

Diss. ETH No. 15606

# **Photooxidative Stress Responses in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Beat Fischer

Dipl. Biol., University of Basel

Born on February 2, 1974

Citizen of Merenschwand AG

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner  
Dr. Rik I. L. Eggen, co-examiner  
Dr. Anja Krieger-Liszkay, co-examiner  
Prof. Dr. René Schwarzenbach, chairman

Zürich, 2004

## SUMMARY

During evolution, plants and algae have optimized the conversion of light into chemical energy: Photosynthesis results in the production of reducing power used for CO<sub>2</sub> fixation and in the synthesis of chemical energy in the form of ATP. Balancing the electron transport in the two photosystems is a very complex and delicate process, and photosynthetic organisms have evolved various adaptive mechanisms which allow reacting to changing environmental conditions. Nevertheless, harsh environmental conditions, such as high light intensities, can disturb the photosynthetic activity and lead to an increased production of the reactive oxygen species (ROS) superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). When the production of ROS exceeds the capacity of the cellular defense systems, cells encounter a so-called oxidative stress with subsequent damage to cellular components. One of the primary effects caused by high light illumination is the <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-dependent degradation of the central chlorophyll binding protein D1 and subsequent disassembling of photosystem II resulting in a block of linear electron flow in photosynthesis called photoinhibition. Pollutants and herbicides, which interact with the photosynthetic activity, can also stimulate the production of ROS in the chloroplasts and thus provoke an oxidative stress under normal light conditions.

Additionally, ROS can be directly produced by exogenous chemical compounds which act as photosensitizers. These substances absorb light energy and by that enter an excited state, with subsequent uncontrolled redox reactions (type I) or the formation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (type II). Thus, high levels of photosensitizers cause a photooxidative stress in cells illuminated by light. Photosynthetic organisms have evolved efficient defense mechanisms to protect themselves from high levels of ROS and to avoid that they enter the oxidative stress state. Defense systems involve general stress responses, which may also be induced by heat shock or other types of stress conditions, as well as specific defense

systems, of which the expression is often controlled directly and specifically by ROS levels. The genetic response of an organism to a stress can thus give a lot of information about the type of stress cells encounter. In ecotoxicology this expression of defense genes is often used as an indicator for the stress condition of an organism in the environment, but for a solid interpretation of these data the mechanisms behind these responses as well as the specificity of the responses have to be known. The green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a widely used photosynthetic model organism for which many molecular methods are well established. *C. reinhardtii* thus is a very suitable model organism, and was used by us, to study photooxidative stress responses in photosynthetic organisms.

In this thesis we studied the genetic response of *C. reinhardtii* to photooxidative stress caused either by the presence of exogenous photosensitizers or by environmental conditions causing photoinhibition. In particular, we focused on the overall genetic responses to either type I or type II photosensitizers (chapter 2) and investigated the induction mechanism of the glutathione peroxidase homologous gene *Gpxh* in more detail. *Gpxh* turned out to be specifically induced by increased levels of  $^1\text{O}_2$  (chapter 3). The *Gpxh* gene was also upregulated by  $^1\text{O}_2$  produced during photosynthesis under high light illumination (chapter 4). A regulatory element, with homology to the well-known CRE/AP-1 regulatory element in various oxidative stress response genes of other organisms, was identified in the *Gpxh* promoter region and was examined in greater detail (chapter 5). This research showed that indeed the CRE/AP-1 element was essential for  $^1\text{O}_2$ -induced *Gpxh* expression, but that most probably additional gene regulation pathways are involved that lead to increased *Gpxh* transcript levels.

