

2006/07/07

EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN



The mRNA of the *Arabidopsis* Gene FT Moves from Leaf to Shoot Apex and Induces Flowering

Huang et al., Science, 309, 1694-1696 (2005)

Studentenseminar
Stefan Mogk

Prof. Dr. Georg Felix

2006/07/07

EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN



The mRNA of the *Arabidopsis* Gene FT Moves from Leaf to Shoot Apex and Induces Flowering

Huang et al., Science, 309, 1694-1696 (2005)

oder :

**Warum blühen Märzenbecher im März
und Herbstzeitlose im Herbst ?**

Einleitung

- Die Süddeutsche Zeitung schrieb am 27. April 2005

Blühen auf Kommando

Blumen spielen auf Veranstaltungen wie der Bundesgartenschau in München nur mit, wenn Botaniker die Natur austricksen. Eine Substanz, die

Blüten auf Kommando erblühen lässt, suchen die Pflanzenexperten seit hundert Jahren. Bisher ohne Erfolg.



Themenparks der Bundesgartenschau

- „Wunderwelt der Orchideen“
- „Blütenpracht der Hortensien“
- „Dahlien, das sonnige Erbe Mexikos“

Alle sollen am Tag der Eröffnung blühen, unabhängig von ihrem Herkunftsland...

Einleitung

- Die Blütezeit hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab und es gibt entsprechend viele Tricks, Pflanzen zu beeinflussen.
- Entscheidend ist letztlich das Licht:
Pflanzen erkennen anhand der Tageslänge, wann für sie der richtige Zeitpunkt zum Blühen ist.
- Die Ermittlung der „richtigen“ Blütezeit ist für die Pflanzen essentiell, denn wer sich geschlechtlich fortpflanzen will, muss zur selben Zeit blühen wie seine Nachbarn...



Einleitung



Einteilung der Pflanzen bezüglich ihrer Photoperiodizität

Fosket, Plant Growth & Development, 495 (1994)

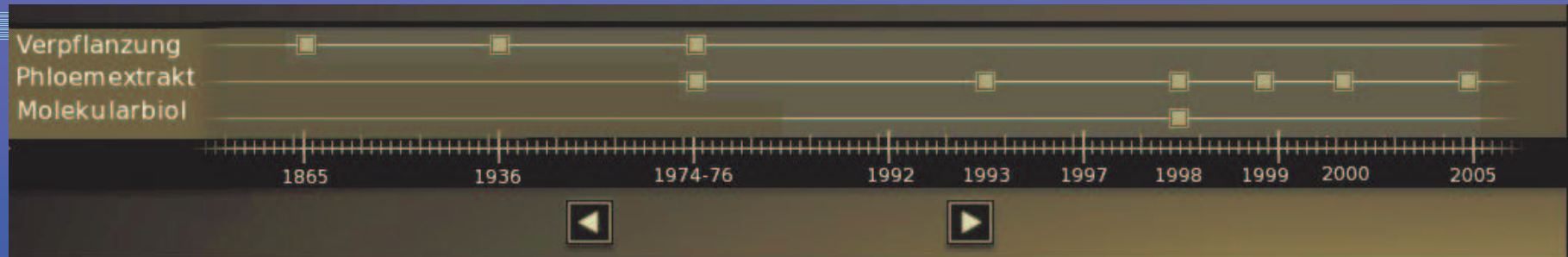
	Day Neutral Plants	Short Day Plants (SDP)	Long Day Plants (LDP)
obligat	Tomaten (<i>Lycopersicum</i>) Kartoffel (<i>Solanum t.</i>) Rosen (<i>Rosa sp.</i>) Mais (<i>Zea mays</i>)	Chrysanthemen Kaffee Tabak (var. Maryland M.) Tropische Maissorten	Nelken (<i>Dianthus sp.</i>) Hafer (<i>Avena sp.</i>) Klee (<i>Trifolium sp.</i>)
fakultativ		Hanf (<i>Cannabis sp.</i>) Baumwolle (<i>Gossypium sp</i>) Reis	Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

Übersicht



- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?
- Lokale Induktion von FT
 - „Blühen im Labor“
- Transport der FT mRNA
 - „Vom Blatt in den Zweig“
- Endogenes FT
 - „Eine Rückkopplung“
- Kinetik d. Signaltransduktion
 - „Datenhighway Phloem“
- Long day Induktion
 - „Blühen in der Natur“
- Zusammenfassung

Historische Suche nach dem Florigen



1865

Licht kann in Blättern blütenbildende Substanzen induzieren, deren Wirkung am apikalen Meristem einsetzt (Sachs)

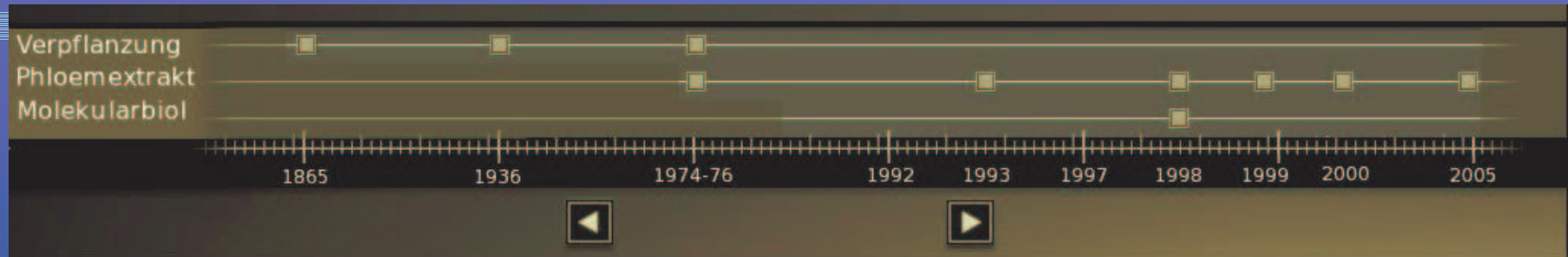
1936

Verpflanzung von induzierten Blättern an nicht-induzierte Pflanzen führt zur Blütenbildung (Chailakyan) :

„the flower hormone florigen regulates flowering and has the same nature in different plants“

Der florale Stimulus („Florigen“) wird in den Blättern unter Lichteinwirkung induziert und zur Zweigspitze translokalisiert. Florigen wird als hypothetisches Pflanzenhormon postuliert.

Historische Suche nach dem Florigen



1974-76

Pfropfexperimente, Extraktion von Phloemsaft (King, Zeevart)

1993/98/99

Extraktion von Phloemsaft (Sakuth, Marenger, Kehr)

1992-99

Chemische Analysen des Phloemsaftes

(Fisher; Sakuth; Marenger; Xoconostle-Cozeres; Kehr)

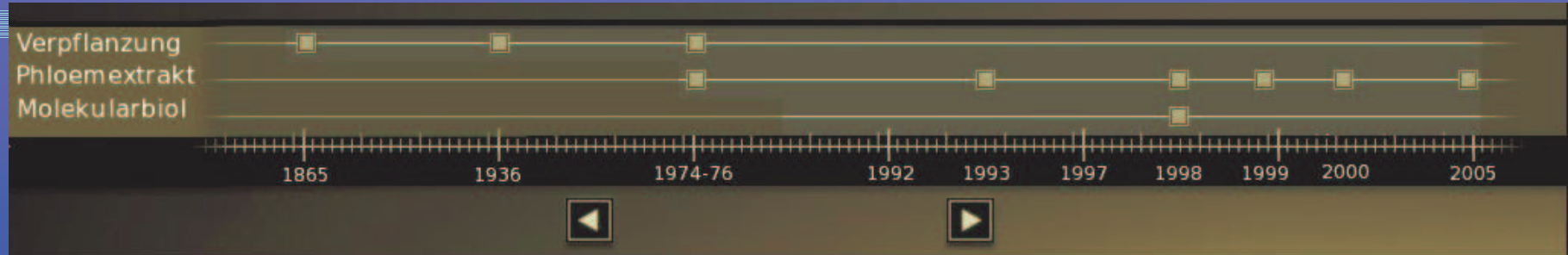
Entgegen früherer Annahmen, im Phloem würden nur Kohlenhydrate transportiert, fand man neben Zuckern auch kleine Moleküle, Peptide, Proteine und Nukleinsäuren !

2000

Lucas prägt die Bezeichnung des Phloems als „superinformation highway“ und unterstreicht damit seine Bedeutung für die Signaltransduktion

Eine Identifikation des Florigen blieb erfolglos.

