



Doctoral Thesis

The in vivo functions of NADPH protochlorophyllide oxidoreductases A and B as studied by genetic manipulation of their expression in *Arabidopsis thaliana*

Author(s):

Sperling, Ulrich

Publication Date:

1998

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001915535> →

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. 12559

**The *in vivo* functions of
NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B
as studied by genetic manipulation
of their expression in *Arabidopsis thaliana***

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Ulrich Sperling
Dipl.-Natw. ETH Zürich

born February 21st, 1968
in Ludwigshafen, Germany



accepted on the recommendation of
Prof. Dr. K. Apel, examiner
Prof. Dr. P. Matile, coexaminer
Dr. Gregory A. Armstrong, coexaminer

Zürich 1998

SUMMARY

The biosynthesis of chlorophyll represents a central feature of plant metabolism. Two chlorophyll biosynthesis pathways that differ genetically and biochemically in at least one step have been described in plants. A difference of physiological relevance between these two pathways is that only one of them leads to chlorophyll in darkness, whereas the second ceases at the level of protochlorophyllide and allows its accumulation. The reason for this is the light-dependency of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR, EC 1.3.1.33), which requires light as a second cofactor for the formation of chlorophyllide.

In etiolated angiosperms chlorophyll is quantitatively synthesized via the light-dependent pathway. Remarkably, illumination of etiolated barley seedlings not only causes the transformation of chlorophyllide into protochlorophyllide, but also leads to a rapid decrease in the contents of POR mRNA, protein and enzyme activity. This kind of negative light regulation was difficult to interpret with respect to the continuous demand for chlorophyll during growth and development until a second form of POR was identified in barley and *Arabidopsis thaliana*, a model system for genetic and molecular biological studies.

The two *POR* genes, *PORA* and *PORB*, have different expression patterns. In particular, the degree of negative light regulation is different and restricts *PORA* expression to young seedlings, whereas *PORB* alone seems to be responsible for supplying chlorophyll at all later stages of plant development. In addition, different modes of import into the plastids were found for the cytosolic precursors of *PORA* and *PORB*. These observations raised the question of further common and distinct characteristics of *PORA* and *PORB*. The appearance of *PORA* during early seedling development correlates with a particular spectroscopically defined form of protochlorophyllide and with the formation of prolamellar bodies, a typical etioplast inner membrane structure. A specific involvement of *PORA* was discussed in both cases, leaving the functions of *PORB* in this context unclear.

Because no *por* mutants are currently available the putative functions of *PORA* and *PORB* were analyzed using transgenic *Arabidopsis thaliana* lines that were specifically modified in the expression of the *POR* genes. This approach allowed one to study the

substrates and products of PORA and PORB spectroscopically, as well as the plastid ultrastructures resulting from altered relative quantities of the two proteins.

Two systems in addition to etiolated seedlings were used for the analysis of PORA and PORB functions: 1) seedlings that were illuminated with continuous far-red light and 2) dark-grown seedlings of a photomorphogenic mutant. The total POR content is strongly reduced in both systems with PORA, in particular, being below the limit of detection. The low background of endogenous POR renders these systems highly attractive for the functional analysis of the transgenic proteins.

The experiments performed in the course of this project allow the following conclusions: both PORA and PORB form spectroscopically very similar if not identical complexes with protochlorophyllide, which lead to the same reaction products upon illumination. Both PORA and PORB support the formation of prolamellar bodies in dark-grown seedlings and, accordingly, are likely to be localized in this membrane structure. Finally, plants that overexpress either PORA or PORB are at least partially protected against photooxidative damage upon the shift from far-red illumination to the white light, whereas the wildtype is heavily damaged in the white light because of its elevated protochlorophyllide content.

Altering the normal ratios of PORA and PORB by overproduction of the latter can delay the disappearance of the prolamellar body and the formation of thylakoids, as also reflected in a reduced accumulation of chlorophyll and light-harvesting proteins. These observations are in line with the different modes of plastid import of the PORA and PORB precursors. There is no need to postulate additional intrinsic differences between the two proteins and no hints of any such differences were found.

The function of PORA may be merely the quantitative support of PORB during early seedling development.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Biosynthese von Chlorophyll stellt einen zentralen Aspekt im Stoffwechsel der Pflanzen dar. Zwei Chlorophyll-Synthesewege, die sich in mindestens einem Schritt genetisch und biochemisch unterscheiden, sind für Pflanzen beschrieben worden. Ein

physiologisch relevanter Unterschied zwischen diesen beiden Stoffwechselwegen besteht darin, dass nur einer von ihnen im Dunkeln bis zum Chlorophyll führt, während der zweite im Dunkeln auf der Stufe des Protochlorophylls zum Stillstand kommt und dieses akkumulieren lässt. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass die NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR, EC 1.3.1.33) Licht quasi als zweiten Cofaktor für die Bildung von Chlorophyllid benötigt.

