

Diss ETH Nr. 10337

Gefässspezifische Expression des Bohnengens
grp 1.8: Modularer Aufbau des Promotors und
Charakterisierung des bZIP-Proteins VSF-1

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
DANIEL HEIERLI
Dipl. Naturwissenschaftler ETH
geboren am 9. Dezember 1965
von Zürich und Gais (AR)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Nikolaus Amrhein, Referent
Dr. Beat Keller, Korreferent

Zürich 1993

Kurzfassung

GRP 1.8 ist ein glycinreiches Zellwandprotein aus der Bohne (*Phaseolus vulgaris*). Es wird spezifisch in den Gefäßen von Stengeln, Wurzeln, Blättern und Blüten synthetisiert. Zellkernextrakte aus Tabak- und Tomatenblättern sowie aus Tabakzellkultur enthalten einen Faktor, der ein 28 bp langes Sequenzelement (*vs-1*, bp -203 bis -176) des *grp 1.8* Promotors bindet. Mono- und Dimere von *vs-1* aktivierten in transgenem Tabak einen 5' bis bp -82 deletierten CaMV 35S Rumpfpromotor in den Gefäßgeweben des Stengels, wo dieser Rumpfpromotor alleine inaktiv ist. *vs-1* liegt fast vollständig in einem früher definierten Element, welches für die Gefäßspezifität des *grp 1.8* Promotors essentiell ist. Um diese komplexe positive und negative Regulation durch ein und dasselbe Sequenzelement auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde aus einer Expressions-cDNA-Bank ein Klon isoliert, der *vs-1* spezifisch bindet. Das dadurch codierte Protein, genannt VSF-1, enthält eine bZIP-Domäne nahe dem C-Terminus. Zwei mutierte *vs-1*-Elemente wurden von VSF-1 nicht gebunden. Diese mutierten Elemente waren auch nicht in der Lage, einen -82 CaMV 35S Rumpfpromotor zu aktivieren. Die bZIP-Domäne von VSF-1 zeigt 72% Sequenzhomologie zur bZIP-Domäne von PosF21 aus *Arabidopsis*. Zu anderen bZIP-Proteinen bestehen nur geringe Sequenzhomologien. *vs-1* enthält keine bekannten bZIP-Bindungssequenzen und keine Palindrome. Insbesondere fehlt auch die Sequenz 5'-ACGT-3', die in den Bindungsstellen aller bisher bekannten pflanzlichen bZIP-Proteine konserviert ist. Wegen der ungewöhnlichen Bindungsstelle und aufgrund der Sequenz der bZIP-Domäne wird postuliert, dass VSF-1 zu einer neuen Familie von bZIP-Proteinen gehört.

Zwei weitere Elemente des *grp 1.8* Promotors wurden bezüglich ihrer Fähigkeit, einem Rumpfpromotor Aktivität zu verleihen, untersucht: SE1 (bp -121 bis -94), welches für eine starke Expression von *grp 1.8* in Stengeln wichtig ist, und RSE (bp -94 bis -76), welches Expression in Wurzeln bewirkt. SE1 konnte, als Di- oder Pentamer, einen -82 CaMV 35S Rumpfpromotor in mehreren Geweben des Stengels aktivieren. RSE aktivierte, als Mono- oder Pentamer, einen -82 CaMV Rumpfpromotor im Gefäßgewebe des Stengels.

Abstract

GRP 1.8 is a glycine-rich cell wall protein of bean (*Phaseolus vulgaris*). It is specifically synthesized in vascular tissues of stems, roots, leaves and flowers. Nuclear extracts from tobacco and tomato leaves and tobacco cell culture contain a protein that specifically binds to a 28 bp sequence element (*vs-1*, bp -203 to -176) of the *grp 1.8* promoter. Monomers and dimers of *vs-1* activated a -82 minimal CaMV promoter in stem vascular tissue of transgenic tobacco plants, where this minimal promoter alone is inactive. *vs-1* partially overlaps with a previously defined negative regulatory element in the *grp 1.8* promoter that is necessary for restriction of gene expression to vascular tissue. To investigate the molecular basis of this complex positive and negative regulation of *grp 1.8* expression by the same promoter element, we isolated from a tomato expression library a cDNA clone that encodes a protein binding to *vs-1*. This protein, designated VSF-1, contains a bZIP motif close to the C-terminus. Mutated *vs-1* elements were no longer bound by VSF-1 and also failed to activate the -82 minimal CaMV promoter. The bZIP-Domain of VSF-1 shows 72% sequence homology to PosF21 of *Arabidopsis*. The sequence homology to other bZIP proteins is only low. *vs-1* contains neither any of the known bZIP binding sequences nor a palindromic sequence element. In particular, it does not contain the 5'-ACGT-3' core sequence that is part of the known plant bZIP protein binding sites. Based on this unusual binding specificity as well as on the sequence homology data we propose that VSF-1 belongs to a new family of plant bZIP proteins.

Two other elements of the *grp 1.8* promoter were tested for their ability to activate a minimal promoter: SE1 (bp -121 to -94), which is important for strong expression of *grp 1.8* in stems, and RSE (bp -94 to -76), which confers expression in roots. SE1, as di- or pentamer, activated a -82 minimal CaMV 35S promoter in many tissues of stems. RSE, as mono- or pentamer, activated a -82 minimal CaMV 35S promoter in stem vascular tissue.