Historische Suche nach dem Florigen

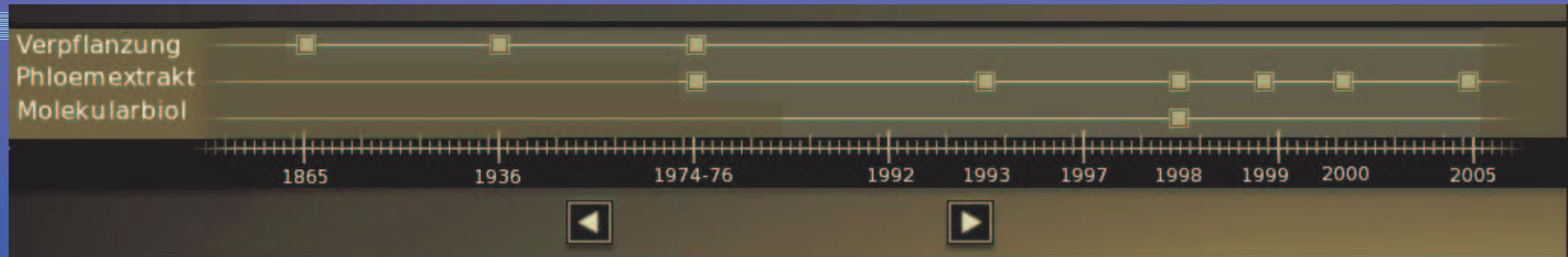


bis 1998

Molekularbiologische Untersuchungen mit Mutanten ermöglichten keine eindeutige Identifikation des Florigen. (Koorneef)

Man vermutete, Florigen sei eine komplexe Mischung vieler Substanzen.

Historische Suche nach dem Florigen



2005

Wigge (John Innes Centre, Norwich, GB)

Waigel (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen)

Zwei Komponenten müssen zusammenkommen:

- FT („Flowering Locus T“), tritt in den Blättern auf
bestimmt, zu welcher Jahreszeit die Pflanze blüht
- FD, bZIP-Transkriptionsfaktor, tritt in der Zweigspitze auf
bestimmt, wo an der Pflanze Blüten gebildet werden

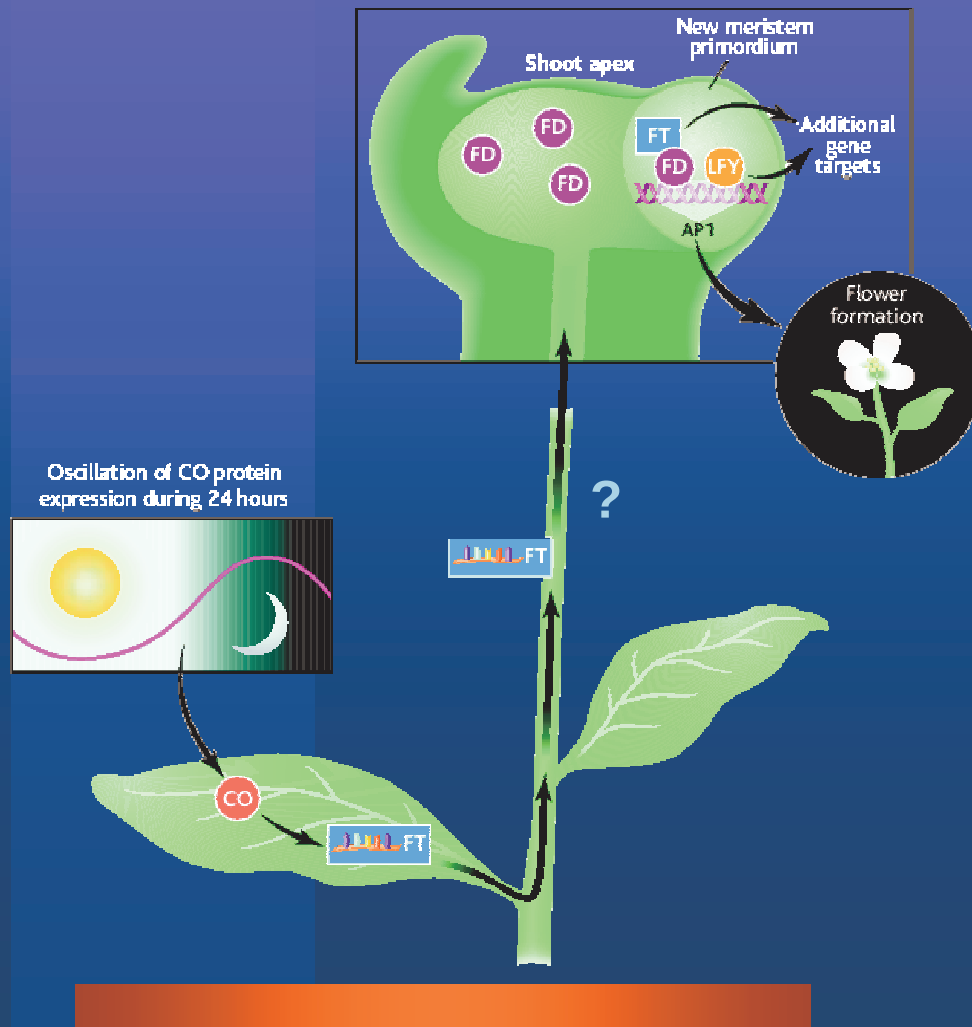
Wenn beide in derselben Zelle zusammenkommen werden sie aktiv und es kommt zur Blüte.

Übersicht



- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?
- Lokale Induktion von FT
 - „Blühen im Labor“
- Transport der FT mRNA
 - „Vom Blatt in den Zweig“
- Endogenes FT
 - „Eine Rückkopplung“
- Kinetik d. Signaltransduktion
 - „Datenhighway Phloem“
- Long day Induktion
 - „Blühen in der Natur“
- Zusammenfassung

Was wissen wir heute ?



CONSTANS (CO):

- misst die Tageslänge
 - oszilliert im Tagesrhythmus
 - erreicht Peak in der Abenddämmerung
- ist es dann noch hell, wird das hochkonzentrierte CO aktiviert und führt zur Expression von FT

Übersicht

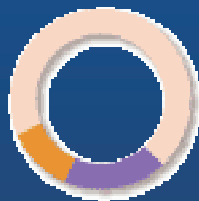


- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?
- Lokale Induktion von FT
 - „Blühen im Labor“
- Transport der FT mRNA
 - „Vom Blatt in den Zweig“
- Endogenes FT
 - „Eine Rückkopplung“
- Kinetik d. Signaltransduktion
 - „Datenhighway Phloem“
- Long day Induktion
 - „Blühen in der Natur“
- Zusammenfassung

Lokale Induktion von FT

- Wie wird das FT-Signal vom Blatt in die Zweigspitze translokalisiert ? (Huang et al., 2005)
- Methodik:
Transgene Pflanzen können durch einen Hitzeschock lokal zur Expression von FT angeregt werden.

Hierzu wird ein Plasmid mit einem Hsp-Promotor und den zu exprimierenden Genen in *Arabidopsis thaliana* eingebracht.



Verwendete Konstrukte :

Hsp : FT

Hsp : GUS (Reportergen)

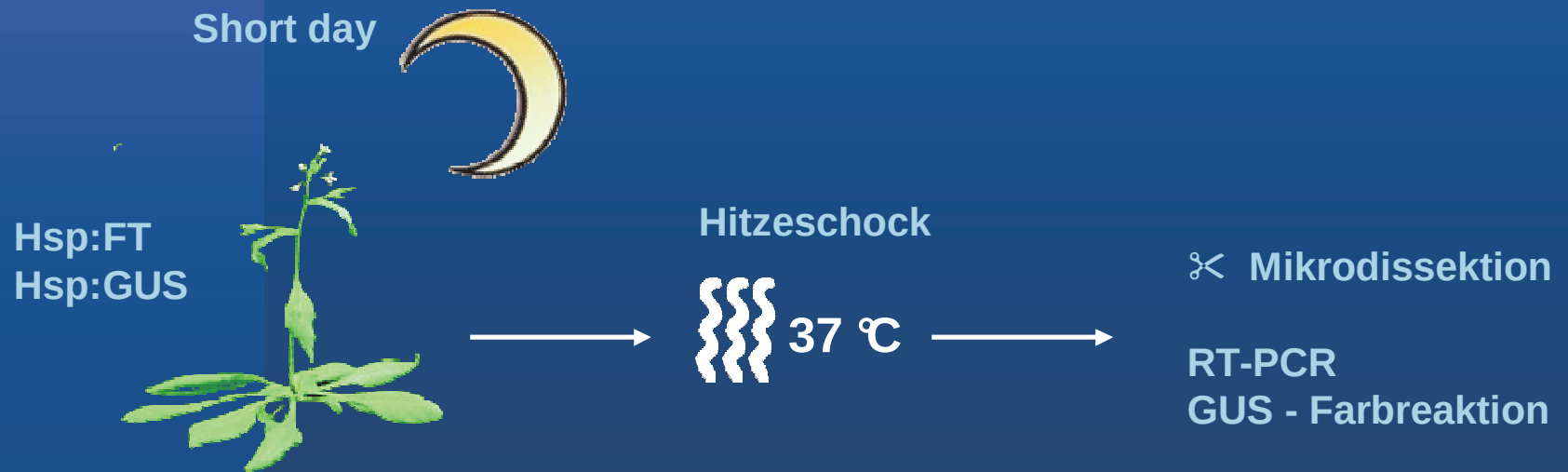
Lokale Induktion von FT

- Wie wird das FT-Signal vom Blatt in die Zweigspitze translokalisiert ? (Huang et al., 2005)
- Methodik:
Um zu verhindern, dass zusätzlich lichtabhängige Signalwege ablaufen, werden die Pflanzen unter nicht-induktiven Bedingungen kultiviert.



