

Diss. ETH Nr. 11238

The Overexpression of Different Thionin Isoforms in *Arabidopsis thaliana*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Sönke Holtorf
Dipl. Biologe
Christian-Albrechts-Universität Kiel
born January 6th, 1964
in Schleswig,
Bundesrepublik Deutschland

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Klaus Apel, examiner
PD Dr. Gunter Neuhaus, co-examiner
Dr. Holger Bohlmann, co-examiner

Zürich 1995

Abstract

To evaluate the role of thionins in plant defence we followed the classical approach of overexpressing selected thionin cDNAs in *Arabidopsis thaliana*. For this purpose three constitutive, one inducible and other promoters with potentially interesting expression patterns were characterized. Two genomic thionin clones were available from barley; their respective 1.5 kb promoter regions were fused to the *uidA* reporter gene and the expression pattern was analysed in transgenic tobacco plants. One of the two clones (*BTH7*) showed a distinct expression confined to the pith of the stem and the mid-veins of the leaves whereas clone *BTH6* was strongly expressed in all organs of the plant except roots. Additionally, the promoter was further positively and negatively regulated by light in different organs of the seedling. This promoter was selected as a possible candidate for the overexpression of thionin cDNAs in *Arabidopsis thaliana*. In parallel, a reliable efficient transformation system was set up using root explants of the *Arabidopsis* accession C24; the expression of the thionin promoter (*BTH6*) was compared to two 35S-promoters; one of which was equipped with an additional translational enhancer sequence. Furthermore, the soybean heat-shock-promoter (Gmhsp 17.3) and an *Arabidopsis* specific ubiquitin promoter (*UBQ1*) were included in this study. The promoters were ligated to the *uidA* gene and 24 stably transformed lines were quantitatively analysed for promoter strength. Faithful heat-shock induction in seedlings, rosette leaves and roots was achieved at 35°C in a limited number of tested lines. Unexpectedly, the thionin promoter (*BTH6*) was not efficiently working whereas the ubiquitin promoter led to a relatively strong constitutive expression. With respect to promoter strength the 35S Ω -promoter turned out to be superior to all other constructs in all organs and developmental stages of the *Arabidopsis* plant. Consequently, this expression cassette was used to express three heterologous cDNAs specific for a leaf thionin from barley, for viscotoxin A3 from mistletoe and crambin from *Crambe abyssinica* in *Arabidopsis*. Transgenic lines were screened on mRNA level and found to transcribe the transgenes faithfully. The transcript levels of the three constructs were accumulating to equal levels. Protein data support the view that all mRNAs are efficiently translated and processed and give rise to a properly folded protein of the right size. The three proteins are present in equally high amounts in all organs of the plant. Studies on the subcellular targeting indicate a localization of the viscotoxin polypeptide in the cytoplasm and in protein bodies of the vacuole. Subsequently, lines with single copy integrations were identified and the homozygous lines propagated. These are currently tested for their effect on several well characterized host-pathogen systems in *Arabidopsis*. Preliminary results indicate a lethal effect of the *DB4*-protein on the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404. Expressing the thionin variants in

Arabidopsis thaliana seems to lead to a delay in symptom development in the transgenics when these were infected with *Fusarium oxysporum*. No differences between wildtype and transgenics could be observed when plants were infected with the fast growing fungi *Rhizoctonia solani*, *Pythium spec.* and *Plectosphaerella* strains. Additional fungal and bacterial pathogens are currently being tested in cooperating labs. In contrast to the other isoforms, the viscotoxin exhibits lethal effects on *Arabidopsis* plants under certain growth conditions.

