

Molecular genetic analysis of  
the role of  
**GIGANTEA**  
in flower initiation

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

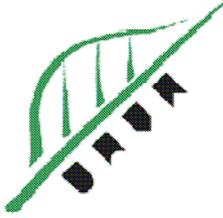
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Mark Rühl  
Aus Duisburg

Köln, Februar 2010



Max Planck Institute for  
Plant Breeding Research

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Pflanzen (Direktor Prof. Dr. G. Coupland) angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. George Coupland

Prof. Dr. Ute Höcker

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der Disputation: 12. April 2010



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

## Abstract

The ability of plants to detect seasonal changes in environmental conditions and to respond by undergoing the transition from the vegetative to the reproductive phase is critical for the evolutionary success of these sessile organisms. Different flower promoting pathways were identified in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Prolonged cold of winter influences the expression of genes in the vernalization pathway consequently the expression of an important gene in this pathway *FLOWERING LOCUS C (FLC)* is repressed and this results subsequently in a higher mRNA level of the gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*. An increased levels of *FT* mRNA cause early transition to flower. The *GIBBERELIC ACID (GA)* pathway contributes most strongly under short day conditions (SD) to the transition from the vegetative to the reproductive phase. A strong promotion of flowering is the increasing length of days in the summer detected by the genes of the photoperiod pathway. The key genes of this pathway are *GIGANTEA (GI)*, *CONSTANS (CO)* and *FT*. Mutation in any of these genes causes late flowering similar to plants grown under SD and their overexpression causes early flowering. To explore the mechanism by which GI activates transcription of *CO*, a mutagenesis was carried out on seeds of plants overexpressing *GI* and late-flowering mutants with high *GI* mRNA level were rescued. Linkage mapping of one candidate identified an area of 3Mb on the second chromosome near the centromere that correlates with the Phenotype. A gene predicted to code for a protein with a N-terminal F-box and a C-terminal FBA\_1 domain in this area showed increased expression in the plants overexpressing *GI* and reduced mRNA level in the mutant. A Salk collection mutant with a T-DNA insertion in the coding region of this gene showed a later-flowering phenotype similar to the induced mutant without overexpression of *GI*. This mutations cause reduced mRNA level of *CO* compared to WT *Ler* and *Col* at dusk in SD. The proteins GI and FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) were recently shown to play a major role in degrading the floral repressor CYCLING DOF FACTOR 2 (CDF2) and other members of the family of CDF proteins that represses *CO* transcription. Both mutants, the T-DNA insertion from the Salk collection and the induced mutant show increased CDF2 protein amount after dusk. Therefore *CO* transcription is reduced in both, suggesting that this is the reason for the late flowering of these plants.

Overexpression of the F-box protein coding gene by the *Cauliflower Mosaic Virus (CaMV35S)* promoter caused early flowering in long days and short days. A YFP fusion to the F-box protein localizes outside of the nucleus and appears to change pattern at different developmental stages. Adjacent to the gene encoding the F-box protein is an other gene also

predicted to code for a F-box protein with a FBA\_1 domain that also showed elevated mRNA levels in *35S::GI* plant. However, the insertion mutants from the Salk collection for this gene did not show any affect in flowering under the tested SD and LD conditions. Thus In this section a novel F-box protein that acts downstream of *GI* to regulate CDF2 and thereby promote flowering was identified.

GI protein has been shown to bind to a specific part of the *CO* promoter close to the binding site of CDF1 protein. With ChIP experiments we were able to confirm two binding sites for GI at the promoter of *CO*. Fragments of the *CO* promoter cloned in front of *GFP-CO* were transformed to the *co* mutant plants *co2* with *GI* overexpression or WT level. The late flowering phenotype of the *co2* mutants could be overcome by all fragments. Only a small difference between the shorter and longer promoter fragments could be observed. This result suggests that the binding of GI protein to the *CO* promoter occurs but is not essential for the promotion of *CO* expression. Taken together the results deepen our understanding of how GI increases *CO* mRNA levels to promote early flowering under long days.