Lokale Induktion von FT

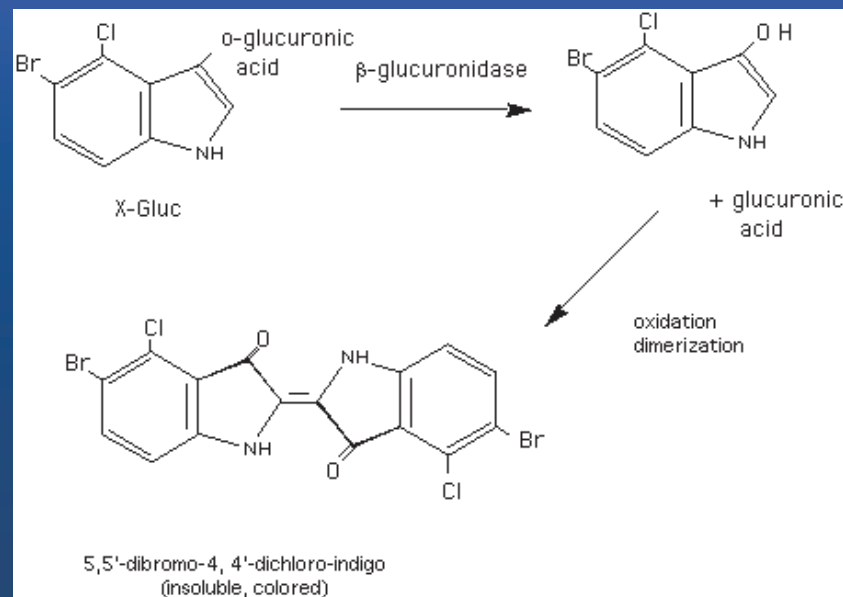
- Wie wird das FT-Signal vom Blatt in die Zweigspitze translokalisiert ? (Huang et al., 2005)
- Methodik:
Um zu verhindern, dass zusätzlich lichtabhängige Signalwege ablaufen, werden die Pflanzen unter nicht-induktiven Bedingungen kultiviert.



GUS-Farbreaktion

- GUS codiert für β -Glucuronidase

Häufig eingesetztes Substrat ist 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure, die zu einem unlöslichen blauen Farbstoff umgesetzt wird.



Lokale Induktion von FT

- Vorversuch:

Ist eine lokale Induktion mit dieser Methode möglich ?



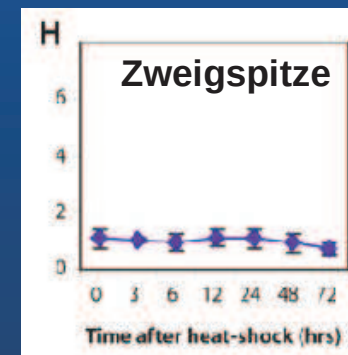
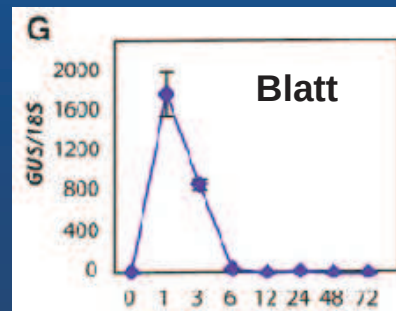
Lokale Induktion von FT

- Vorversuch:

Ist eine lokale Induktion mit dieser Methode möglich ?



Nachweis der GUS mRNA
mittels quantitativer RT-PCR



Lokale Induktion von FT

- Vorversuch:

Ist eine lokale Induktion mit dieser Methode möglich ?

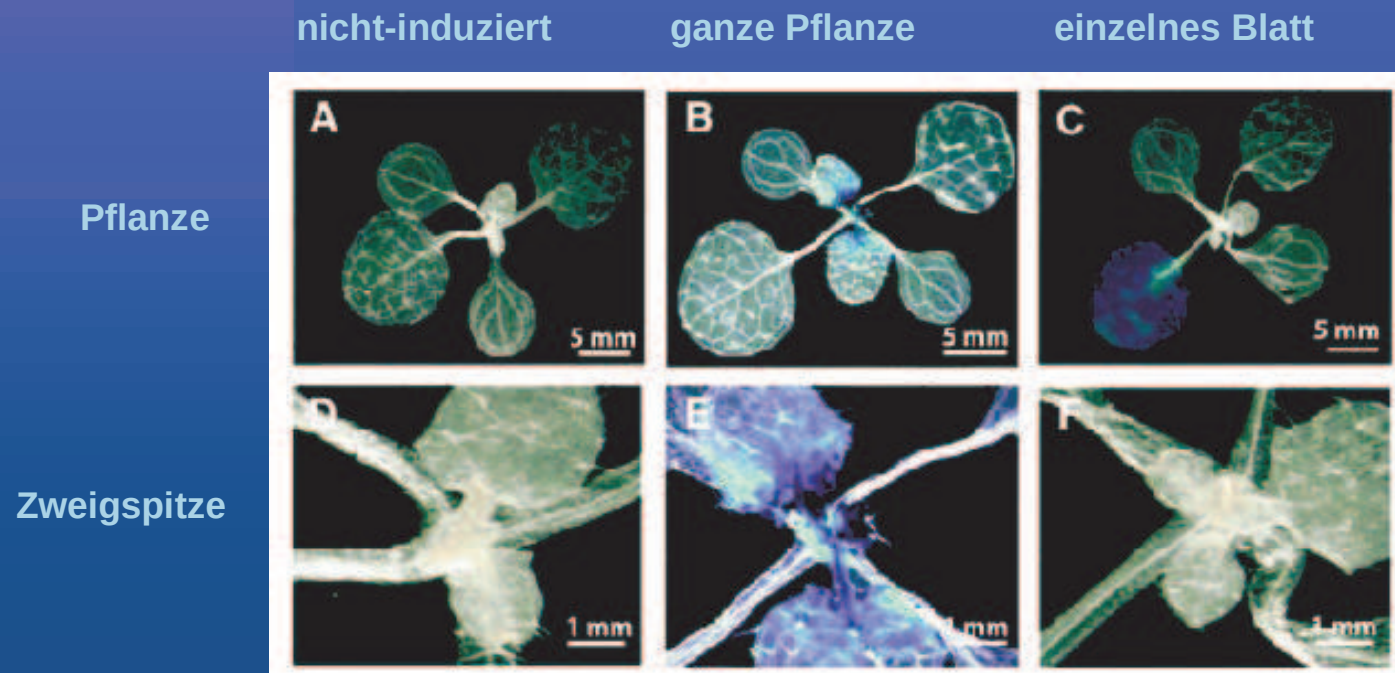


- Ergebnis:

- ☺ lokale Induktion möglich;
GUS wird nicht (im Phloem) transportiert, verteilt sich nicht

