



## Doctoral Thesis

# Charakterisierung des ABI1-Genproduktes aus *Arabidopsis thaliana* und Identifizierung eines in vivo interagierenden potentiellen Transkriptionsfaktors

**Author(s):**

Leube, Martin Peter

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001616066> →

**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 Nr. 11594

**Charakterisierung des ABI1-Genproduktes aus  
*Arabidopsis thaliana* und Identifizierung eines  
*in vivo* interagierenden potentiellen  
Transkriptionsfaktors**

**Abhandlung  
zur Erlangung des Titels  
Doktor der Naturwissenschaften  
der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule  
Zürich**

**vorgelegt von  
Martin P. Leube  
Diplomchemiker, Universität Freiburg (Breisgau), Deutschland**

**Geboren am 11. Juli 1964  
von Deutschland**

**Angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. N. Amrhein, Referent  
Prof. Dr. K. Apel, Korreferent  
PD Dr. E. Grill, Korreferent**

**Zürich, 1996**

## Zusammenfassung

Die Mutante *abil* von *Arabidopsis thaliana* ist pleiotrop insensitiv gegenüber dem Pflanzenhormon Abscisinsäure. Die dominante *abil*-Mutation führt u. a. zur Beeinträchtigung der Samenruhe, des Stomataschlusses und zur Insensitivität gegenüber Abscisinsäure im Wurzelwachstum.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifizierung der *ABI1*-cDNA und die Charakterisierung des heterolog exprimierten *ABI1*-Proteins. Das von der cDNA abgeleitete *ABI1*-Protein enthält 434 Aminosäuren und besteht aus zwei Domänen. Für die amino-terminale Domäne von 100 Aminosäuren kann durch Sequenzvergleiche mit bekannten Proteinen keine Funktion ermittelt werden. 330 Aminosäuren im C-terminalen Bereich bilden die katalytische Domäne einer Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatase des Typ 2C. Das Protein enthält am Übergang der beiden Domänen ein Motiv für eine potentielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle und in der Phosphatasedomäne die Konsensussequenz für eine potentielle ATP/GTP-Bindungsstelle.

Das *ABI1*-Protein wurde in *E. coli* als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase am amino-terminalen Ende von *ABI1* exprimiert (*GST-ABI1*) und zur Homogenität gereinigt. Ausserdem wurde es in *E. coli* als Fusionsprotein mit sechs Histidinresten am C-terminalen Ende exprimiert. In der Hefe *Pichia pastoris* wurde das Protein mit einem zusätzlichen Arginin am amino-terminalen Ende exprimiert.

Die Proteinphosphataseaktivität der heterolog exprimierten *ABI1*-Proteine zeigt Charakteristika, die für Proteinphosphatasen des Typ 2C kennzeichnend sind. Die Aktivität ist absolut  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig und lässt sich nicht mit Calyculin A oder Okadaisäure hemmen, zwei Inhibitoren, die für Proteinphosphatasen des Typs 1 und 2A spezifisch sind. Darüber hinaus können  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen durch  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen, aber nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  ersetzt werden. Die apparente Michaelis-Menten-Konstante für *in vitro* phosphoryliertes Casein als Substrat beträgt  $5,7 \pm 0,85 \mu\text{M}$  für das *GST-ABI1*-Fusionsprotein und  $7,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$  für das in Hefen exprimierte Protein. Gelchromatographische Analysen belegen, dass das Enzym *in vitro* als Monomer aktiv ist.

Der Vergleich der Wildtyp- mit der Mutantenform des gereinigten *GST-ABI1* bzw. *GST-abil*-Proteins zeigt, dass das Mutantenprotein unter physiologischen Bedingungen ( $0,4 \text{ mM Mg}^{2+}$ , pH 7,3) etwa 15fach weniger aktiv ist. Die spezifische Aktivität der Mutantenform bei optimaler  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration ( $20 \text{ mM}$ ) beträgt etwas weniger als ein Fünftel der Wildtypform. Für die halbmaximale Aktivierung werden etwa dreifach höhere  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzen-

trationen benötigt (2,5 statt 0,8 mM). Das pH-Optimum für beide Enzyme liegt bei 7,9.

Die Wirkung des unter physiologischen Bedingungen weitgehend inaktiven Mutanten-*abi1*-Proteins ist somit dominant negativ und kann durch Funktionsausfall eines Proteinkomplexes, an dem das Mutantenprotein *abi1* beteiligt ist, erklärt werden.

Um Proteine zu identifizieren, die mit *ABI1* interagieren, wurde ein *in vivo* Testsystem für Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Unter 200.000 Klonen konnten zwei Positive gefunden werden. Die cDNAs der beiden Klone kodieren für einen identischen, potentiellen Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis*.