Zusammenfassung

Um die Rolle der Thionine bei die Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber Phytopathogenen zu testen, wurde versucht verschiedene cDNAs in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu exprimieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden mehrere potentiell vielversprechende Promotoren auf ihre Expressionsstärke in dem gewählten System getestet. Es standen zwei gut charakterisierte genomische Thioninklone aus der Gerste zur Verfügung. Deren Promotoren wurden vor das *uidA*-Reportergen kloniert und die Expression in transgenen Tabakpflanzen analysiert. Einer der Promotoren (*BTH7*) zeigte eine auf das Mark des Stammes und das vaskuläre System der Blätter beschränkte Aktivität. Der zweite Promotor (*BTH6*) hingegen war in allen Organen mit Ausnahme der Wurzeln aktiv und zeigte desweiteren eine positive und negative Lichtregulation in den Keimblättern bzw. dem Hypokotyl von Keimlingen. Aufgrund der starken Expression in der Epidermis wurde diese Regulationssequenz als potentieller Promotor für die Ueberexpression von cDNAs in *Arabidopsis* vorgesehen. Parallel wurde ein effizientes Transformationssystem für den Oekotyp C24 aufgebaut. Die relative Stärke des Thioninpromotors (*BTH6*) wurde gegen verschiedene andere Promotoren getestet. Hierzu gehörten zwei 35S-Promotoren; einer davon war mit einer zusätzlichen translationalen Verstärkersequenz ausgerüstet. Weiterhin wurde der Hitzeschock-Promotor aus der Sojabohne (*Gmhspl 17.3*) und ein Ubiquitin-spezifischer Promotor (*UBQ1*) aus *Arabidopsis* in diesen Test mit eingeschlossen. Sämtliche Promotoren wurden mit dem *uidA*-Gen fusioniert und die Promotorstärke in jeweils 24 stabil transformierten Linien bestimmt. Für den verwendeten Hitzeschock-Promotor konnte eine optimale Induzierbarkeit (35°C) lediglich bei wenigen Linien demonstriert werden. Im Gegensatz zum Thioninpromotor (*BTH6*), der keine oder eine nur sehr schwache Aktivität aufwies, führte der Ubiquitinpromotor zu einer starken konstitutiven Expression des *uidA*-Gens. Die mit Abstand stärkste Expression in allen Organen und

Entwicklungsstadien der Pflanze zeigte allerdings der 35S-Promotor mit dem translationalen Verstärkerelement. Folgerichtig wurde dieser für die geplante Ueberexpression der thioninspezifischen cDNAs ausgewählt.

Es wurden transgene *Arabidopsis* Linien produziert, die spezifische cDNAs für ein Blattthionin der Gerste, das Viscotoxin A3 der Mistel, sowie das Crambin von *Crambe abyssinica* enthielten. Alle drei Transgene zeigten auf Northern-Blot Ebene eine starke konstitutive Transkriptakkumulation. Die Linien mit der stärksten Expression wurden selektioniert. Durch Western-Blot Analyse konnte eine wiederum starke Translation und die korrekte Prozessierung des Polypeptids nachgewiesen werden. Das Viscotoxin wurde dabei im gleichen Kompartiment abgelagert wie in der Mistel. Für alle ausgewählten Linien wurde die Anzahl der Kopien der Transgene pro Genom bestimmt und homozygote Linien identifiziert und propagiert. Diese werden zur Zeit hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Abwehrverhalten der Pflanzen gegenüber Phytopathogenen untersucht. Diese Versuche basieren auf gut charakterisierten Pathogen-Wirt Systemen in *Arabidopsis thaliana*. Vorläufige Ergebnisse legen einen lethalen Effekt des Blattthionins auf den Agrobakterienstamm LBA 4404 nahe. Weiterhin scheinen alle transgenen Pflanzen eine verzögerte Symptomentwicklung in den ersten Tagen nach Infektion mit *Fusarium oxysporum* aufzuweisen. Keine Verbesserung der Resistenz wurde gegenüber den schnell wachsenden Pathogenen *Rhizoctonia solani*, *Pythium spec.* und *Plectosphaerella* gefunden. Unter bestimmten Anzuchtbedingungen wirkt sich die Präsenz des Viscotoxins lethal auf die transgenen Pflanzen aus.