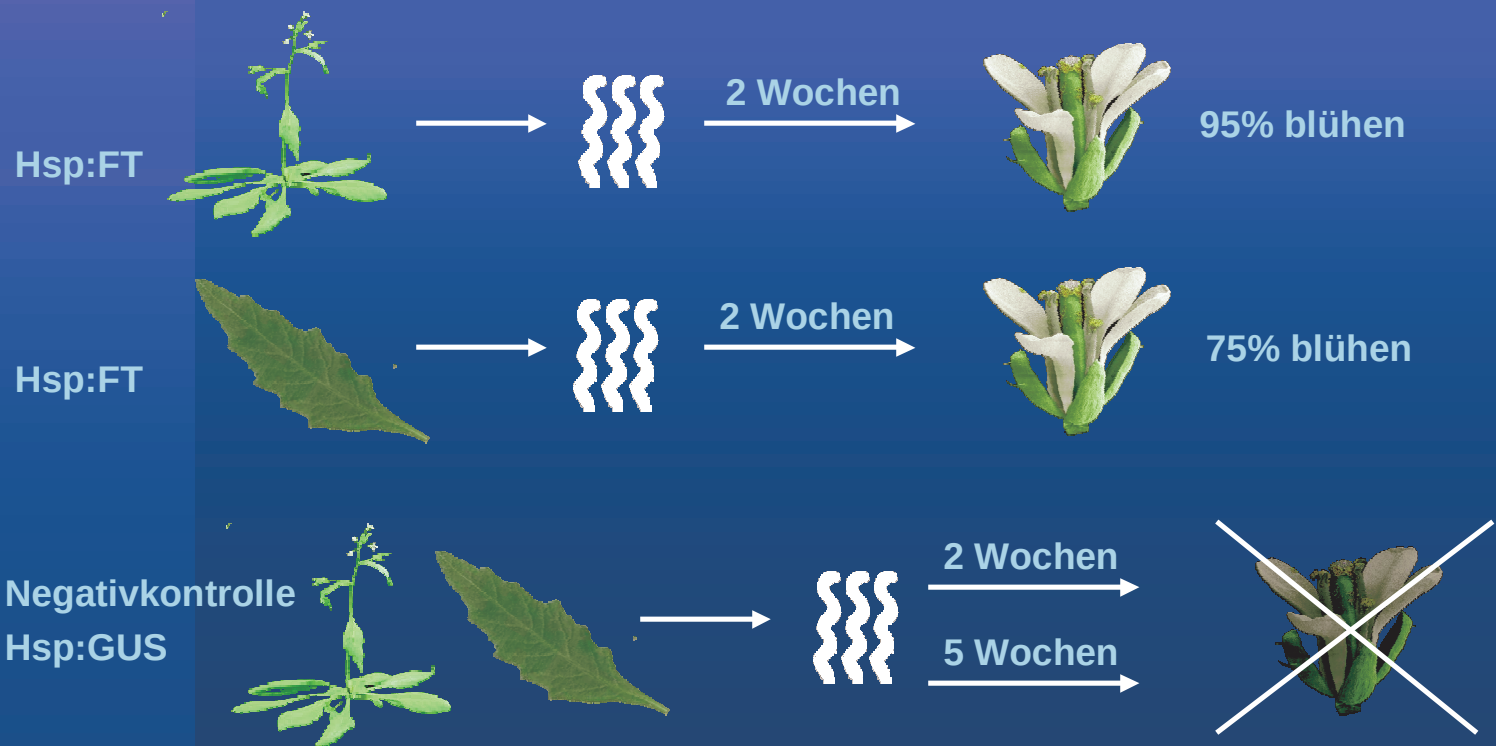
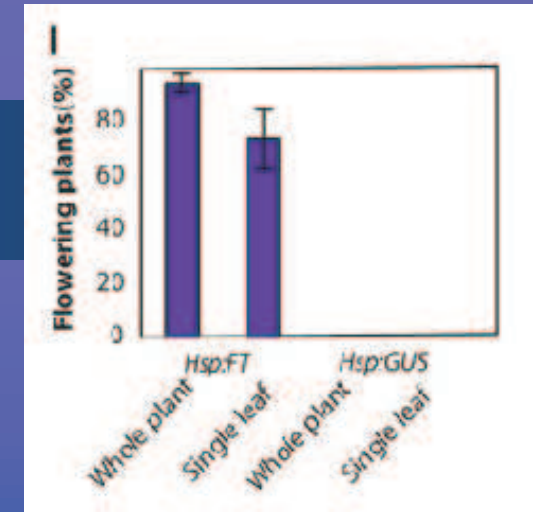
Lokale Induktion von FT

Optischer Nachweis über GUS-Farbreaktion



Lokale Induktion von FT

- Kann die Hsp:FT Pflanze mit einem Hitzeschock zur Blüte gebracht werden ?



Lokale Induktion von FT

- Wird das endogene FT dabei von der Pflanze benötigt ?
Oder reicht das transgene Hsp:FT (Plasmid) aus, die Blüte zu induzieren ?
- Versuche mit FT-defizienten Mutanten

ft Mutante
Hsp:FT



95 % blühen
(kein Unterschied)

ft Mutante
Hsp:FT



nur marginaler
Rückgang der Effizienz

Übersicht



- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?

- | | | |
|---------------------------------|---|--------------------------|
| ● Lokale Induktion von FT | - | „Blühen im Labor“ |
| ● Transport der FT mRNA | - | „Vom Blatt in den Zweig“ |
| ● Endogenes FT | - | „Eine Rückkopplung“ |
| ● Kinetik d. Signaltransduktion | - | „Datenhighway Phloem“ |
| ● Long day Induktion | - | „Blühen in der Natur“ |
| | | |
| ● Zusammenfassung | | |

Transport der FT mRNA

- Wo lassen sich mRNA Transkripte nachweisen ?

frühere Studien lassen vermuten, die FT mRNA könne im Phloem zur
Zweigspitze transportiert werden

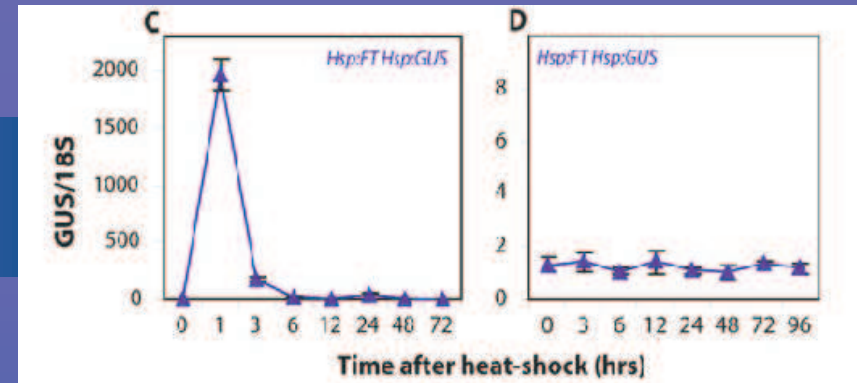
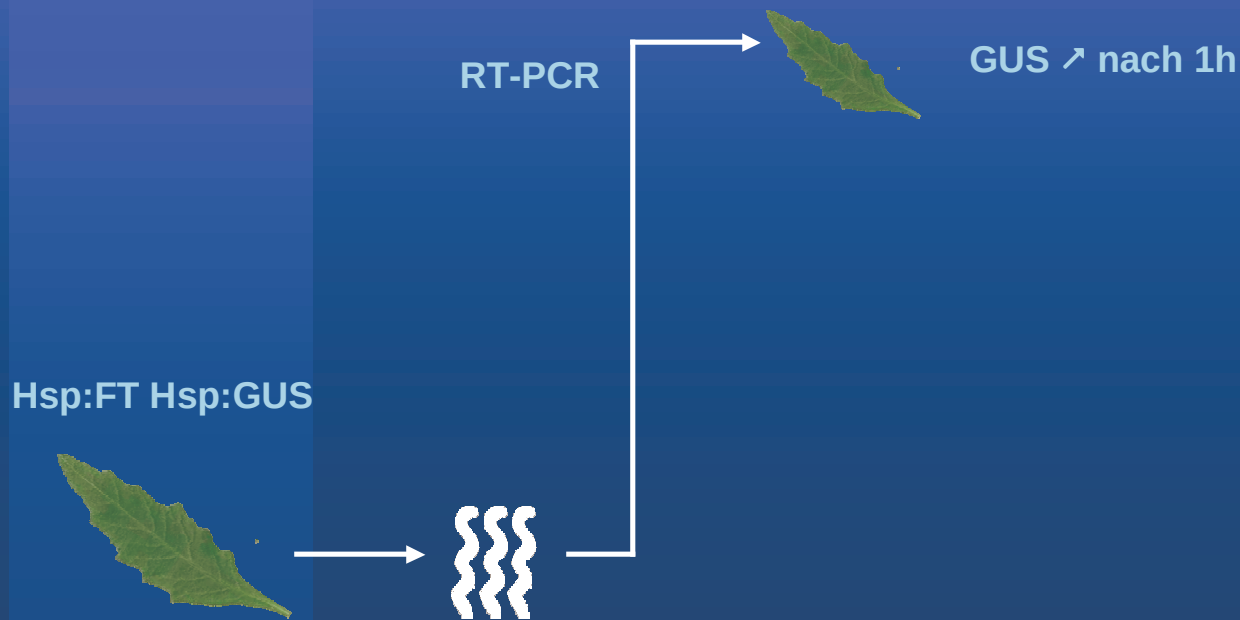
Hsp:FT Hsp:GUS