In etiolierten Angiospermen erfolgt die gesamte Chlorophyll-Synthese über den lichtabhängigen Weg. Bemerkenswerterweise führt die Belichtung von etiolierten Gerstenkeimlingen nicht nur zur Umsetzung von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid, sondern auch zu einer schnellen Abnahme der POR mRNA- und Protein-Mengen, sowie der zugehörigen Enzymaktivität. Im Hinblick auf den andauernden Bedarf an Chlorophyll während Wachstum und Entwicklung war diese Art von negativer Lichtregulation schwer verständlich, bis die Existenz einer zweiten POR-Form in Gerste und *Arabidopsis thaliana*, einer Modellpflanze für genetische und molekularbiologische Studien, nachgewiesen werden konnte.

Die beiden *POR*-Gene werden als *PORA* und *PORB* bezeichnet und unterscheiden sich in der Regulation ihrer Expression. Insbesondere das Ausmass der negativen Regulation durch Licht ist unterschiedlich: sie führt zu einer Begrenzung der *PORA*-Expression auf das frühe Keimlingsstadium, während zu späteren Zeitpunkten alleine *PORB* für die Versorgung der Pflanze mit Chlorophyll verantwortlich zu sein scheint. Des weiteren wurde für Gerste ein unterschiedliches Verhalten der cytosolischen Vorstufenproteine von *PORA* und *PORB* bezüglich des Imports in Plastiden gefunden. Aus diesen Beobachtungen leitet sich die Frage nach weiteren Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen *PORA* und *PORB* ab. Das Auftreten von *PORA* während der frühen Keimlingsentwicklung korreliert einerseits mit der Nachweisbarkeit einer bestimmten, spektroskopisch definierten Form von Protochlorophyllid, andererseits mit der Bildung von Prolamellarkörpern, einer charakteristischen Membranstruktur im Inneren der Etioplasten. In beiden Fällen wurde über eine spezifische funktionelle Beteiligung von *PORA* spekuliert. Die Bedeutung von *PORB* in diesem Zusammenhang war unklar.

In Ermangelung von *por*-Mutanten wurde in dieser Arbeit der Frage nach den spezifischen Funktionen von *PORA* und *PORB* durch Analyse transgener *Arabidopsis thaliana*-Linien nachgegangen, die in ihrer Expression der *POR*-Gene spezifisch modifiziert sind. Dies ermöglichte die Untersuchung der Edukte und Produkte von *PORA*

und PORB auf spektroskopischer Ebene, sowie die ultrastrukturellen Implikationen veränderter Mengenverhältnisse zwischen diesen beiden Proteinen.

Zusätzlich zu etiolierten Keimlingen wurden zwei weitere Systeme für die Analyse der Funktionen von PORA und PORB verwendet: einerseits Keimlinge, die mit Dunkelrot-Licht bestrahlt wurden und andererseits im Dunkeln gehaltene Keimlinge einer photomorphogenetischen Mutante. In beiden Systemen ist der Gesamtgehalt an POR stark reduziert, PORA im Speziellen ist nicht nachweisbar. Der niedrige Hintergrund an endogenem POR ist besonders attraktiv für die Analyse der Funktion der durch die Transgene eingebrachten POR-Proteine.

Die Experimente dieser Arbeit lassen zusammenfassend folgende Schlüsse zu: PORA und PORB bilden mit Protochlorophyllid spektroskopisch sehr ähnliche, wenn nicht identische Komplexe, deren primäre Reaktionsprodukte sich ebenfalls gleichen. PORA und PORB fördern die Bildung von Prolamellarkörpern in im Dunkeln angezogenen Keimlingen und sind deshalb vermutlich beide in dieser Membranstruktur lokalisiert. Schliesslich sind sowohl PORA- als auch PORB-überexprimierende Pflanzen gegenüber photooxidativen Schäden beim Übergang von Dunkelrot-Belichtung ins Weisslicht teilweise geschützt, während der Wildtyp durch die erhöhte Menge an Protochlorophyllid im Weisslicht stark geschädigt wird.

Eine Störung der natürlichen Mengenverhältnisse von PORA und PORB durch Überproduktion von PORB kann zu einer Verzögerung bei der Auflösung des Prolamellarkörpers und der Ausbildung von Thylakoiden führen, verbunden mit einer reduzierten Akkumulation von Chlorophyll und Lichtsammel-Proteinen. Diese Beobachtungen sind mit den verschiedenen Transporteigenschaften der Vorstufen von PORA und PORB erklärbar. Es ist nicht notwendig, weitere intrinsische Unterschiede zwischen beiden Proteinen zu postulieren und es wurden auch keine Hinweise darauf gefunden.

Die Funktion von PORA beschränkt sich möglicherweise auf eine quantitative Unterstützung von PORB während der frühen Keimlingsentwicklung.