen, welche Gene zu welcher Tageszeit aktiv sind: Dazu wurden DNA Microarrays ein-

gesetzt, die Sonden für ca. 8.000 der 25.000 Gene enthalten. Diese wurden mit fluoreszenzmarkierten Proben von RNA hybridisiert, die aus Pflanzen isoliert wurde, die rund um die Uhr im 4-h-Takt geerntet worden waren [4]. So konnte für jedes Gen ein Stundenplan seiner maximalen Expression aufgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass Gene für bestimmte Funktionen unter Kontrolle der inneren Uhr jeweils zu einer bestimmten Phase des Tag-Nacht-Zyklus exprimiert werden (Abb. 1): Beispielsweise fängt die Synthese von Proteinen für die Absorption des Lichts bei der Photosynthese an, bevor die Sonne aufgeht, damit die Pflanze den ersten Sonnenstrahl bereits effizient ausnutzen kann.

Die Gene für Proteine zur Umsetzung der photosynthetischen Assimilate sind später am Tag aktiv, Gene für den Stärkeabbau mitten in der Nacht, wenn die Pflanze auf den Abbau von Reservestoffen angewiesen ist. Gene für das Zellwachstum werden abends exprimiert. Jeweils am Ende der Nacht werden Gene aktiviert, die für die Produktion von UV-



Schutzpigmenten codieren, die in die äußerste Zellschicht eingelagert werden und als eine Art Sonnencreme wirken [4]. Durch die endogenen 24-h-Rhythmen ist die Pflanze also bestens vorbereitet auf die Bedingungen, die jeweils zu einer bestimmten Tageszeit mit der größten Wahrscheinlichkeit eintreten.

Ein Oszillator aus periodisch aktiven „clock“ Genen

Man weiß heute, dass die innere Uhr selbst ebenfalls aus circadian oszillierenden Proteinen aufgebaut ist. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proteinen, die für tageszeitabhängige Funktionen in der Zelle verantwortlich sind, sind diese so genannten „clock“ Proteine an der Erzeugung ihrer eigenen Rhythmik dadurch beteiligt, dass sie die Transkription ihrer eigenen Gene regelmäßig abschalten. Durch diese negative Rückkopplung oszilliert die Konzentration der „clock“ Proteine mit einer Periode von ca. 24 h (Abb. 2). Diese circadian oszillierenden „clock“ Proteine steuern ihrerseits die Tagesrhythmik aller physiologischen, biochemischen und molekularen Prozesse in der Zelle. Stört man die Oszillation eines „clock“ Proteins, in dem man es konstitutiv überexprimiert, kommt die Oszillation der von ihm gesteuerten Prozesse zum Erliegen [1].

Wir sind an den molekularen Grundlagen des circadianen Systems bei *Arabidopsis thaliana* interessiert. Bei der gezielten Suche nach Genen, die tageszeitabhängig exprimiert werden, haben wir *ATGRP7* (*Arabidopsis thaliana* glycin-reiches RNA-Bindeprotein) identifiziert, das für ein Protein mit einer RNA-Bindedomäne codiert [5]. Das *ATGRP7* Transkript zeigt eine circadiane Oszillation und erreicht seine höchste Konzentration am Abend. Der Peak der *ATGRP7* Proteinkonzentration wird mit einer Ver-

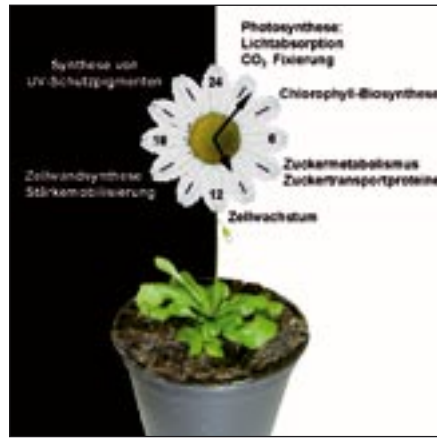


Abb. 1: Ein Tag im Leben einer *Arabidopsis* Pflanze. Gene für bestimmte zelluläre Funktionen werden jeweils koordiniert zu einer bestimmten Tageszeit abgelesen (J. C. Schöning, nach Daten aus [4]).

zögerung von ein paar Stunden erreicht: Steigt die Proteinkonzentration an, sinkt die Konzentration des Transkripts. Das legt die Vermutung nahe, dass das RNA-Bindeprotein sein eigenes Transkript negativ reguliert [6]. Tatsächlich ist in transgenen Pflanzen, die das *ATGRP7* Protein konstitutiv überexprimieren, die Oszillation des endogenen *ATGRP7* Transkripts stark gedämpft. Das Protein ist also Bestandteil eines Schwingkreises, über den es seine eigene Expression im 24-h-Takt an- und abschaltet [6].