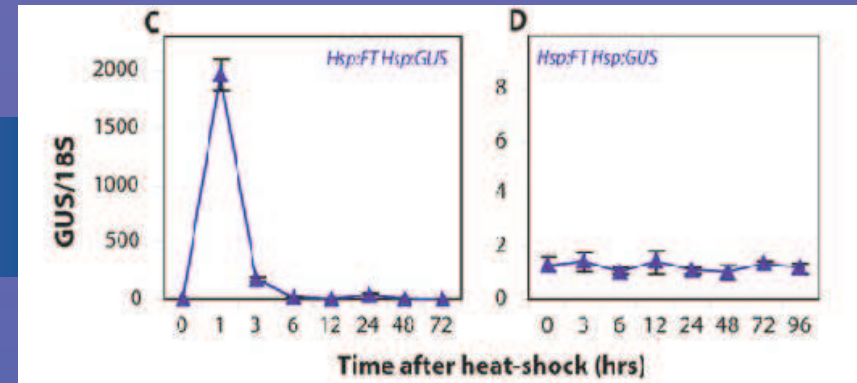
mRNA Transport

- Wo lassen sich mRNA Transkripte nachweisen ?

frühere Studien lassen vermuten, die FT mRNA könne im Phloem zur
Zweigspitze transportiert werden

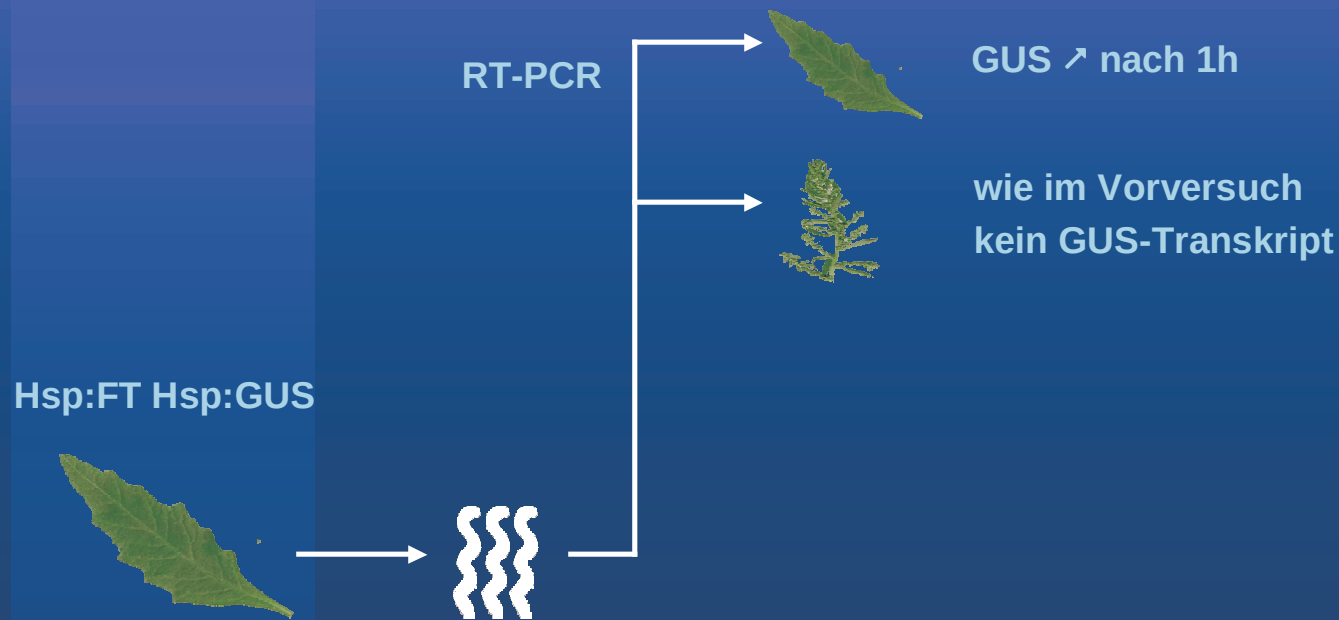


mRNA Transport

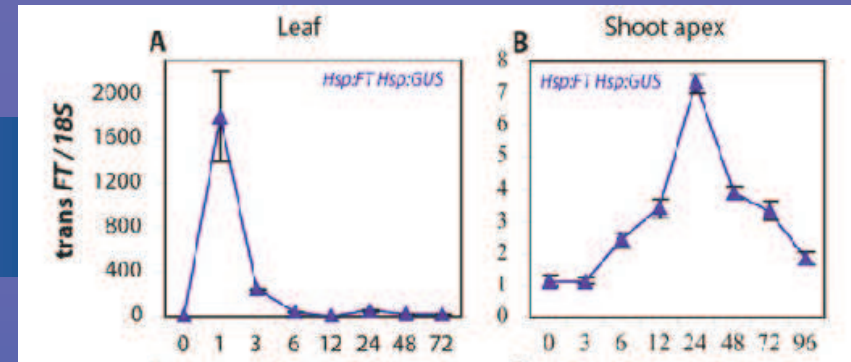


- Wo lassen sich mRNA Transkripte nachweisen ?

frühere Studien lassen vermuten, die FT mRNA könne im Phloem zur
Zweigspitze transportiert werden

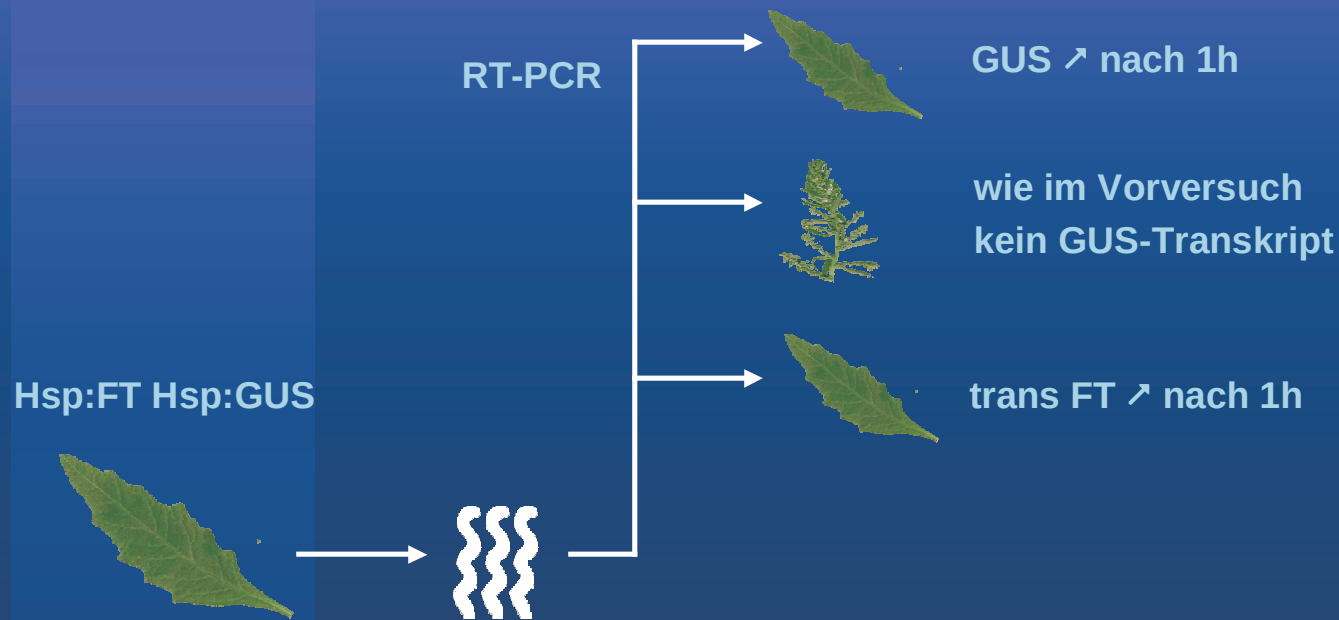


mRNA Transport

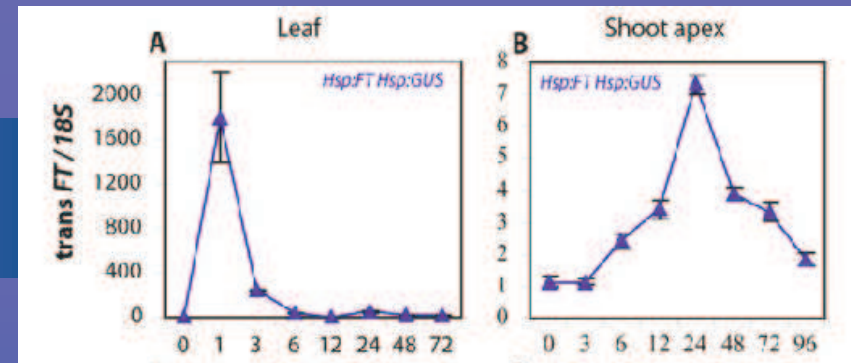


- Wo lassen sich mRNA Transkripte nachweisen ?

