

Diss. ETH Nr. 12209

**BIOCHEMICAL CHARACTERISATION OF GLYCINE-
RICH CELL WALL PROTEINS IN THE
FRENCH BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*) AND
IN WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM*)**

**A dissertation submitted to the
SWISS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences**

**presented by
GUNTER HAUF
Dipl. chem., University of Freiburg, Breisgau (Germany)**

**born 11.5.1964
in Reutlingen, Germany**

**Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
Dr. B. Keller, co-examiner**

Zürich, 1997

1 Summary

Glycine-rich proteins (GRPs) are one of the three main classes of structural proteins found in the cell wall matrix of plants. In plants, different cell types have varying amounts and compositions of structural proteins indicating that they are involved in the special function of a particular cell type. In the work presented here, two structurally different glycine-rich cell wall proteins, the fGRP1.8 from the dicot French bean and the wGRP1 from the monocot wheat have been characterised biochemically.

The expression of recombinant fGRP1.8 was studied in various expression systems. By using the eukaryotic baculovirus system, recombinant fGRP1.8 could be expressed in low amounts and was secreted into the supernatant of insect cells infected with recombinant baculoviruses. A strong interaction was found between recombinant fGRP1.8 and hydrophobic purification matrices. An intermolecular, possibly hydrophobic interaction resulting in aggregation of fGRP1.8 monomers was observed upon concentration procedures of fGRP. Several domains of the fGRP1.8 protein were overexpressed in *E. coli* and purified under non-denaturing conditions as fusion proteins consisting of glutathione-S-transferase (GST) and C-terminally fused fGRP sequences.

The secondary structures of GST and the GST/fGRP6R fusion protein representing a repetitive domain of the fGRP1.8 protein fused at the C-terminus of GST were determined by circular dichroism. From the spectra obtained from GST, a high α -helical secondary structure conformation was revealed in agreement with the X-ray data. The repetitive fGRP6R domain of the fGRP1.8 protein was calculated to be in a predominantly β -pleated conformation with a random conformation of about 30 %.

For the overexpressed peptides of the fGRP1.8 domains a metachromatic staining with Coomassie-R on SDS gels was observed.

A second GRP, wGRP1 from wheat was analysed. In contrast to GRP1.8 it does not contain tyrosine but has a higher content of phenylalanine and other hydrophobic amino acids. Parts of the wGRP1 sequence were built up step by step with synthetic oligonucleotides adapted to the preferred codon usage for highly expressed proteins used in *E. coli*. These wGRP sequences were overexpressed as GST fusion proteins in *E. coli* and purified under non-denaturing conditions. In contrast to the fGRP1.8 domains, the wGRP protein domains did not show a metachromatic staining on SDS-gels. This indicates that besides a low content of hydrophobic amino acid residues in the sequence, especially phenylalanine residues are responsible for the interaction with the Coomassie dye resulting in strong blue staining. *In vitro* ex-

periments revealed that under non-denaturing conditions, the wGRPD peptides showed a strong hydrophobic aggregation in solution. The expression of the wGRP1 protein was investigated in different plant organs. Polyclonal antibodies were raised against the purified GST/wGRPD fusion protein. wGRP1 was specifically detected by these wGRP1 antibodies in cell wall extracts of 10 d old wheat roots. It was specifically extracted from wheat cell walls by using the anionic detergent Triton X-100 but not under high salt conditions. This indicates that the wGRP1 protein interacts with itself or other cell wall components in a strongly hydrophobic manner.

fGRP1.8 is known to become insolubilised in the late stages of protoxylem development. In order to investigate the biochemistry of this insolubilisation, the possibility to cross-link fGRP1.8 under oxidative conditions was studied. To define domains within the fGRP1.8 protein involved in oxidative cross-linking, *in vitro* cross-linking studies were done under oxidative conditions with HRP and purified GST as well as GST/wGRPD and different GST/fGRP fusion proteins. Fusion proteins consisting of the N-terminal and C-terminal domains as well as the repetitive middle domain of the fGRP1.8 protein could be specifically cross-linked to high molecular weight aggregates. Such aggregates were not observed in cross-linking reactions with the GST protein or with the GST/wGRPD fusion protein under the same conditions. The cross-linking of the GST/fGRP fusion proteins could be inhibited by 1 mM DTT. The main difference between fGRP1.8 and wGRP1 protein is the complete lack of tyrosine amino acid residues in the latter. We propose a covalent cross-linking of the fGRP domains via tyrosine amino acid residues in the *in vitro* cross-linking assay. The interaction of a GST fusion protein containing the repetitive middle domain of the fGRP1.8 and cell walls derived from bean cell culture was investigated *in vitro*. An H_2O_2 cross-linking activity which was absent in salt extracted cells was observed. This indicates that a peroxidase associated ionically with the cell wall can use fGRP1.8 as substrate in a cross-linking reaction.