### Zusammenfassung

Die Fähigkeit der Pflanze auf Veränderungen in der Umwelt zu reagieren und in der Folge den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase einzuleiten ist von großer Bedeutung für den evolutionären Erfolg dieser sessilen Organismen. An der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* können verschiedene Signalwege, die zur Blühinduktion führen beschrieben werden. Gruppen von Genen beeinflussen aufgrund unterschiedlicher Stimuli den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase. Längere Kälteperioden im Winter führen zur Vernalisation, einem Prozess der eine Gruppe von Genen reguliert, wodurch die Expression des Gens *FLOWERING LOCUS C (FLC)* reprimiert wird. Eine Verminderung der *FLC* Aktivität erlaubt den Anstieg der mRNA Menge des Gens *FLOWERING LOCUS T (FT)*. Ansteigende Mengen an *FT* beschleunigen den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase. Eine weitere Gruppe von Genen entfaltet ihre größte Wirkung beim Übergang von der vegetativen zur Blühphase in kurzen Tagen mit 8h Licht und 16h Dunkelheit. Dies sind die Gene des *GIBBERELLIC ACID (GA)* Signalweges. Ein starker Stimulus der zum Blühen führt sind die langen Tage des Sommers. Die Schlüsselgene der durch die Tageslänge bestimmten Genkaskade sind *GIGANTEA (GI)*, *CONSTANS (CO)* und *FT*. Mutationen in diesen Genen verursachen eine Verlängerung der vegetativen Phase, vergleichbar der in kurzen Tagen. Die Überexpression dieser Gene beschleunigt den Übergang zur Blühphase. Um ein verbessertes Verständnis darüber zu erlangen, wie *GI* die Transkription von *CO* aktiviert, wurde eine Mutagenese an der Saat von Pflanzen mit *GI* Überexpression durchgeführt. Dieses Experiment führte zu spätblühenden mutanten Pflanzen mit hoher *GI* Expression. In einer der Mutanten konnte eine Region von 3Mb auf Chromosom II im Bereich des Centromers mit dem Phänotyp in Verbindung gebracht werden (Linkage mapping). Ein Gen innerhalb des Centromers zeigte erhöhte Expression in Pflanzen mit *GI* Überexpression, in der Mutante ist diese stark verringert. Das betroffene Gen kodiert ein Protein mit einer N-terminalen F-box und einer C-terminalen FBA\_1 Domäne. Mutanten mit einer T-DNA Insertion in diesem Gen von der Salk Kollektion zeigten ein späteres Blühen vergleichbar der aus dem EMS Versuch hervorgegangenen Mutante nach Kreuzung mit dem Wildtyp (WT) *Ler*, also ohne *GI* Überexpression. Die *CO* Expression in der Salk T-DNA Mutante und der induzierten Mutante ist reduziert im Vergleich zum Wildtype (WT), allerdings hauptsächlich in der Zeit nach Einbruch der Dunkelheit eines Kurztages. Vorhergehende Publikationen beschreiben die Funktion der Proteine *GI* und FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1). Diese übernehmen eine wichtige Aufgabe

beim Abbau von Proteinen, die Repressoren der Transkription von *CO* darstellen. Einer dieser repressoren ist CYCLING DOF FACTOR 2 (CDF2), zu dieser Gruppe gehören noch andere Mitglieder der Proteinfamilie der CDFs, die zum Teil auch von diesem Abbau betroffen sind. Sowohl die T-DNA Insertions als auch die induzierte Mutante zeigen erhöhte CDF2 Proteinmengen nach Einbruch der Dunkelheit eines kurzen Tages, das ist wahrscheinlich der Grund für das spätere Blühen dieser Mutanten.

Die Überexpression des gefundenen Gens mit dem *Cauliflower Mosaic Virus (CaMV35S)* Promotor verursacht früheres Blühen in langen und kurzen Tagen. Ein Fusionsprotein aus YFP und dem F-box Protein konnte außerhalb des Kerns und während der Entwicklung in verschiedenen Lokalisationen in der Zelle detektiert werden. In direkter Umgebung findet sich ein weiteres Gen das, wenn es den Voraussagen entspricht, auch für ein F-box Protein mit *FBA\_1* kodiert. Auch für dieses Gen ist eine Erhöhung der mRNA Menge in Pflanzen mit *35S::GI* feststellbar. Allerdings ist der Phänotyp der T-DNA Insertionsmutante der Salk Sammlung weder in Langtag noch in Kurztag für dieses Gen vom WT zu unterscheiden. Demzufolge konnte in diesem Abschnitt der Arbeit ein neues Gen identifiziert werden das ein F-box Protein codiert, dessen Transkription von *GI* reguliert wird und das zum Abbau von CDF2 beiträgt.

In früheren Publikationen ist beschrieben worden, dass *GI* in der Nähe der CDF1 Bindestelle an den Promotor von *CO* bindet. Mit ChIP Experimenten konnten insgesamt zwei Bindungsstellen für *GI* am *CO* Promotor nachgewiesen werden. Fragmente des *CO* Promotors wurden vor ein *GFP-CO* Konstrukt kloniert und in Pflanzen mit *co* Mutation eingebracht. Für dieses Experiment wurden sowohl Pflanzen mit der *co2* Mutation transformiert, als auch solche *co2* die gleichzeitig *GI* durch den 35S Promoter überexpremieren. Keiner der Transformanden mit den verschiedenen Promotorfragmenten zeigte noch den spätblühenden Phänotyp der *co2* Mutante. Die Unterschiede in der Zeit die bis zum Blühen verging, war zwischen den längeren und kürzeren Promotorfragmenten sehr gering. Daraus folgt, dass eine Bindung des *GI* Proteins an den *CO* Promotor stattfindet, aber für die *CO* Expression nicht essentiell ist. Zusammengenommen vertiefen die Resultate das Verständnis darüber, wie *GI* die Expression von *CO* und damit das Blühen unter Langtagbedingungen fördert.