frühere Studien lassen vermuten, die FT mRNA könne im Phloem zur Zweigspitze transportiert werden

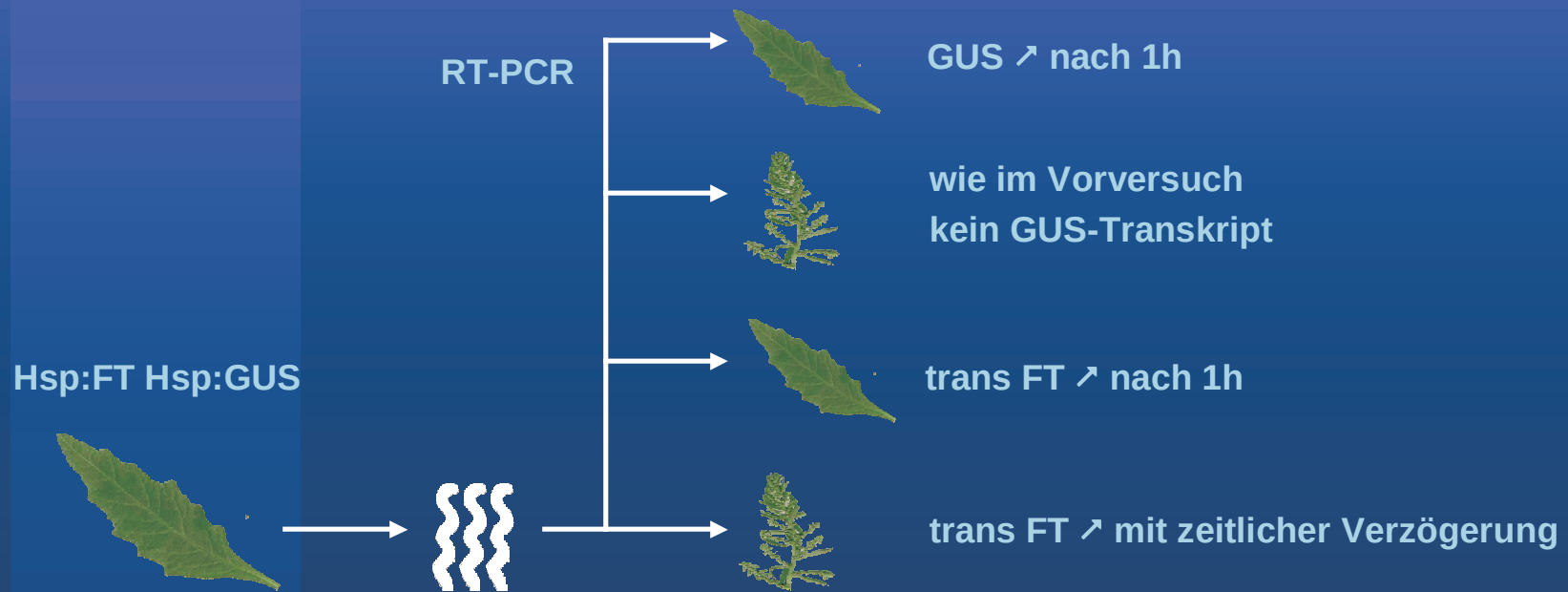


mRNA Transport



- Wo lassen sich mRNA Transkripte nachweisen ?

frühere Studien lassen vermuten, die FT mRNA könne im Phloem zur Zweigspitze transportiert werden



Transport der FT mRNA

- Wo lassen sich mRNA Transkripte nachweisen ?

frühere Studien lassen vermuten, die FT mRNA könne im Phloem zur Zweigspitze transportiert werden

- Ergebnis:

das Hitze-Induzierte transgene FT Transkript wandert scheinbar vom Blatt in die Zweigspitze

GUS hingegen bleibt im Blatt, wandert nicht

es handelt sich nicht um eine systemische Induktion des Hsp-Promotors, da Hsp:GUS in der Zweigspitze nicht exprimiert

Übersicht



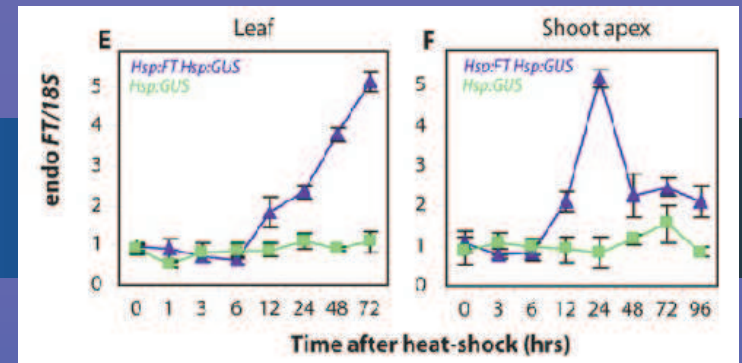
- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?
- Lokale Induktion von FT
 - „Blühen im Labor“
- Transport der FT mRNA
 - „Vom Blatt in den Zweig“
- Endogenes FT
 - „Eine Rückkopplung“
- Kinetik d. Signaltransduktion
 - „Datenhighway Phloem“
- Long day Induktion
 - „Blühen in der Natur“
- Zusammenfassung

Endogenes FT

- Wie verhält es sich bei diesen Versuchen mit dem endogenen FT ?
Wird es ebenfalls induziert / exprimiert ?

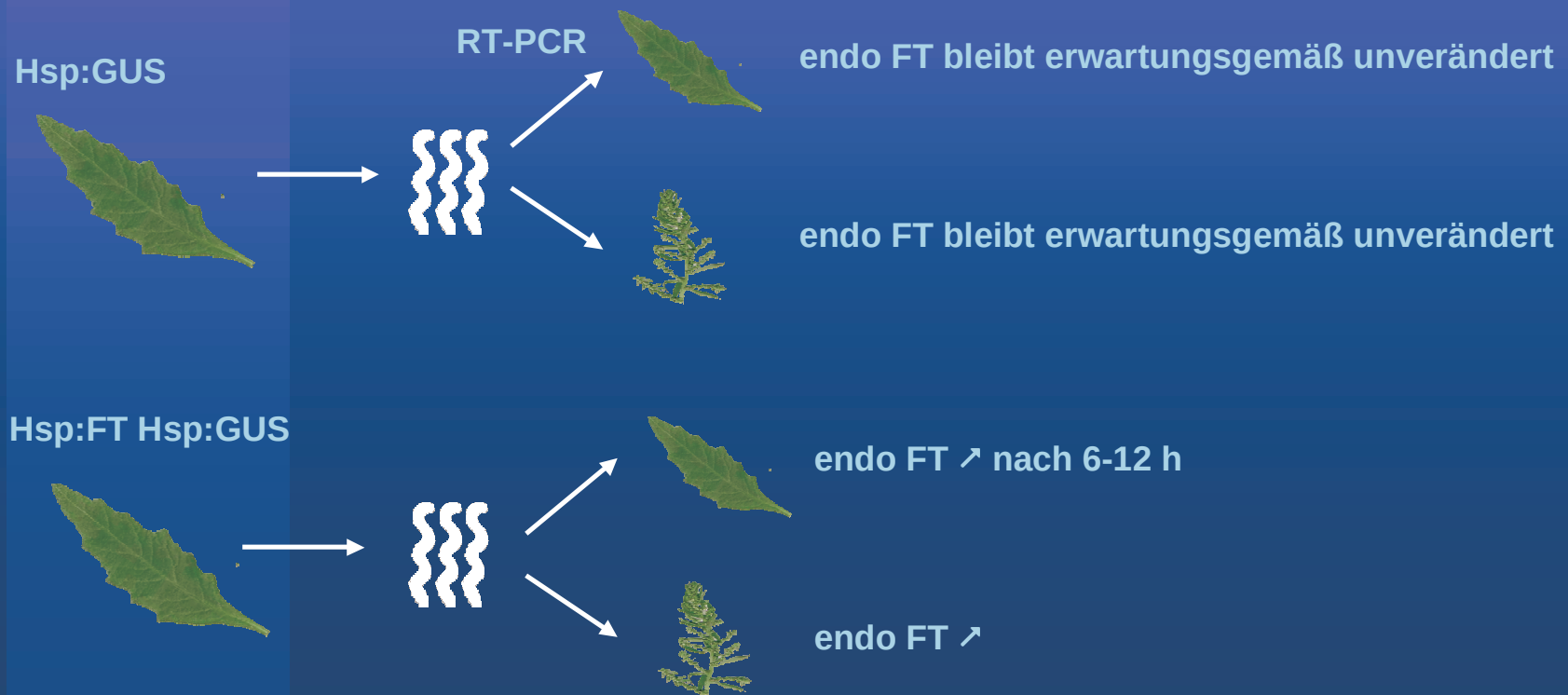
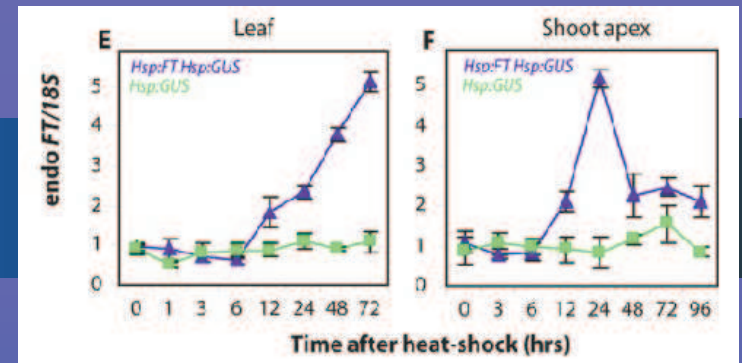
Endogenes FT