The fGRP1.8 protein was specifically digested by collagenase from *Clostridium histolyticum* although it does not contain the cleavage site typical for collagenase. This was shown by *in vitro* studies of digested GST/fGRP fusion proteins representing over 90 % of the fGRP1.8 sequence. These data confirm the recent observation that the hydrolysed primary cell walls of protoxylem cells in soybean mainly contain fGRP1.8 as structural protein. This in turn supports the hypothesis that fGRP1.8 is mainly responsible for the special chemical and physical properties of these special cell walls.

Zusammenfassung:

Glyzinreiche Proteine (GRPs) gehören zu einer der drei Hauptklassen von den in Zellwänden von Pflanzen vorkommenden, strukturellen Proteinen. Die variable Menge und Zusammensetzung der strukturellen Proteine in verschiedenen, pflanzlichen Zelltypen deuten auf ihre Wichtigkeit in der Bestimmung der speziellen Funktion eines jeden Zelltyps hin.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden zwei unterschiedliche strukturelle Zellwandproteine biochemisch charakterisiert: das fGRP1.8 aus der dikotylen Gartenbohne und das wGRP1 aus dem monokotylen Weizen.

Die Expression von rekombinanten fGRP1.8 Protein wurde in unterschiedlichen Expressions Systemen untersucht. Im eukaryotischen Baculo-virus System wurde fGRP1.8 in geringen Mengen synthetisiert und in den Überstand von Insektzellen, die mit rekombinanten Baculoviren infiziert waren, sezerniert.

Es wurde eine starke Wechselwirkung von fGRP1.8 mit hydrophoben Chromatographiematrizen gefunden. Nach der Konzentrierung von fGRP wurde eine Aggregation der fGRP1.8 Monomere gefunden, die auf einer intermolekularen, möglicherweise hydrophoben Wechselwirkung beruht. Verschiedene Domänen des fGRP1.8 Proteins konnten unter nativen Bedingungen in *E. coli* als Fusionsproteine, bestehend aus GST und C-terminal fusionierten fGRP Domänen, überexprimiert und bis zur Homogenität gereinigt werden.

Die Sekundärstruktur von GST und einem GST/fGRPR Fusionsprotein, welches aus GST und einer C-terminal fusionierten repetitiven Domäne des fGRP1.8 besteht, wurde mit Circular dichroismus bestimmt. Aus dem von GST erhaltenen Spektrum konnte, in Übereinstimmung mit röntgenstrukturellen Daten, ein hoher α -helicaler Anteil in der GST Sekundärstruktur ermittelt werden. Für die repetitiven fGRP6R Domäne wurde eine Sekundärstruktur aus vorwiegend β -Faltblatt Konformation mit 30 %igem 'Random' Anteil ermittelt. Bei den überexprimierten Peptiden der fGRP1.8 Domänen konnte eine metachromatische Färbung mit Coomassie-R in SDS Gelen entdeckt werden.

Ein zweites GRP, das wGRP1 aus Weizen, wurde ebenfalls untersucht. Im Gegensatz zu fGRP1.8 enthält dieses Protein kein Tyrosin. Aber es hat einen hohen Anteil an Phenylalanine und anderen hydrophoben Aminosäuren. Teile der wGRP1 Sequenz wurden schrittweise aus synthetischen Oligonukleotiden aufgebaut, welche an den bevorzugten Tripletgebrauch für hoch exprimierte Proteine in *E. coli* adaptiert waren. Diese Teile der wGRP Sequenz wurden in *E. coli* als GST-Fusionsproteine überexprimiert und unter nativen Bedingungen gereinigt.