## **Type I and Type II Photooxidative Stress Response**

The genetic response of *C. reinhardtii* to the type I photosensitizer neutral red (NR) and the type II photosensitizer rose bengal (RB) was analyzed with DNA-microarrays. Upon exposure to NR, several general and oxidative stress genes were upregulated, whereas most photosynthetic genes were downregulated by NR. Only one gene, the *Gpxh* gene, was strongly induced by RB. Analysis of the expression profiles of these NR and RB-induced genes under various oxidative stress conditions indicated the presence of a common gene regulation mechanism for most NR-induced genes responding to various oxidative stress conditions. Alternatively, a second, unrelated mechanism seems to regulate the NR-induction of the *Gpxh* which is also activated by RB, probably due to the formation of  $^1\text{O}_2$ . Indeed, EPR-spin trap measurements with isolated spinach thylakoids showed that NR stimulated the production of  $^1\text{O}_2$  in the chloroplasts suggesting that the generation of  $^1\text{O}_2$  might be the common signal for the *Gpxh* induction by NR and RB.

## **Induction of the *Gpxh* Gene**

The toxicity in *C. reinhardtii* and the response of the *Gpxh* gene caused by NR and RB were shown to be dependent on both the concentration of the chemicals and the intensity of light illumination which is in agreement with an effect caused by photosensitizers. However, different modes of action are responsible for the toxicity of NR and RB. Addition of the  $^1\text{O}_2$  quenchers DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) and L-histidine to cultures of *C. reinhardtii* reduced the toxicity of the type II photosensitizer RB, showing that the lethal effect was caused by the formation of  $^1\text{O}_2$ , probably by modification of a component in the cell membrane. On the other hand, these quenchers could not protect the cells from the toxic effect of the type I photosensitizer NR, indicating

that other effects than  $^1\text{O}_2$  production were toxic for the cell or that  $^1\text{O}_2$  is generated at a cellular site where DABCO and L-histidine are absent.

The *Gpxh* expression is induced by  $^1\text{O}_2$  with both photosensitizers NR and RB. This was shown using  $\text{D}_2\text{O}$ -containing growth medium, which increases the frequency of  $^1\text{O}_2$ -reactions with cellular components and which stimulated the induction of the *Gpxh* gene by NR and RB about two fold. Furthermore, NR caused an increased production of  $^1\text{O}_2$  in isolated spinach thylakoids in a concentration and light intensity dependent manner, indicating that the *Gpxh* induction specifically responded to the production of  $^1\text{O}_2$  in the chloroplast. In agreement with that, the *Gpxh* expression also increased under high light illumination, as a result of increased formation of  $^1\text{O}_2$  by charge recombination during photoinhibition. This *Gpxh* response to high light intensity could be further stimulated by the phenolic herbicide dinoterb, lowering the redox potential of  $\text{Q}_\text{A}^-$  and by this increasing the frequency of charge recombination and the production of  $^1\text{O}_2$ . DCMU (1-(3,4-dichlorophenyl)-3,3-dimethylurea), which increases the redox potential of  $\text{Q}_\text{A}^-$  and probably reduces charge recombination and photoinhibition, also reduced the *Gpxh* induction by high light illumination. These results showed that the *Gpxh* gene is specifically upregulated by increased levels of  $^1\text{O}_2$  in the thylakoids generated either by exogenous photosensitizers or during photoinhibition.

Under high light illumination, a *Gpxh*-arylsulfatase reporter gene construct showed a different expression profile compared to *Gpxh*. We therefore hypothesized a second signal beside  $^1\text{O}_2$  to be involved in the response of the *Gpxh* gene to high light treatment, which does not influence the expression of the reporter gene construct. This second unknown signal seems to be produced only after 60 to 80 min of exposure to strong light, when the  $^1\text{O}_2$ -induction decreases again. However, this signal is speculated to be responsible for the ongoing upregulation of the *Gpxh* gene after prolonged illumination with high light intensities. This probably requires a regulation mechanism involving either

transcription factor binding site or an mRNA stabilization element which are absent in the *Gpxh*-arylsulfatase reporter gene construct.