- Wie verhält es sich bei diesen Versuchen mit dem endogenen FT ?
Wird es ebenfalls induziert / exprimiert ?



Endogenes FT

- Wie verhält es sich bei diesen Versuchen mit dem endogenen FT ?
Wird es ebenfalls induziert / exprimiert ?



Endogenes FT

- Wie verhält es sich bei diesen Versuchen mit dem endogenen FT ?
Wird es ebenfalls induziert / exprimiert ?

- Ergebnis:

(transgenes) FT scheint seine eigene (endogene) Expression zu induzieren,
es kommt zum autoregulatorischen Feedback

endogene FT Expression ist auch 3 Tage nach Hitzeschock nachweisbar,
obwohl Pflanzen unter nicht-induktiven short-day Bedingungen gehalten werden !

Fazit: Sind die Bedingungen zum Blühen einmal gegeben, gibt es kein zurück mehr

Endogenes FT

- Das Auftreten eines positiven Feedbacks bestätigt klassische Experimente:

zum Beispiel kann ein Blatt einer induzierten Pflanze bei Verpflanzungsversuchen bis zu 7 weitere Pflanzen induzieren !

Spitzen, die an induzierte Pflanzen verpflanzt werden, können selbst weitere Pflanzen induzieren.

Um das Blüh-Signal jeweils stark genug zu halten ist ein positives Feedback erforderlich.



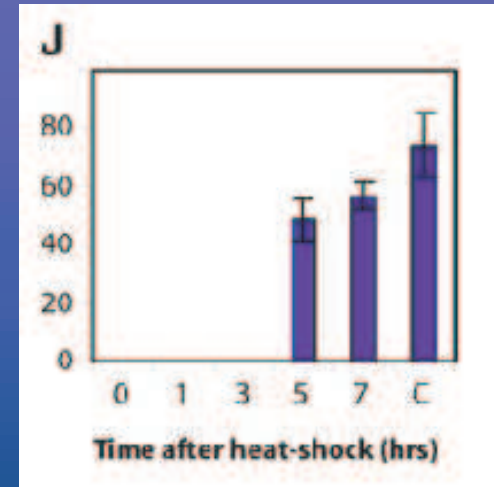
Übersicht



- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?
- Lokale Induktion von FT
 - „Blühen im Labor“
- Transport der FT mRNA
 - „Vom Blatt in den Zweig“
- Endogenes FT
 - „Eine Rückkopplung“
- Kinetik d. Signaltransduktion
 - „Datenhighway Phloem“
- Long day Induktion
 - „Blühen in der Natur“
- Zusammenfassung

Kinetik der Signaltransduktion

- Wie schnell wird das Signal zum Blühen weitergeleitet ?



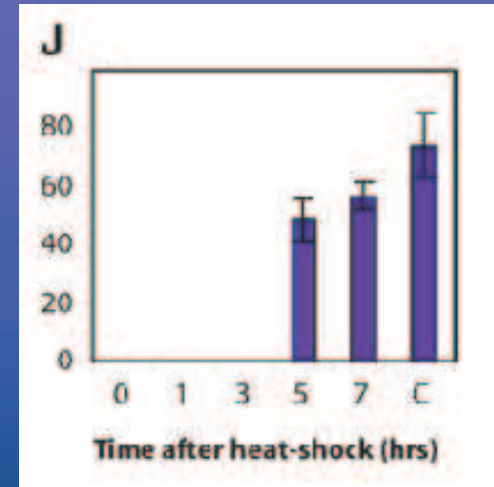
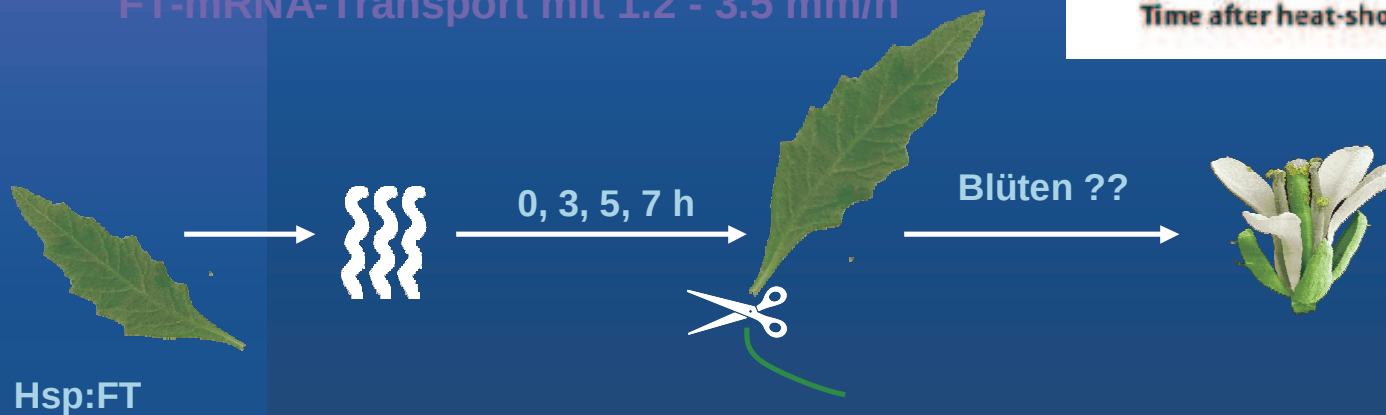
Kinetik der Signaltransduktion

- Wie schnell wird das Signal zum Blühen weitergeleitet ?

$2 < t < 5$ h nötig, um Signal zu transduzieren

Abstand Blatt-Zweig = 6-7 mm

FT-mRNA-Transport mit 1.2 - 3.5 mm/h



Übersicht



- Historische Suche nach dem Florigen
 - Was wissen wir heute ?
 - Lokale Induktion von FT
 - Transport der FT mRNA
 - Endogenes FT
 - Kinetik d. Signaltransduktion
 - Long day Induktion
 - Zusammenfassung
- „Blühen im Labor“
 - „Vom Blatt in den Zweig“
 - „Eine Rückkopplung“
 - „Datenhighway Phloem“
 - „*Blühen in der Natur*“

Induktion mittels long-day shift

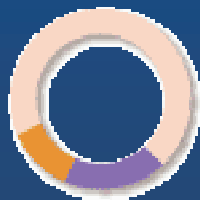
- Bisher wurde nur mittels des Hitzeschock-Systems induziert. Lässt sich die FT mRNA und ihr autoregulatorisches Feedback auch unter physiologischen Bedingungen nachweisen ?

Induktion mittels long-day shift

- Bisher wurde nur mit Hitzeschock - Systemen induziert.
Lässt sich die FT mRNA und ihr autoregulatorisches Feedback auch unter physiologischen Bedingungen nachweisen ?

„Wildtyp“ Pflanzen werden durch einen Wechsel von SD → LD Bedingungen zum Blühen angeregt.