Im Gegensatz zu den Peptiden der fGRP1.8 Domänen zeigten die Peptide der wGRP1 Domänen keine metachromatische Färbung. Dies deutet darauf hin, dass ein niedriger Gehalt an hydrophoben Aminosäureresten in der Sequenz, insbesondere Phenylalaninreste, für die Interaktion mit dem Coomassie Farbstoff verantwortlich ist, die eine starke Blaufärbung ergibt. Es wurde gezeigt, dass wGRP1-Peptide unter nativen Bedingungen in Lösung eine starke, hydrophobe Aggregation aufweisen. Die Expression des wGRP1 Proteins in verschiedenen Geweben der Pflanze wurde untersucht. Es wurden polyklonale Antikörper gegen das gereinigte GST/wGRP1 Fusionsprotein gemacht. Mit Hilfe dieser Antikörper konnte wGRP1 spezifisch in Zellwand-Extrakten von 10 d alten Weizenwurzeln detektiert werden. Mit Hilfe des anionischen Detergenz Triton X-100, aber nicht unter stark ionischen Bedingungen, konnte wGRP1 spezifisch aus der Weizenzellwand extrahiert werden. Dies deutet auf eine stark hydrophobe Interaktion des wGRP1 Proteins mit sich selbst, oder mit anderen Komponenten der Zellwand hin.

fGRP1.8 wird in den späten Stadien der Protoxylem Entwicklung insolubiliert. Um die biochemischen Grundlagen dieser Insolubilisierung zu analysieren, wurde die Möglichkeit der Vernetzung des fGRP1.8 unter oxidativen Bedingungen untersucht. Zur Identifizierung der Domänen innerhalb des fGRPs, die in einer Vernetzungsreaktion unter oxidativen Bedingungen involviert sind, wurden *in vitro* Vernetzungs-Studien unter oxidativen Bedingungen sowohl mit HRP und GST, als auch GST/wGRP1 und verschiedene GST/fGRP Fusionsproteinen durchgeführt. Fusionsproteine, welche den N-terminalen und den C-terminalen Teil sowie den repetitiven Mittelteil des fGRP1.8 enthielten, konnten spezifisch zu höhermolekularen Aggregaten verknüpft werden. Diese Aggregate wurden mit dem GST-Protein oder dem GST/wGRP1 Fusionsprotein unter gleichen Bedingungen nicht beobachtet. Die Vernetzungsreaktion der GST/fGRP Fusionsproteine konnte mit 1 mM DTT inhibiert werden. Der Hauptunterschied zwischen fGRP1.8 und wGRP1 ist das völlige Fehlen der Tyrosinreste im letzteren. Daher wird eine kovalente Verknüpfung über Tyrosinaminosäuren der fGRP Domänen in der oxidativen Verknüpfungsreaktion vorgeschlagen. Die Interaktionen von einem GST Fusionsproteins, das den repetitiven Mittelteil des fGRP1.8 enthält, mit Zellwänden aus Bohnen Zellkulturen wurden *in vitro* untersucht. Eine H_2O_2 abhängige Vernetzungsaktivität konnte beobachtet werden, die bei mit Salz extrahierten Zellwänden nicht zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass eine ionisch mit der Zellwand assoziierte Peroxidase fGRP1.8 als Substrat für eine Vernetzungsreaktion benützt.

Das fGRP1.8 Protein konnte spezifisch mit Kollagenase von *Clostridium histolyticum* verdaut werden, obwohl es nicht die Kollagenase typische Spaltungssequenz besitzt. Dies wurde durch *in vitro* Studien von verdauten

GST/fGRP Fusionsproteinen, welche über 90 % der fGRP1.8 Sequenz repräsentieren, gezeigt. Diese Daten bestätigen die kürzlich gemachte Beobachtung, dass hydrolysierte Primär-Zellwände von Protoxylem-Zellen der Sojabohne hauptsächlich fGRP1.8 als strukturelles Protein enthalten. Dies wiederum unterstützt die Hypothese, dass fGRP1.8 hauptsächlich für die besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser speziellen Zellwände verantwortlich ist.