### **Characterization of the *Gpxh* Promoter**

A CRE/AP-1 homologous regulatory element in the promoter region of the *Gpxh* gene is required for the induction by  $^1\text{O}_2$ , whereas a role of a 16 bp palindrome in this response could be excluded. In addition was this 8 bp element sufficient to introduce the  $^1\text{O}_2$  response in a  $\beta$ -tubulin promoter and the specific formation of a DNA binding complex on a *Gpxh* promoter fragment suggested that this 8 bp element functions as an active transcription factor binding site. A further differentiation between a CRE and an AP-1 element, using specific nucleotide mutations, failed, but the mutations suggested that a widespread TGAC motif, found in many homologous elements, is crucial for the function of the element. The addition of cyclic AMP and cyclic GMP analogs to the growth medium showed an inhibitory effect of the cyclic nucleotide signaling pathway on *Gpxh* expression. This is rather unusual and in contradiction to the effect of cAMP on typical CRE-dependent genes. However, this shows that different signal transduction pathways can affect the regulation of the *Gpxh* expression either positively or negatively.

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen und Algen die Umwandlung von Licht in chemische Energie durch die Photosynthese laufend verbessert, um so die nötigen Reduktions-äquivalente und chemische Energie in Form von ATP für die CO<sub>2</sub> Fixierung bereitstellen zu können. Um ein optimales Funktionieren der Photosynthese zu gewährleisten, besitzen photosynthetische Organismen verschiedene Anpassungsmechanismen, die ihnen erlauben den Elektronentransport in den Photosystemen zu kontrollieren und den ständig wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. Trotzdem können extreme Umweltbedingungen, zum Beispiel hohe Lichtintensität, die Photosyntheseaktivität stören und dadurch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) fördern. Wenn nun die Produktion von ROS die Kapazität der zellulären Abwehrsysteme übersteigt, entsteht in den Zellen ein so genannter oxidativer Stress und eine Schädigung von verschiedenen Zellkomponenten. Einer der häufigsten Effekte von hohen Lichtintensitäten ist der <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-abhängige Abbau des Chlorophyll bindenden D1 Proteins und der daraus folgende Zerfall des Photosystems II, ein Prozess, der als Photoinhibition bezeichnet wird. Die Entstehung von ROS in den Chloroplasten kann auch durch Schadstoffe und Herbizide in der Umwelt, welche die Photosynthese hemmen, stimuliert werden, was einen oxidativen Stress unter normalen Lichtbedingungen verursacht.

Weiter können ROS auch direkt durch phototoxische Substanzen (Photosensibilisator) produziert werden, welche durch Lichtabsorption angeregt werden und dadurch unkontrollierte Redoxreaktionen (Typ I) oder <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Entstehung (Typ II) bewirken können. Als Folge davon verursachen grosse Mengen dieser Substanzen in belichteten Zellen einen photooxidativen Stress,

aber Pflanzen und Algen haben effiziente Abwehrstrategien entwickelt, um sich vor ROS und oxidativem Stress zu schützen. Diese Abwehrmechanismen bestehen aus einer allgemeinen Stressantwort, die auch durch Hitzeschock und andere Stressbedingungen induziert werden kann, und einer spezifischen Abwehrreaktion, die meist direkt und spezifisch durch die Entstehung von ROS reguliert wird. Die genetische Reaktion eines Organismus auf eine Stresssituation gibt daher oft Aufschluss über den in der Zelle herrschenden Stress, was in der Ökotoxikologie als Indikator für den Stresszustand eines Organismus verwendet werden kann, vorausgesetzt, die Mechanismen und Spezifität der Reaktion sind bekannt. Aus diesem Grund verwendeten wir die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, ein oft gebrauchter photosynthetischer Modellorganismus für den viele molekulare Methoden bestens etabliert sind, um die photooxidative Stressreaktion von photosynthetischen Organismen zu studieren und besser zu verstehen.

