

**SINGLET OXYGEN-MEDIATED SIGNALING OF STRESS RESPONSES
OF *ARABIDOPSIS***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

DOMINIKA AGNIESZKA PRZYBYLA

MSc, Agricultural University of Poznan, Poland

born 13.02.1976
citizen of Poland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Klaus Apel, examiner
Prof. Dr. Nikolaus Amrhein co-examiner

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are produced in cells as a by-product of various metabolic pathways under both physiological steady state and stress conditions. For instance, excitation of porphyrin molecules can lead to the release of ROS such as singlet oxygen. To be protected against oxidative damage, plants have evolved a regulatory system, which controls the tetrapyrrole biosynthetic pathway and prevents the accumulation of free intermediates that are extremely destructive upon illumination. In angiosperms, tetrapyrrole biosynthesis is blocked in the dark, once a critical level of protochlorophyllide (Pchl_{id}), the immediate precursor of chlorophyll, has been reached. Free Pchl_{id} acts upon illumination as a photosensitizer and transfers absorbed energy to the triplet, ground state molecular oxygen leading to the formation of singlet oxygen.

The conditional *flu* mutant of *Arabidopsis thaliana* is no longer able to suppress the accumulation of protochlorophyllide in the dark and thus is susceptible to photooxidative stress. Release of singlet oxygen after a dark-to-light shift causes death of seedlings and inhibits the growth of mature plants. The visible stress responses of *flu* are the result of the activation of genetically controlled pathways as indicated by the isolation of second-site mutants that are able to overcome the inhibitory effect of singlet oxygen. One of the identified loci, named *Executer1*, is indispensable for singlet oxygen-mediated growth inhibition and cell death.

The two major goals of this work were firstly, the characterization of the *executer1* mutant and secondly, the elucidation of the role of oxylipins during the singlet oxygen-mediated stress response.

The *ex1/flu* double mutant is no longer affected by the light/dark cycle. It shows a similar growth behavior as wild type (WT). The formation of necrotic lesions is reduced and occurs later after re-illumination as in the *flu* mutant. Suppression of cell death by the *ex1* mutation is also demonstrated in wild-type plants treated with the herbicide DCMU. However, under harsh oxidative stress conditions the cytotoxic effect of singlet oxygen is no longer suppressed by the inactivation of *Ex1*.

The release of singlet oxygen in the *flu* mutant leads to the formation of oxylipins - oxidation products of polyunsaturated fatty acids (PUFA). Enantiomer composition analysis showed that oxidation products of PUFAs were formed via the enzymatic 13-lipoxygenase (13-LOX) pathway. One branch of this pathway results in the production of 12-oxo-phytodienoic acid

(OPDA) and jasmonic acid (JA). The introduction of the *ex1* mutation almost completely abolished the singlet oxygen-mediated activation of enzymatic lipid peroxidation in the *flu* mutant. Oxylipins have already been shown to be involved in triggering stress responses of plants induced by biotic and abiotic stimuli. They have also been proposed to play a role in a signaling cascade inducing cell death.

The role of oxylipins during visible stress responses in the *flu* mutant after the release of singlet oxygen was investigated using mutants that are impaired in oxylipin biosynthesis. These mutants were crossed with *flu* and analyzed according to their sensitivity to the dark/light shift. In this work, we could demonstrate that the enzymatic oxygenation of membrane lipids and accumulation of oxylipins originating from 13-LOX pathway are not involved in the inhibition of growth of *flu* plants and the induction of necrosis formation. Rather, generation of oxylipins modulates the singlet oxygen-induced cell death response.

Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) werden in den Zellen als Nebenprodukte der verschiedenen Stoffwechselwege, sowohl unter normalen, physiologischen Bedingungen als auch unter Stressbedingungen, freigesetzt. So kann beispielsweise die Anregung von Porphyrin-Molekülen die Freisetzung von den ROS, wie zum Beispiel Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), zur Folge haben. Um sich vor der oxidativen Schädigung zu schützen, haben die Pflanzen einen Mechanismus entwickelt, der die Tetrapyrrolbiosynthese kontrolliert und damit die Akkumulation freier Zwischenprodukte verhindert. Diese Zwischenprodukte können bei Belichtung in der Zelle grosse Schäden verursachen. Bei höheren Pflanzen wird nach Erreichen einer kritischen Menge an Protochlorophyllid (Pchlid) im Dunkeln der Tetrapyrrolbiosyntheseweg völlig unterdrückt. Freies Pchlid wirkt nach Belichtung als ein extrem starker Photosensitizer. Die vom Pchlid absorbierte Anregungsenergie kann von molekularem Sauerstoff aufgenommen und in hochaktiven Singulett-Sauerstoff umgewandelt werden.

