ETH zürich

ETH Library

Isolation, molecular characterization and functional analysis of PosF21, a glutamine rich putative transcription factor from Arabidopsis thaliana

Doctoral Thesis

Author(s):
Aeschbacher, Roger Andreas

Publication date:
1990

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000568915

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.

14. Dez. 1990

Diss. ETH NR.: 9322

Isolation, Molecular Characterization and Functional Analysis of PosF21, a Glutamine Rich Putative Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana*

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

ROGER ANDREAS AESCHBACHER

Dipl. Biologe II

born September 5, 1961

citizen of Riehen (BS) and Radelfingen (BE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. I. Potrykus. examiner

Prof. Dr. K. Apel, co-examiner

17.12.90

Zürich 1990

Summary

Transcription factors play an important role in the control of gene expression. Since only few plant sequences have been cloned which encode putative transcription factors, a novel method for isolation of transcription factors from plants was developed. An oligonucleotide probe was designed which should detect regions of single repeating aminoacids. Such regions are known to function as activation domains in transcription factors, for example the glutamine rich area of the human SP1 factor. By using this probe to screen a cDNA library from young seedlings of A. thaliana, a clone of 936 bp, named pPosF21 was isolated.

A 4 kb genomic fragment which contains the complete coding region of PosF21 was cloned and fully sequenced. Primer extension experiments allowed precise mapping of the RNA start site. The full length mRNA was deduced to be 1555 b, with a possible stem loop structure in the 3' untranslated region. Four introns were determined in the gene.

The deduced protein has a molecular weight of 44 kD. In addition to an extensive glutamine rich area it shows striking homology to the DNA binding and dimerization domains of transcription factors in the bZip class, such as GCN4 or Jun. It also has acidic and proline rich areas.

Northern analysis showed expression at a low but constant level of a mRNA of the expected size, in developing seedlings as well as in roots, stems and leaves of mature plants.

Southern analysis, probing A. thaliana DNA and DNA from other higher plants with a DNA binding domain probe of PosF21, showed possibly related sequences. One such sequence from A. thaliana was cloned and partially sequenced to reveal a gene with approximately 90 % homology to PosF21.

Experiments replacing the DNA binding domain or the acidic activation domain of GCN4 with respectively the DNA binding or the glutamine rich domain of PosF21 did not restore activity to GCN4.

Transient transformation experiments with tobacco or A. thaliana protoplasts and constructs with the GUS reporter gene showed that a 400 bp region 5' to the coding sequence of PosF21 has promoter activity comparable to that of the 35S promoter from CaMV. Regions 3' to the presumed TATA box were important for this activity. A possible autoregulation of PosF21 was investigated by cotransformation of plasmids expressing the PosF21 protein.

Gel retardation experiments with PosF21 fusion proteins were performed to detect possible binding of PosF21 to the PosF21 promoter or to 35S promoter fragments. No proof for such an interaction has yet been obtained.

Zusammenfassung

Transcriptionsfaktoren haben eine wichtige Funktion in der Kontrolle der Genexpression. Da nur wenige Pflanzengene isoliert sind, die potentielle Transkriptionsfaktoren kodieren, wurde eine neuartige Isolierungsmethode für solche Gene von Pflanzen entwickelt. Eine Oligonukleotidprobe wurde synthetisiert, die Regionen von sich einzeln wiederholenden Aminosäuren entdecken kann. Solche Strukturen wurden als Aktivationsdomänen von Transkriptionsfaktoren identifiziert, zum Beispiel die glutaminreiche Region im SP1 Transkriptionsfaktor vom Menschen. Mit dieser Probe wurde eine cDNA Bank von A. thaliana abgesucht und eine 935 bp lange cDNA, die pPosF21 benannt wurde, konnte isoliert werden.

Ein 4 kb langes genomisches Fragment das die komplette kodierende Region von PosF21 enthält wurde kloniert und sequenziert. "Primer extension" Experimente erlaubten es, die RNA Start Position genau zu bestimmen. Die mRNA Länge wurde auf 1555 bp berechnet. Eine mögliche "stem-loop" Struktur wurde in der 3' untranslatierten Region identifiziert. Vier Introns wurden im PosF21 Gen lokalisiert.

Das abgeleitete Protein hat ein Molekulargewicht von 44 kD. Zusätzlich zu der grossen glutaminreichen Region enthält es eine Struktur die starke Homologie zu der DNA Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von Transkriptionsfaktoren der bZip-Klasse (GCN4, Jun u.s.w.) aufweist. Ausserdem enthält es saure und prolinreiche Regionen.

Northern Analysen zeigten dass eine mRNA von der erwarteten Grösse exprimiert wird. Die Expression in wachsenden Keimlingen als auch in Wurzeln, Stengeln und Blättern von reifen Pflanzen ist schwach, bleibt aber konstant.

Southern Analysen, bei denen A. thaliana DNA und DNA von anderen höheren Pflanzen mit einer Probe der DNA-Bindungsdomäne getestet wurden, zeigten verschiedene ähnliche Sequenzen. Eine solche Sequenz aus A. thaliana wurde kloniert und die partielle Sequenzierung ermöglichte die Identifizierung eines Genes das zu PosF21 etwa 90% homolog ist.

Experimente bei denen die DNA-Bindungsdomäne oder die saure Aktivationsdomäne von GCN4 mit der entsprechenden DNA-Bindungsdomäne oder der glutaminreichen Region von PosF21 ausgetauscht wurden, zeigten, dass dadurch die Funktion von GCN4 nicht komplementiert wird.

Transiente Transformationen mit Tabak und A. thaliana Protoplasten und Konstruktionen mit dem GUS Reportergen wurden durchgeführt. Eine Promoteraktivität in der 400 bp Region die 5' zur kodierenden Region liegt, konnte so identifiziert werden. Diese Aktivität ist ungefähr halb so gross wie die Expressionsrate vom 35S Promoter von CaMV. Die Region 3' von der TATA box

ist für diese hohe Expression unerlässlich. Eine mögliche Autoregulation des PosF21 Genes wurde durch Co-Transformation von Plasmiden, die das PosF21 Protein exprimieren, untersucht.

"Gel retardation" Experimente mit PosF21 Fusionsproteinen wurden durchgeführt um eine mögliche Bindung des PosF21 Proteins an seinen eigenen Promoter oder den 35S Promoter von CaMV zu untersuchen. Es konnte bis jetzt jedoch kein Beweis für eine solche Bindung erbracht werden.