In dieser Arbeit wurde die genetische Antwort von *C. reinhardtii* auf photooxidativen Stress untersucht, welcher entweder durch exogene phototoxische Substanzen oder durch bestimmte extreme Umweltbedingungen verursacht wurde. Speziell konzentrierten wir uns auf die gesamte genetische Reaktion der Zelle auf einen Typ I oder Typ II Photosensibilisator (Kapitel 2) und untersuchten dann genauer den Induktionsmechanismus des Glutathion-Peroxidase homologen Gens *Gpxh*. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Gpxh* Gens spezifisch durch  $^1\text{O}_2$  hochreguliert wird (Kapitel 3) und auch durch  $^1\text{O}_2$  aus der stark belichteten Photosynthese induziert wird (Kapitel 4). Weiter wurde ein Regulationselement in der Promoterregion des *Gpxh* Gens genauer untersucht, das Homologie zu bekannten CRE/AP-1 Elementen in oxidativen Stressgenen von anderen Organismen aufweist (Kapitel 5). Wir konnten zeigen, dass dieses CRE/AP-1 Element wirklich notwendig ist für die *Gpxh* Induktion durch  $^1\text{O}_2$  und dass höchst wahrscheinlich noch andere Regulationswege die *Gpxh* Expression beeinflussen.



## Typ I und Typ II Photooxidative Stressantwort

Mit Hilfe von DNA-Mikrochips wurde die genetische Reaktion von *C. reinhardtii* auf den Typ I Photosensibilisator Neutralrot (NR) und den Typ II Sensibilisator Bengalrosa (BR) analysiert. Mehrere allgemeine und oxidative Stressgene wurden stark durch NR hochreguliert, im Gegensatz zu den meisten photosynthetischen Genen, deren Expression durch NR abreguliert wurde. Nur ein einziges Gen konnte als stark BR-induziert identifiziert werden. Für die NR- und BR-induzierten Gene wurden zusätzlich Expressionsprofile bei mehreren oxidativen Stressbedingungen erstellt, die aufzeigten, dass die meisten dieser Gene durch einen gemeinsamen Mechanismus, der allgemein durch oxidativen Stress aktiviert wird, reguliert zu sein scheinen. Im Gegensatz dazu wird die NR-induzierte Expression des *Gpxh* Gens wahrscheinlich durch einen anderen, unabhängigen Mechanismus reguliert, der möglicherweise durch die Bildung von  $^1\text{O}_2$  stimuliert wird. Darauf deutet auch die Hochregulierung von *Gpxh* durch BR hin. Tatsächlich konnte mit EPR-spin trap Messungen eine Stimulierung der  $^1\text{O}_2$ -Bildung durch NR in isolierten Spinatthylakoiden nachgewiesen werden, was die Möglichkeit einer  $^1\text{O}_2$ -Bildung als gemeinsames Signal für die *Gpxh* Induktion durch NR und BR unterstützt.

## Induktion des *Gpxh* Gens

Die durch NR und BR verursachte Toxizität und *Gpxh* Induktion in *C. reinhardtii* waren abhängig von der Konzentration der Chemikalie und der Lichtintensität, was für von Photosensibilisatoren verursachte Effekte üblich ist. Trotzdem sind verschiedenen Wirkungsweisen verantwortlich für die Toxizität von NR und BR, aufgezeigt durch den unterschiedlichen Einfluss von  $^1\text{O}_2$ -abfangenden Substanzen wie DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) und Histidin auf das Wachstum von NR- und BR-gestressten Kulturen. Beide

Substanzen reduzierten die toxische Wirkung von BR auf die Zellen, was klar auf einen  $^1\text{O}_2$ -Effekt, möglicherweise auf eine Komponente der Zellmembran, hinweist. Die NR-Toxizität wurde dagegen kaum durch die  $^1\text{O}_2$ -abbauenden Substanzen beeinflusst und kann daher nicht auf einen  $^1\text{O}_2$ -Effekt zurückgeführt werden oder nur auf einen lokalen Effekt im Zellinnern, wo DABCO und Histidin nicht hingelangen.