Lässt sich dieser circadian regulierte Rückkopplungskreis mit denen vergleichen, über die „clock“ Proteine die endogene 24-h-Rhythmik erzeugen?

Im Gegensatz zu den bekannten „clock“ Proteinen beeinflusst *ATGRP7* die Oszillation seines eigenen Transkripts nicht durch Regulation der Transkription [7]. Stattdessen kontrolliert es auf posttranskriptioneller Ebene, dass das Transkript nur bis zu einer bestimmten Konzentration akkumuliert. Da rekombinantes *ATGRP7* Protein *in vitro* an das

ATGRP7 Transkript binden kann, könnte eine im Tagesverlauf steigende Proteinkonzentration in der Zelle dazu führen, dass das RNA-Bindeprotein mit seiner eigenen RNA interagiert und dadurch deren Abbau auslöst. Dies ist im Einklang mit unserer Beobachtung, dass in Pflanzen, die *ATGRP7* konstitutiv überexprimieren, ein alternativ gespleißtes *ATGRP7* Transkript mit einer stark verkürzten Halbwertszeit auftritt [8]. Damit ist der *ATGRP7* Rückkopplungskreis der erste molekulare „slave“ Oszillator, der von einem übergeordneten „master“ Oszillator im 24-h-Takt durch Aktivierung der *ATGRP7* Transkription angeschaltet wird und sich durch negative Autoregulation auf posttranskriptioneller Ebene regelmäßig wieder inhibiert.

Ein solcher der inneren Uhr nachgeschalteter Rückkopplungskreis könnte Teil einer Signaltransduktionskaskade sein, über die die von der inneren Uhr erzeugte Rhythmik weitgehend ungedämpft auf andere circadiane Prozesse in der Zelle übertragen wird (Abb. 2).

Da *ATGRP7* RNA-bindende Eigenschaften besitzt, könnte das dadurch erfolgen, dass es an bestimmte „target“ Transkripte bindet und deren Menge beeinflusst. Durch Vergleich der Transkriptprofile in Wildtyp-Pflanzen und *ATGRP7*-überexprimierenden Pflanzen mit Hilfe von DNA Microarrays des gesamten *Arabidopsis*-Genoms wurden tatsächlich einige Transkripte identifiziert, die durch *ATGRP7* beeinflusst werden. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die innere Uhr von *Arabidopsis* sich der wichtigen Klasse der RNA-Bindeproteine bedient, um tagesrhythmische Prozesse zu kontrollieren.

Die innere Uhr als Kalender

Pflanzen nutzen die innere Uhr nicht nur dazu, ihren Tagesablauf zu organisieren, sondern auch, um sich auf den Ablauf der Jahreszeiten einzustellen [3]. Pflanzen registrieren mit lichtempfindlichen Proteinen, sog. Photorezeptoren, wann die Sonne aufgeht und untergeht und synchronisieren damit ihre innere Uhr täglich mit dem Tag-Nacht-Wechsel. Das bedeutet aber nichts anderes, als dass die innere Uhr die Tageslänge messen kann. Da diese sich im Lauf des Jahres systematisch verändert, können Pflanzen die innere Uhr als Kalender nutzen und ihr Blühverhalten entsprechend steuern. Pflanzen höherer Breitengrade müssen blühen und Samen produzieren, bevor der Winter beginnt; sie blühen also, wenn die Tage lang sind. In mittleren Breiten

