

# Positional cloning of FLU, a gene of *Arabidopsis thaliana* that encodes a negative regulator of chlorophyll biosynthesis

**Doctoral Thesis****Author(s):**

Meškauskienė, Rasa Marija

**Publication date:**

2002

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004322347>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss.ETH Nr. 14456

**Positional cloning of *FLU*, a gene of *Arabidopsis thaliana*  
that encodes a negative regulator of chlorophyll biosynthesis**

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

vorgelegt von  
RASA – MARIJA MEŠKAUSKIENĖ  
Diplom-Biologin, Vilnius Universität

geboren am 12 October 1969  
in Kaunas, Litauen

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. K. Apel, Referent  
Prof. Dr. N. Amrhein, Korreferent

Zürich 2001

## Abstract

Tetrapyrroles such as chlorophylls play a fundamental role in the energy absorption and transduction activities of photosynthetic organisms. Because of these molecules, however, photosynthetic organisms are also prone to photooxidative damage. They had to evolve highly efficient strategies to control tetrapyrrole biosynthesis and to prevent the accumulation of free intermediates that potentially are extremely destructive when illuminated. In angiosperms, the metabolic flow of tetrapyrrole biosynthesis is regulated at the step of 5-aminolevulinic acid (ALA) synthesis. Several mechanisms have been previously implicated to control ALA synthesis. Light, diurnal rhythms, and functional status of the plastid regulate the expression of genes that code for the two enzymes, glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde-2-1-aminotransferase, committed to ALA synthesis. Heme-dependent feedback inhibition of ALA synthesis has been proposed and supported by several sets of data. Mg-chelatase, the enzyme at the branch point of chlorophyll and heme biosynthetic pathways, seems to be also involved in the regulation of ALA synthesis in a way different from the heme-dependent inhibition.

In angiosperms, the chlorophyll biosynthesis pathway leads only to the formation of protochlorophyllide in the dark, since NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase, the enzyme that converts protochlorophyllide to chlorophyllide, requires light as a cofactor. Once a critical level of protochlorophyllide has been reached, ALA synthesis slows down. A genetic approach led to the isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant that is no longer able to suppress the accumulation of protochlorophyllide in the dark. In this mutant, *flu*, the rate of ALA synthesis exceeds that of the wild type by a factor of three to four. Thus, the *FLU* gene encodes a negative regulator of ALA synthesis.

The work presented describes the map-based cloning of the *FLU* gene. The identification of *FLU* was confirmed: 1) single point mutations were found in this gene of four allelic *flu* mutants and 2) the *flu* phenotype was complemented by introducing the wild type copy of the gene into mutant plants. In the *Arabidopsis* genome, *FLU* is a single gene and not a member of a gene family. It encodes a novel, previously not described protein. The FLU protein is very likely located in plastids since it was imported and processed by isolated pea chloroplasts. FLU was tightly associated with chloroplast membranes. The hydrophobic region adjacent to the transit peptide of FLU

might be responsible for this association. Two domains, coiled-coil and tetratricopeptide repeat (TPR) that are known to mediate protein-protein interactions, were predicted in FLU by computer programs. The TPR domain, which occupies the C-terminal part and consists of at least two TPR motifs, is very likely a functional unit. In the *flu1-1* mutant, the alanine residue at position 20 of the first predicted TPR motif had been replaced by valine. This alanine residue is one of the few highly conserved amino acid residues of TPR motifs. It has been shown to be important for the structural integrity of a TPR. The coiled-coil domain of FLU, which is adjacent to the hydrophobic region, might also be a functional unit. The amino acid substitution in *flu1-4* was found in this domain and the probability for the mutated domain to form a coiled-coil structure is lower than that for the native domain.

It was shown that FLU is not involved in the light-dependent regulation of expression of genes encoding the ALA synthesizing enzymes. The predicted features of the FLU protein suggest that FLU confers its regulatory effect through interaction with another protein(s), possibly with enzyme(s) of chlorophyll biosynthesis.