Die *Gpxh* Induktion durch NR und BR wird hingegen von beiden Substanzen durch die Produktion von  $^1\text{O}_2$  bewirkt, was durch eine Verdoppelung dieser Induktion in  $\text{D}_2\text{O}$  versetztem Medium, welches die Reaktionshäufigkeit von  $^1\text{O}_2$  erhöht, gezeigt wurde. Zusätzlich konnte eine konzentrations- und lichtabhängige Produktion von  $^1\text{O}_2$  durch NR in isolierten Spinatthylakoiden gemessen werden. Dies deutet auf eine Induktion von *Gpxh* durch die gezielte Bildung von  $^1\text{O}_2$  in den Chloroplasten hin, was durch die erhöhte Expression von *Gpxh* bei hoher Lichtintensität, bekannt für die Bildung von  $^1\text{O}_2$  durch Ladungsrekombination im Photosystem II, bestätigt wurde. Phenolische Herbizide wie Dinoterb erniedrigen das  $\text{Q}_\text{A}^-$  Redoxpotential, stimulieren dadurch die Ladungsrekombinationsfrequenz und die Bildung von  $^1\text{O}_2$  während der Photosynthese und bewirkten daher auch eine zusätzliche Erhöhung der *Gpxh* Induktion durch hohe Lichtintensität. Im Gegensatz dazu reduzierte DCMU (1-(3,4-Dichlorophenyl)-3,3-dimethylurea) die Starklichtinduktion, weil DCMU das Redoxpotential von  $\text{Q}_\text{A}^-$  erhöht und damit wahrscheinlich die Häufigkeit der Ladungsrekombination und Photoinhibition verringert. Diese Resultate zeigen klar auf, dass *Gpxh* spezifisch durch die Bildung von  $^1\text{O}_2$  in den Thylakoiden, entweder durch exogene Photosensibilisatoren oder während der Photoinhibition, hochreguliert wird.

Da ein *Gpxh*-Arylsulfatase Reporter-gen Konstrukt ein anderes Expressionsprofil bei hoher Lichtintensität als das *Gpxh* Gen aufwies, stellten wir die Hypothese auf, dass ein zweites Signal neben  $^1\text{O}_2$  in die Induktion des *Gpxh* Gens involviert sein muss, welches die Expression des Reporter-gens nicht beeinflusst. Dieses

zweite, unbekanntes Signal scheint aber erst nach einer 60 bis 80-minütigen Belichtung mit hoher Lichtintensität zu entstehen, wenn die Produktion von  $^1\text{O}_2$  wieder absinkt, und wäre dann für die andauernde Induktion von *Gpxh* nach über 80 Minuten Exposition verantwortlich. Dazu wäre eine zusätzliche Transkriptionsfaktorbindungsstelle oder ein mRNA stabilisierendes Element im *Gpxh* Gen erforderlich, welche(s) dann verständlicherweise im *Gpxh*-Arylsulfatase Reporterkonstrukt fehlen sollte.

### **Charakterisierung des *Gpxh* Promotors**

Wir konnten zeigen, dass ein CRE/AP-1-homologes Regulationselement in der *Gpxh* Promoterregion absolut notwendig für die Induktion durch  $^1\text{O}_2$  ist, im Gegensatz zu einem 16 bp Palindrom, das nicht in diesen Prozess involviert ist. Dieses 8 bp Element reichte sogar aus, einen  $^1\text{O}_2$ -regulierbaren  $\beta$ -Tubulinpromotor zu konstruieren, und die spezifische Bildung eines DNA bindenden Komplexes an einem *Gpxh* Promoterfragment deutete klar auf eine Funktion dieses Elements als aktive Transkriptionsfaktorbindungsstelle hin. Leider konnte mit spezifischen Punktmutationen keine genauere Unterscheidung zwischen einem CRE und AP-1 Element erreicht werden, aber diese Mutationen zeigten auf, dass ein weit verbreitetes TGAC-Motiv, das in vielen homologen Elementen gefunden wird, wichtig für die Funktion der Bindungsstelle ist. Des Weiteren konnte mit Hilfe von zyklischen AMP- und zyklischen GMP-analogen Substanzen eine hemmende Wirkung des zyklischen Nukleotid-Signalweges auf die *Gpxh* Expression gemessen werden, was eher selten ist und nicht mit dem bekannten Effekt von zyklischem AMP auf CRE-abhängige Gene vereinbar ist. Doch dieses Beispiel zeigt, dass verschiedene Signalübertragungswege die *Gpxh* Expression entweder positiv oder negativ beeinflussen können.