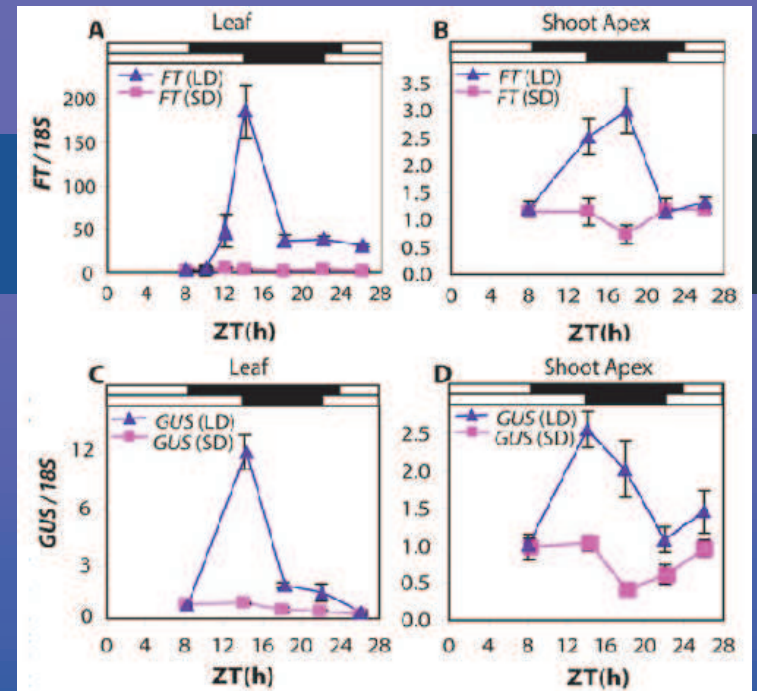
Das Reportergen GUS wird in transfizierten Pflanzen über den natürlichen FT-Promotor exprimiert:



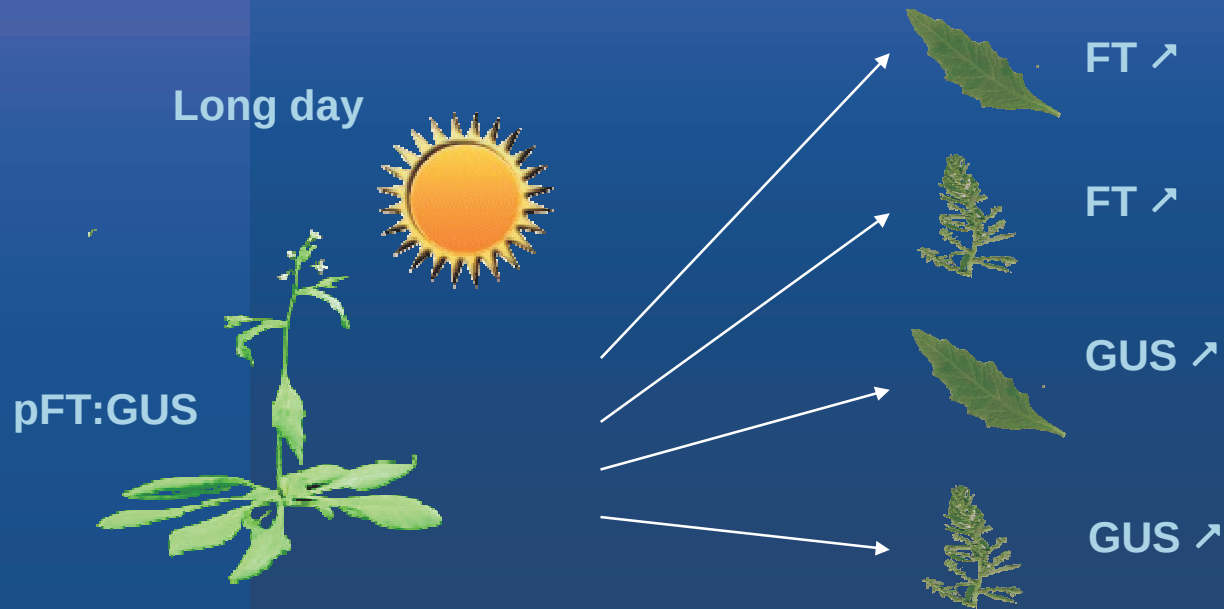
Verwendetes Konstrukt :

pFT : GUS

LD Induktion



RT-PCR



Induktion mittels long-day shift

- Bisher wurde nur mit Hitzeschock - Systemen induziert. Lässt sich die FT mRNA und ihr autoregulatorisches Feedback auch unter physiologischen Bedingungen nachweisen ?

- Ergebnis:

Auch bei natürlicher Induktion findet man FT mRNA im Blatt und in der Zweigspitze.

FT induziert seinerseits den FT-Promotor

Ob die chronologische Abfolge der Effekte die bisherigen Erkenntnisse bestätigt, ist allerdings fraglich. Eine höhere zeitliche Auflösung des Experiments (mehr Messpunkte) wäre anzuraten.

Übersicht



- Historische Suche nach dem Florigen
- Was wissen wir heute ?

- | | | |
|---------------------------------|---|--------------------------------|
| ● Lokale Induktion von FT | - | „Blühen im Labor“ |
| ● Transport der FT mRNA | - | „Vom Blatt in den Zweig“ |
| ● Endogenes FT | - | „Eine Rückkopplung“ |
| ● Kinetik d. Signaltransduktion | - | „Datenhighway Phloem“ |
| ● Long day Induktion | - | „ <i>Blühen in der Natur</i> “ |
| | | |
| ● Zusammenfassung | | |

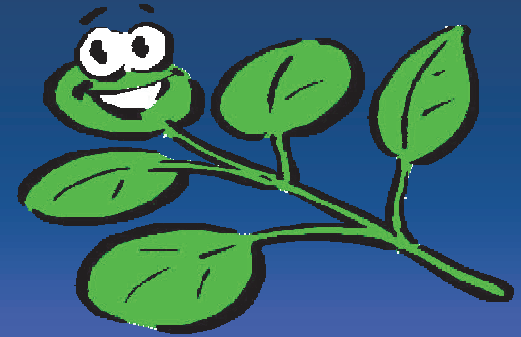
Zusammenfassung

- FT mRNA ist Teil des mobilen floralen Stimulus, der seit > 70 Jahren gesucht wird.
- Eine zusätzliche Beteiligung des FT Proteins oder anderer Gene an der Transduktion kann nicht ausgeschlossen werden.
- Am wahrscheinlichsten erscheint der direkte Transport der FT mRNA durch das Phloem. Dabei tritt sowohl im Blatt als auch in der Zweigspitze ein autoregulatorisches Feedback auf.
- Neben einem einfachen Transport wäre auch eine Reinduktion von FT entlang des Signalwegs im Rahmen eines Relay-Mechanismus denkbar.

Referenzen

- Huang et al., The mRNA of the Arabidopsis Gene FT Moves from Leaf to Shoot Apex and Induces Flowering, Science, 309, 1696-1696 (2005)
- Fosket, D.E., Plant Growth & Development, A Molecular Approach, 495 (1994)
- King and Zeevaart, Enhancement of Phloem Exudation from Cut Petioles by Chelating Agents, Plant Physiol., 56, 96-103 (1974)
- Zeevaart, Physiology of Flower Formation, Annu. Rev. Plant. Physiol., 27, 321-348 (1976)
- Sakuth et al., Specific Proteins in Sieve-Tube Exudates of *Ricinus communis* L. Seedlings: Separation, Characterization and *in vivo* Labeling, Planta, 191, 207-213 (1993)
- Marentes, Grusak, Mass Determination of low-molecular-weight Proteins in Phloem Sap Using MALDI-TOF-MS, J. Exp. Bot., 49, 903-911 (1998)
- Kehr et al., Analysis of Phloem Protein Patterns from Different Organs of *Cucurbita maxima* Duch. by MALDI-TOF-MS Combined with SDS-PAGE, Planta, 207, 612-619 (1999)
- Koorneef et al., Genetic Control of Flowering Time in Arabidopsis, Annu. Rev. Plant Physiol., 49, 345-370 (1998)
- Xoconostle-Cazares et al., Plant Paralog to Viral Movement Protein that Potentiates Transport of mRNA into the Phloem, Science, 283, 94-98 (1999)
- Kühn et al., Macromolecular Trafficking Indicated by Localization and Turnover of Sucrose Transporters in Enucleate Sieve Elements, Science, 275, 1298-1300 (1997)
- Lucas, W.J., RNA-based Information Superhighway in Plants, Dev. Biol., 222, 31-32 (2000)
- Hofmann-Benning et al., Comparison of peptides in the Phloem Sap of Flowering and Non-Flowering *Perilla* and Lupine Plants Using Microbore HPLC Followed by MALDI-TOF-MS, Planta., 216, 140-147 (2002)
- Wigge et al., Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in *Arabidopsis*, Science, 309, 1056-1058 (2005)
- Blazquez, M.A., The Right Time and Place for Making Flowers, Science, 309, 1024-1025 (2005)

2006/07/07



The mRNA of the Arabidopsis Gene FT Moves from Leaf to Shoot Apex and Induces Flowering

Huang et al., Science, 309, 1694-1696 (2005)

Danke für Ihre Aufmerksamkeit...