Die *flu* Mutante von *Arabidopsis thaliana* ist nicht mehr in der Lage die Akkumulation des Protochlorophyllids im Dunkeln zu unterdrücken, und ist deswegen gegenüber photooxidativem Stress empfindlich. Die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff nach einem Wechsel vom Dunkel ins Licht führt zum Absterben der Keimlinge sowie zu einer Wachstumshemmung in adulten Pflanzen. Die sichtbaren Stresssymptome in der *flu*-Mutante werden durch genetische Programme ausgelöst. Diese Schlussfolgerung konnte aufgrund der Isolierung von *second-site*-Mutanten gemacht werden, die die hemmende Wirkung vom Singulett-Sauerstoff überwinden. Ein der mutierten Loci, *Executer 1*, ist sowohl während der Wachstumshemmung als auch bei der Zelltod-Reaktion, die durch Freisetzung von Singulett Sauerstoff ausgelöst werden, unabdingbar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Charakterisierung der *executer 1*-Mutante und die Analyse der Funktion von Oxylipinen während der $^1\text{O}_2$ -vermittelten Stressantwort durchzuführen.

Die in der *flu*-Mutante unter Licht-Dunkel-Bedingungen beobachteten sichtbaren Stressreaktionen sind in der *ex1/flu*-Doppelmutante nicht mehr erkennbar. Die *ex1/flu* Pflanzen wachsen wie die Wildtyp-Kontrollen und auch die Nekrosen-Bildung ist reduziert und tritt deutlich später nach der Wiederbelichtung auf, als in der *flu*-Mutante. Die Unterdrückung der Zelltodreaktion durch die *ex1*-Mutation wurde auch im Wildtyp-Hintergrund von *ex1*

gezeigt, die mit dem Herbizid DCMU behandelt worden war. Allerdings werden unter starken oxidativen Stressbedingungen die cytotoxischen Effekte des Singulett-Sauerstoffes nicht mehr länger von der *ex1*-Mutante unterdrückt.

Die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff führt in der *flu*-Mutante zur Bildung von Oxylipinen, Oxidationsprodukten ungesättigter Fettsäuren (PUFAs). Die Analyse der Enantiomere hat gezeigt, dass die Oxidationsprodukte der PUFAs über den 13-Lipoxygenase-Reaktionsweg (13-LOX) gebildet werden. Ein Teil dieses Biosyntheseweges führt zu der Bildung von Jasmonsäure (JA) und 12-Oxo-phytodienensäure (OPDA). Der Verlust des Ex1 Proteines verhindert fast vollständig die $^1\text{O}_2$ -vermittelte Peroxidation der Lipide. Oxylipine vermitteln Stressreaktionen in der Pflanze. Es wird deshalb allgemein davon ausgegangen, dass sie ebenfalls an den Signalwegen beteiligt sind, die zu der Zelltod-Reaktion führen.

Um die Rolle der Oxylipine während der sichtbaren Stressreaktionen der *flu*-Mutante nach der Freisetzung vom Singulett-Sauerstoff erfassen zu können, wurde diese mit Mutanten gekreuzt, die in der Oxylipinbiosynthese beeinträchtigt sind. Die entstandenen Doppelmutanten wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber $^1\text{O}_2$ unter Licht-Dunkel-Bedingungen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Peroxidation der Membranlipide und die Akumulation von Oxylipinen, die über den 13-LOX-Weg entstanden sind, weder Auswirkungen auf die Wachstumshemmung der *flu*-Pflanzen noch auf die Nekrosenbildung haben. Es scheint eher, dass die Anreicherung an Oxylipinen eine modulierende Funktion in der $^1\text{O}_2$ -vermittelten Zelltodreaktion hat.