Da Hormone in der Pflanze vielfach wechselwirken, kann ein geschlossenes Bild ihres Zusammenwirkens nur erlangt werden, wenn Mutanten für alle Hormone gefunden und charakterisiert sind. Für Cytokinin als einziges der fünf klassischen Pflanzenhormone waren bisher keine Mutanten bekannt. Deshalb wurde eine *Screening*-Methode etabliert, um solche Mutanten identifizieren zu können. Die Fähigkeit von Cytokinin, im Zusammenspiel mit Auxin die Zelldifferenzierung zu steuern, wurde für die Erkennung von Cytokinin-insensitiven Mutanten von *Arabidopsis thaliana* ausgenützt. Unter 470.000 mutagenisierten Samen konnten 41 Mutanten isoliert werden. 14 unabhängige Mutanten wurden näher charakterisiert. Darunter konnten sechs Cytokinin-insensitive Mutanten identifiziert werden. Sie können in drei Gruppen eingeteilt werden: Eine Gruppe umfasst drei Mutanten, die sensitiv gegenüber Ethylen, Auxin, Abscisinsäure und Cytokinin sind. Sie sind zwergwüchsig. Eine zweite Gruppe besteht aus zwei Mutanten, die Ethylen-, Abscisinsäure- und Cytokinin-insensitiv sind. Eine Mutante ist ausschliesslich sensitiv gegenüber Cytokinin. Sie stellt die erste bekannte Mutante dieser Art dar. Mindestens acht der 41 isolierten Mutanten sind allelisch zu einer Mutante, die als Abscisinsäure- und Ethylen-insensitive Mutante bereits bekannt war. Der Genlokus dieser Mutante wurde mit Hilfe von molekularen Markern auf Chromosom 2 kartiert.

## Summary

The *abil* mutant of *Arabidopsis thaliana* carries a dominant point mutation in the *abil* gene which causes pleiotropic insensitivity to the plant hormone abscisic acid. The mutant plants are impaired in seed dormancy and stomatal closure, and show abscisic acid-insensitive root growth.

This work presents the identification of the *ABI1*-cDNA and the characterization of the heterologously expressed ABI1-protein. The protein which can be deduced from the cDNA sequence consists of 434 amino acids and contains two domains. The N-terminal domain of 100 amino acids shows no significant homology to any known protein sequence. The C-terminal 330 amino acids form a serine/threonine-specific protein phosphatase catalytic domain of type 2C. A putative  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif is found between the two domains. The phosphatase domain contains a consensus sequence for putative ATP/GTP binding sites.

The ABI1-protein was expressed in *E. coli* and was purified to near homogeneity as a fusion protein with glutathione-S-transferase (GST-ABI1). A fusion protein with six histidine residue at the C-terminus was also expressed. In the yeast *Pichia pastoris* the protein was expressed with an additional arginine residue at the N-terminus.

The *ABI1*-protein showed all enzymatic properties which are typical for protein phosphatases of type 2C. The enzymatic activity was completely  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent and could not be inhibited by calyculin A or ocadaic acid, two inhibitors which are specific for phosphatases of type 1 and 2A. Furthermore, the enzyme was active in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$  but not with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  ions. The apparent Michaelis-Menten-constant for the enzyme, using *in vivo* phosphorylated casein as substrate was  $5.7 \pm 0.85 \mu\text{M}$  or  $7.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$ , for GST-ABI1 or the ABI1 protein expressed in yeast. Gel size exclusion experiments have shown that the enzyme is active *in vitro* as a monomer.

The comparison of mutant and wild-type protein indicated that the mutant protein is 15 times less active under physiological conditions (0.4 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.3). The specific activity at optimal  $\text{Mg}^{2+}$ -concentration (20 mM) for the mutant protein was five times lower than that of the wild type. Half maximal activation required three times higher  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations (0.8 mM versus 2.5 mM). The optimal pH for both enzymes was 7.9.

The dominance of a mutation which severely reduces the activity of a mutant protein can only be explained by poisoning of a protein complex containing the mutant protein.

To find possible interaction partners for ABI1 the "Two Hybrid System" was used. With this system *in vivo* protein interaction partners for a known protein can be found. Two positive clones were identified from 200,000 cDNA clones screened. They code for a potential transcription factor from *Arabidopsis*.

To get a survey of the action of plant hormones it is necessary to isolate mutants for all hormones. Cytokinin is the only classical plant hormone for which no insensitive mutants are known in the literature. A screening method was therefore established in order to find such mutants. The ability of cytokinin to regulate cell differentiation together with auxin was used to screen for cytokinin-insensitive mutants of *Arabidopsis*. From 470,000 seeds screened 41 mutants were isolated. 14 have been further characterized and six of these were found to be cytokinin-insensitive. They could be divided into three groups: The first group contains mutants which were insensitive to ethylene, abscisic acid, auxin and cytokinin. They were dwarfs. Members of a second group were ethylene-, abscisic acid- and BAP-insensitive. One mutant was only BAP-insensitive and it was the first known mutant of this kind. At least eight of the 41 mutants were allelic to an already known abscisic acid- and ethylene-insensitive mutant. The mutant gene locus of this mutant was mapped on chromosome 2 by using molecular markers.