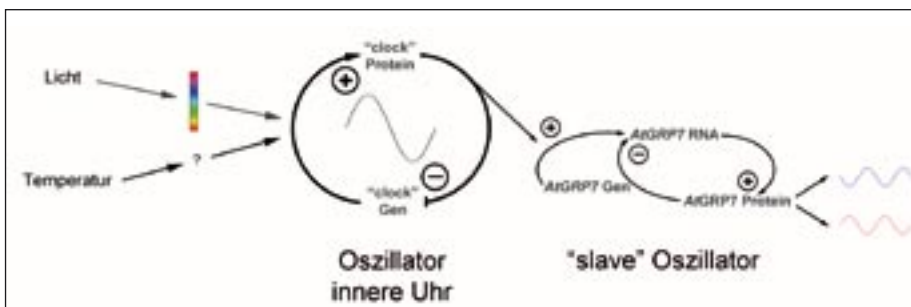


Abb. 2: Modell des circadianen Systems bei *Arabidopsis*. Ein zentraler Oszillator, die innere Uhr, besteht aus „clock“ Proteinen, die durch negative Autoregulation ihre eigene 24-h-Rhythmik erzeugen. Die innere Uhr wird täglich mit dem Tag-Nacht-Rhythmus synchronisiert. Dazu werden die Lichtverhältnisse durch Photorezeptoren und Temperaturveränderungen über bisher unbekannte Temperaturfühler registriert. Diese Information dient dazu, die innere Uhr jeden Tag auf exakt 24 h einzustellen. Die im 24-h-Takt oszillierenden „clock“ Proteine steuern ihrerseits alle rhythmischen Prozesse in der Zelle. Das RNA Bindeprotein *ATGRP7* ist Teil eines „slave“ Oszillators, der von der inneren Uhr gesteuert wird und an der Weiterleitung der circadianen Information beteiligt ist.

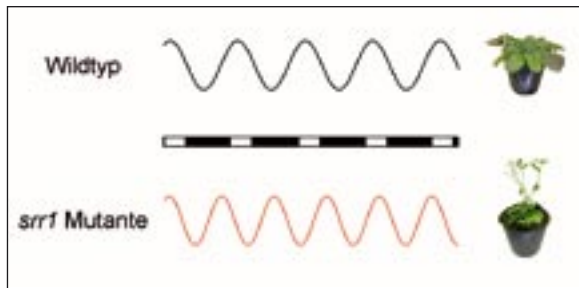


Abb. 3: Die *srr1* Mutante kann die Tageslänge nicht korrekt messen: Sie blüht unter Kurztagbedingungen (8 h Licht pro Tag), unter denen Pflanzen des Wildtyps nicht blühen. In dieser Mutante geht die innere Uhr falsch: alle von der inneren Uhr gesteuerten Transkripte oszillieren mit einer verkürzten Periode von ca. 22 h statt 24 h wie in Pflanzen des Wildtyps (nach Daten aus [9]).

blühen die Pflanzen, wenn die Tage kürzer werden, um die Sommerhitze zu vermeiden.

Arabidopsis thaliana ist eine sog. „Langtagpflanze“, die blüht, wenn die Tage eine bestimmte kritische Dauer überschreiten. In Zusammenarbeit mit Prof. Christian Fankhauser an der Universität Genf haben wir eine von C. Fankhauser identifizierte *Arabidopsis*-Mutante charakterisiert, die bei Anzucht unter Kurztagbedingungen mit 8 h Licht pro Tag fast zur gleichen Zeit anfängt zu blühen wie unter Langtagbedingungen mit täglich 16 h Licht [9]. Diese Mutante kann also die

Tageslänge nicht mehr korrekt bestimmen, was vermuten ließ, dass sie auch einen Defekt der inneren Uhr besitzt. Tatsächlich oszillieren alle untersuchten Transkripte, die für Uhrproteine selbst codieren, oder für Proteine, die von den Uhrproteinen kontrolliert werden, mit einer verkürzten Periode von ca. 22 h statt mit 24 h wie im Wildtyp (Abb. 3). Offensichtlich führt der schnellere Gang der inneren Uhr dazu, dass das Blühverhalten bereits bei kürzeren Tageslängen ausgelöst wird, die bei Pflanzen des Wildtyps nicht zur Stimulierung des Blühens führen. Das zeigt,

dass man aus Untersuchungen der inneren Uhr auch Aufschluss über das Blühverhalten gewinnen kann. Eine gezielte Steuerung des Blühverhaltens kann für die Landwirtschaft und die Blumenindustrie relevant sein.

Referenzen

- [1] Dunlap J. C.: Cell 96, 271–290 (1999)
- [2] Stanewsky, R.: BIOforum 28, 3, 24–26 (2005)
- [3] Hayama R. und Coupland G.: Plant Physiol. 135, 677–684 (2004)
- [4] Harmer S. *et al.*: Science 290, 2110–2113 (2000)
- [5] Heintzen C. *et al.*: Plant J. 5, 799–813 (1994)
- [6] Heintzen C. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci USA 94, 8515–8520 (1997)
- [7] Staiger, D. *et al.*: Mol. Gen. Genet. 261, 811–819 (1999)
- [8] Staiger D. *et al.*: Plant J. 33, 361–371 (2003)
- [9] Staiger D. *et al.*: Genes Dev. 17, 256–268 (2003)

Prof. Dr. Dorothee Staiger

Lehrstuhl für Molekulare Zellphysiologie
 Universität Bielefeld
 Universitätsstrasse 25
 33615 Bielefeld
 dorothee.staiger@uni-bielefeld.de