

Abstract

In *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), FLOWERING LOCUS T (FT) as part of florigen moves from leaves to the shoot apical meristem to induce the floral transition under flower promoting long-day (LD) conditions. LD induced transcription of *FT* is playing a critical role in mediating the onset of flowering and it is regulated by different flowering time pathways. A *FT* promoter containing 5.7 kb upstream sequence has been reported to contain all regulatory elements necessary for *FT* expression in response to photoperiod. In this work, we are interested in identifying novel regulatory elements at the *FT* locus and to understand how they interact to regulate *FT* transcription.

The data generated in this study show that the first and second introns of *FT* carry repressive signals that almost fully prevent *FT* expression in the absence of *FT* 3' downstream regions, which are not required for expression of a construct with *FT* cDNA. Presence of either intron 1 or 2 was sufficient to prevent *FT* expression. We confirmed previous assumptions according to which CArG boxes are the main repressive elements in intron 1. In contrast, repression mediated by intron 2 was dependent on other *cis*-regulatory elements. In addition, intron-mediated repression was dependent on the middle region of the *FT* promoter and presence of a small part of the middle promoter region that contains two CArG boxes proved to be sufficient to mediate the repressive effect. The *FT* downstream sequences required to overcome intron-mediated repression were mapped to a region between 304bp to 500bp 3' of the stop codon. However, the presence of additional repressive regulatory regions in longer downstream regions further modulates *FT* expression.

Based on these results, we propose the “key-lock” model for *FT* regulation. According to this model, the middle part of the *FT* promoter physically interacts with the intron1 and 2 in order to fold into a repressive structure, the “lock”. Formation of the lock structure is mediated by transcription factor binding to CArG boxes as well as other *cis*-elements and their cognate factors. The sequence between 304 bp to 500 bp downstream of the stop codon, which we consider the “key”, contains activating *cis*-regulatory elements that are required to overcome the repressive lock structure, which would allowed the previously characterized distal enhancer to interact with the proximal promoter, a requirement for *FT* expression.

Zusammenfassung

Zur Einleitung des Blühvorganges der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) unter Langtagbedingungen (LD) ist es notwendig, dass das sogenannte Florigen Protein FLOWERING LOCUS T (FT) von den Blättern, dem Ort seiner Bildung, zum Sprossmeristem, dem Ort der Signalperzeption, transportiert wird. Eine kritische Rolle spielt bei diesem Vorgang die LD induzierte Transkription des *FT*-Gens in den Blättern, deren Kontrolle dem Zusammenwirken verschiedener molekularer Blühinduktionsschaltkreise obliegt. Es wurde bereits gezeigt, dass der *FT*-Lokus eine mit ca. 5.7 kb relativ lange Promotorsequenz besitzt, die alle zur normalen Expression notwendigen regulatorischen Elemente beinhaltet. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer regulatorischer Elemente innerhalb des *FT*-Lokus, sowie deren funktionale Charakterisierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl das erste als auch das zweite Intron des *FT*-Lokus Elemente enthält, die eine repressive Wirkung auf die Transkription des *FT*-Gens besitzen. Dies wurde deutlich, indem die *FT*-Expression eines cDNA Transgens, unter Kontrolle der 5.7 kb Promoter region, die normalerweise ausreichend stark exprimiert, um den spätblühenden Phenotyp der *ft-10* Mutante zu kompensieren, bei Vorhandensein einer der jeweiligen Intronsequenzen in der cDNA des Transgens reprimiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die für die repressive Eigenschaft in Intron1 verantwortlich Sequenzen CarG Boxen darstellen, wohingegen die verantwortliche *cis*-regulatorische Sequenz in Intron2 bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Desweiteren wurde deutlich, dass die Intron vermittelte repression zusätzlich von einer Region im mittleren Bereich der 5.7 kb Promotersequenz abhängig war, da bei Fehlen eines entsprechenden mittleren Abschnittes das Transgen trotz vorhandenen Introns exprimiert werden konnte. Da bei Reduktion des mittleren Abschnittes auf einen kleinen Teil, der zwei CARG Boxen enthält, die Repressive Aktivität der Introns wieder hergestellt werden konnte, lässt sich schließen, dass diese auch im Promotor eine reprimierende Eigenschaft besitzen. Die reprimierenden Eigenschaften der Intronsequenzen konnten durch Vorhandensein eines zwischen 304 bp bis 500 bp 3' des Stopkodon gelegenen Bereichs wieder überwunden werden.

Auf diesen Ergebnissen basierend entwickelten wir das „Schlüssel-Schloß“-Model für die transkriptionelle Regulation der *FT*-Genaktivität. Nach diesem Model interagiert der mittlere Bereich des *FT*-Promotors physikalisch mit den beiden Introns, um eine reprimierend wirkende Schlingen-Struktur des *FT*-Chromatins zu bilden und den Lokus dadurch transkriptionell „abzuschließen“. Die Bildung dieser verschlossenen Chromatin-Struktur wird

vermutlich durch Transkriptionsfaktoren, welche die oben erwähnten CArG Boxen binden, vermittelt. Der Bereich der zwischen 304 bp und 500 bp unterhalb des Stopkodons liegt, übernimmt nach unserem Model hingegen die Funktion eines „Schlüssels“, da er aktivierende *cis*-regulatorische Elemente enthält, welche die reprimierende Wirkung der „Schloss“-Struktur neutralisieren. Die durch Interaktion der „Schlüssel“-Region mit aktivierenden Transkriptionsfaktoren bewirkte physische Struktur des Lokus erlaubt nach unserem Model die für eine Aktivierung des *FT*-Gens notwendige Interaktion eines zuvor charakterisierten distalen „Enhancer“-Bereichs mit dem proximalen Promotorbereich.