



Doctoral Thesis

Function and expression studies of PosF21, a bZIP protein in *Arabidopsis thaliana*

Author(s):

Schrott, Martin Franz

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001534507> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 11302

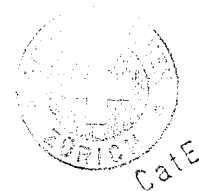
Function and Expression Studies of PosF21, a bZIP Protein in *Arabidopsis thaliana*

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Martin Franz Schrott

dipl. Ing.-Agr. ETH
born November 23, 1960
citizen of Zürich



accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ingo Potrykus, examiner
Prof. Dr. Klaus Apel, co-examiner

Zürich, 1995

Summary

The *PosF21* gene from *Arabidopsis thaliana* was previously isolated with a DNA probe encoding a glutamine polypeptide. *PosF21* encodes the 45 kDa protein PosF21. The protein belongs to the bZIP (basic domain-leucine zipper) class, and is a putative transcription factor. In the PosF21 DNA-binding domain, a highly conserved arginine residue is changed to lysine.

PosF21 promoter activity and putative regulation by PosF21 in plant cells were assessed. Transient transfection of *Arabidopsis* and tobacco (*Nicotiana tabacum*) protoplasts with a *PosF21* promoter::*uidA* transcriptional fusion reporter plasmid demonstrated the activity of a 0.3 kb *PosF21* promoter fragment in both plant species. Cotransfection of the reporter plasmid with an over-expression Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter::*PosF21* transcriptional fusion effector plasmid revealed *trans*-activation of the *PosF21* promoter, but not the CaMV 35S promoter, by PosF21. Cotransfection with *PosF21* mutants demonstrated the essential role of the PosF21 bZIP domain for *trans*-activation. A bZIP domain deletion mutant did not *trans*-activate the *PosF21* promoter, whereas the isolated bZIP domain showed full activation.

Direct interaction of PosF21 with its own promoter was not detected in an electrophoresis mobility shift assay including a purified PosF21 fusion protein and *PosF21* promoter fragments containing putative protein recognition motifs.

In contrast to protoplasts, transgenic *Arabidopsis* plants harboring the *PosF21* promoter::*uidA* reporter sequence did not show *trans*-activation *in planta* by PosF21. Upon transient transfection of leaf cells via microprojectile bombardment with the CaMV 35S promoter::*PosF21* effector plasmid, no increased *PosF21*-promoter activity was observed.

In order to assess PosF21 function *in planta*, transgenic *Arabidopsis* plants were generated harboring over-expression and antisense CaMV 35S promoter::*PosF21* transcriptional fusion constructs. In Northern hybridization experiments, *PosF21* over-expression plants had drastically increased levels of *PosF21* mRNA. In *PosF21* antisense plants, both *PosF21* sense and antisense mRNAs were detected. The sense *PosF21* mRNA levels were not decreased but equal to the antisense RNA levels. PosF21 protein levels were examined immunologically by Western hybridization. In *PosF21* over-expression plants, increased PosF21 levels correlated with increased *PosF21* mRNA levels. In *PosF21* antisense plants, levels of a 45 kDa signal possibly corresponding to PosF21 were decreased. Phenotypes of over-expression and antisense plants were not different from the wild-type when grown *in vitro* or in soil under short and long day conditions. Plants of one over-expression and one antisense transgenic line showing no or retarded bolting were found to be tetraploid.

In order to assess *PosF21* expression patterns and levels in plants, *PosF21* promoter activity was examined in transgenic *Arabidopsis* plants harboring transcriptional fusions

of 0.3 and 2.8 kb *PosF21* promoter fragments to *uidA*. The 2.8 kb fragment was 10³fold more active than the 0.3 kb fragment in plants. In histochemical assays, staining observed was strong with the 2.8 kb fragment but absent with the 0.3 kb fragment. The *PosF21* promoter was active in vegetative and generative stages of plant development and in roots, stems, leaves, flower organs and pollen. Stem and leaf sections revealed *PosF21* promoter activity in all tissues. Preferential staining of vascular tissues, stomata and trichomes was observed.

One transgenic *Arabidopsis* line displayed an altered habitus with stunted growth, multiple shoot formation and sterility caused by a recessive mutation not linked to the inserted *nptII* marker gene. In another line, the agamous phenotype was found.

Zusammenfassung

Das *PosF21* Gen aus *Arabidopsis thaliana* war in einer früheren Arbeit mit einer DNA-Sonde isoliert worden, die für ein Glutamin-Polypeptid kodiert. *PosF21* kodiert das 45 kDa grosse Protein PosF21. Das Protein gehört zur Klasse der "basic domain-leucine zipper"- (bZIP)-Proteine und ist ein mutmasslicher Transkriptionsfaktor. In der DNA-Bindungsdomäne von PosF21 ist ein sonst streng konservierter Argininrest durch Lysin ersetzt.