## Zusammenfassung

In photosynthetischen Organismen spielen Tetrapyrrole, z.B. Chlorophylle, grundlegende Rollen bei Energieabsorptions- und Transduktionsprozessen. Diese Moleküle können allerdings auch zu photooxidativen Schäden führen. Photosynthetische Organismen mussten daher leistungsfähige Strategien zur Kontrolle der Synthese von Tetrapyrrolen entwickeln, um die Akkumulation freier Zwischenprodukte zu verhindern. Diese Zwischenprodukte können bei Belichtung grosse Schäden anrichten. In Angiospermen wird die Tetrapyrrol-Synthese vor der Vorstufe zu 5-Aminolävulinat (ALA) reguliert. Es wurden verschiedene Möglichkeiten zur Kontrolle der ALA-Synthese in Betracht gezogen: 1) Zwei Enzyme, die Glutamyl-tRNA reductase und die Glutamat-1-semialdehyd-2-1-aminotransferase, synthetisieren ALA. Licht, der Tagesrhythmus sowie der Zustand der Plastiden kontrollieren die Expression der Gene, die für diese zwei Enzyme kodieren. 2) Es gibt experimentelle Hinweise für die vom Häm ausgehende "feedback"-Hemmung der ALA-Synthese. 3) Magnesium-Chelatase, das Enzym, das an der Verzweigung der Biosynthese von Chlorophyll und Häm wirkt, scheint ebenfalls in die Kontrolle der ALA-Synthese in einer Weise involviert zu sein, die sich von einer Häm-abhängigen Hemmung unterscheidet.

Bei den Angiospermen führt im Dunkeln der Chlorophyll-Biosyntheseweg nur zu Protochlorophyllid, weil die NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, das Enzym, das Protochlorophyllid in Chlorophyllid umwandelt, lichtabhängig ist. Sobald eine kritische Menge an Protochlorophyllid entstanden ist, wird die ALA-Synthese verlangsamt. Mittels eines genetischen Ansatzes wurde eine *Arabidopsis thaliana* Mutante isoliert, die die Akkumulation von Protochlorophyllid im Dunkeln nicht mehr unterdrücken kann. In dieser Mutante, *flu*, übersteigt die Rate der ALA-Synthese die der Wildtyppflanze um einen Faktor von drei bis vier. Aus diesem Grund kodiert das *FLU* Gen wahrscheinlich für einen negativen Regulator der ALA-Synthese.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Klonierung und teilweise Charakterisierung des *FLU* Gens. Die Identität des *FLU* Gens wurde bestätigt: 1) In vier unterschiedlichen allelischen Mutanten wurden jeweils verschiedene Punktmutationen in diesem Gen gefunden. 2) Der *flu* Phänotyp konnte durch eine Wildtyp Kopie des Gens komplementiert werden.

Im *Arabidopsis* Genom ist *FLU* ein einzelnes Gen und nicht Mitglied einer Genfamilie. Es kodiert für ein unbekanntes, bis jetzt nicht beschriebenes Protein. Das FLU Protein ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Plastiden lokalisiert, da es von isolierten Erbsen Chloroplasten importiert und prozessiert wurde. FLU war fest mit den Membranen der Chloroplasten assoziiert. Die hydrophobe Region unterhalb des Transitpeptids des FLU Proteins könnte für diese Verbindung verantwortlich sein. Zwei Domänen, „coiled-coil“ und „tetratricopeptide repeat“ (TPR), die für ihre Protein-Bindungs-Eigenschaften bekannt sind, wurden durch Computerprogramme in FLU vorausgesagt. Die TPR Domäne, die aus mindestens zwei TPR Motiven besteht, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine funktionelle Einheit. In der Mutante *flu1-1* ist Alanin, das an Position 20 des ersten vorausgesagten Motivs liegt, durch Valin ersetzt. Dieses Alanin ist eine der wenigen hochkonservierten Aminosäuren der TPR-Motive. Es ist gezeigt worden, dass diese Aminosäure für die strukturelle Vollständigkeit eines TPR wichtig ist. Die „coiled-coil“ Domäne des FLU Proteins im Anschluss an die hydrophobe Region könnte auch eine funktionelle Einheit sein. In *flu1-4* wurde innerhalb dieser Domäne ein Aminosäureaustausch gefunden. Laut Computerprogrammen ist die Wahrscheinlichkeit, dass die mutierte Domäne eine „coiled-coil“ Struktur bildet, niedriger als die der Wildtypdomäne.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass FLU nicht an der lichtabhängigen Expressionskontrolle der Gene, die für die ALA synthetisierenden Enzyme kodieren, beteiligt ist. Computerberechnete Eigenschaften des FLU Proteins deuten darauf hin, dass FLU seine regulatorische Funktion sehr wahrscheinlich durch Interaktion mit (einem) anderen Protein(en) ausübt, vielleicht mit Enzyme(n) der Chlorophyll-Biosynthese.