Die Aktivität des *PosF21*-Promoters und dessen mutmassliche Regulation durch PosF21 wurden bestimmt. Transfektionsexperimente mit *Arabidopsis*- und Tabakprotoplasten und einem *PosF21*-Promoter::*uidA*-Reporterplasmid zeigten die Aktivität des *PosF21*-Promoters in beiden Arten. Kotransfektion des Reporterplasids mit einem Effektorplasmid, mit dem *PosF21* durch den Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S-Promoter überexprimiert wurde, ergaben eine *trans*-Aktivation des *PosF21*-Promoters, nicht aber des CaMV 35S-Promoters, durch PosF21. Kotransfektion mit *PosF21*-Mutanten zeigten die wesentliche Funktion der bZIP-Domäne für die *trans*-Aktivation. Eine bZIP-Deletionsmutante aktivierte den *PosF21*-Promoter nicht, während die isolierte bZIP-Domäne dazu vollumfänglich in der Lage war.

Eine direkte Wechselwirkung zwischen PosF21 und seinem eigenen Promoter konnte in einem Elektrophoreseversuch mit einem gereinigten PosF21-Fusionsprotein und *PosF21*-Promoterfragmenten, welche mögliche Bindungsstellen enthielten, nicht gezeigt werden.

Im Gegensatz zu den Protoplasten zeigten transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die das *PosF21*-Promoter::*uidA*-Reporterkonstrukt enthielten, keine *trans*-Aktivation durch PosF21. In den Blattzellen, die durch Partikelbeschuss mit dem CaMV 35S-Promoter::*PosF21*-Effektorplasmid transfiziert worden waren, konnte keine erhöhte *PosF21*-Promoteraktivität beobachtet werden.

Um die Funktion von PosF21 *in planta* abzuklären, wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen produziert, die Ueberexpressions- und Gegensinn-Konstrukte von *PosF21* enthielten. In Northern-Experimenten ergaben sich in den Pflanzen, die das Ueberexpressions-Konstrukt enthielten, deutlich erhöhte *PosF21*-mRNA-Konzentrationen. In den Pflanzen, die das *PosF21*-Gegensinn-Konstrukt enthielten, waren die *PosF21*-mRNA-Konzentrationen nicht gesenkt, sondern gleich denen der *PosF21*-Gegensinn-mRNA. Die Konzentrationen des PosF21-Proteins wurden immunologisch in Western-Experimenten untersucht. In den Pflanzen, die das *PosF21*-Ueberexpressions-Konstrukt enthielten, korrelierten erhöhte PosF21-Konzentrationen mit den erhöhten *PosF21*-mRNA-Konzentrationen. In den Pflanzen, die das Gegensinn-Konstrukt enthielten, waren die Konzentrationen eines 45 kDa grossen Proteins, das möglicherweise PosF21 entspricht, gesenkt. Die Phänotypen der Ueberexpressions- und Gegensinn-Pflanzen waren vom Wildtyp nicht zu unterscheiden, wenn die Pflanzen *in*

in vitro oder in Erde unter Kurz- oder Langtagsbedingungen angezogen wurden. Je eine Ueberexpressions- und Gegensinn-Linie, deren Schossen verzögert oder unterdrückt war, stellten sich als tetraploid heraus.

Um Expressionsmuster und -stärke von *PosF21* in Pflanzen zu klären, wurde die *PosF21*-Promoteraktivität in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen bestimmt, die Reporterkonstrukte aus *PosF21*-Promoterfragmenten von 0.3 kb und 2.8 kb und *uidA* enthielten. Das 2.8 kb-Fragment war etwa tausendfach aktiver als das 0.3 kb-Fragment. Histochemische Untersuchungen ergaben, dass die Färbung mit dem 2.8 kb-Fragment stark, diejenige mit dem 0.3 kb-Fragment dagegen nicht feststellbar war. Der *PosF21*-Promoter war in den vegetativen und generativen Entwicklungsstadien aktiv, und zwar in Wurzeln, Stengeln, Blättern, Blütenorganen und im Pollen. Schnitte durch Stengel und Blätter zeigten, dass der *PosF21*-Promoter in allen Geweben aktiv ist. Leitbündel, Spaltöffnungen und Blatthaare wurden bevorzugt gefärbt.

Eine der transgenen *Arabidopsis*-Linien zeigte einen veränderten Phänotypen; die Pflanzen waren gestaucht, bildeten eine Vielzahl von Sprossen und waren steril. Dieser Phänotyp wurde durch eine rezessive Mutation verursacht, die nicht mit dem eingefügten *nptII*-Markergen verknüpft ist. In einer anderen Linie wurde der "agamous"-Phänotyp gefunden.