



Doctoral Thesis

Genetic and biochemical characterization of the singlet oxygen-induced cell death in Arabidopsis

Author(s):

Isner, Jean-Charles

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005899455> →

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. 17881

**Genetic and Biochemical Characterization
of the Singlet Oxygen-Induced Cell Death
in Arabidopsis**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

JEAN-CHARLES ISNER

M.Sc in Biochemistry, University of Strasbourg
Born January 10th, 1976
in Mulhouse, France

Accepted on recommendation of
Professor Klaus Apel
Professor Nikolaus Amrhein

2009

Summary

The conditional *flu* mutant of *Arabidopsis* overaccumulates protochlorophyllide (Pchl) within the chloroplast when in the dark. Upon reillumination, Pchl acts as a photosensitizer giving rise to singlet oxygen, a nonradical reactive oxygen species (ROS). This ROS activates a genetically determined stress response program resulting in the death of seedlings and the inhibition of growth of mature *flu* plants. Different groups of second-site mutants were identified which are able to abrogate either one or both stress responses of the *flu* mutant. One of these groups contained the Singlet Oxygen-Linked Death Activator (*soldat*) mutants that are able to survive after a dark-to-light shift at the seedling stage, even though they accumulate similar levels of Pchl as the *flu* mutant. However, the growth inhibition of mature *flu* plants is only partially suppressed by the *soldat* mutations. In the present work the *soldat30/flu* double mutant was characterized. A map-based cloning approach revealed that the mutated locus in *soldat30* encodes the chloroplast polyribonucleotide nucleotidyltransferase (PNPase). Complementing *soldat30/flu* plants with a wild type copy of the PNPase gene restored the original *flu* phenotype.

PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the correct maturation of chloroplast rRNA, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts which modifies the stability of chloroplastic mRNA. The mutation within an allelic gene of *soldat30* was shown to lead to an overaccumulation of Methyl Erythritol Phosphate (MEP) pathway enzymes. This could explain an increase in α -tocopherol, a well known singlet oxygen scavenger, observed in *soldat30*. The scavenging role of tocopherols was confirmed in *flu* by investigating cell death of the *flu/vte1* double mutant and *flu* protoplasts treated with tocopherol after a light dark shift. *soldat30* mutant seedlings showed an enhanced tolerance of photoinhibitory conditions (high light + cold) compared to the wild type, which can also be attributed to the increased accumulation of tocopherols. Taken together, these results suggest that PNPase might be a key component in the sensing of environmental cues which lead to an upregulation of tocopherols and to a higher resistance to photooxidative stress. The PNPase might also be a key component in the acclimation process. A biochemical approach was also undertaken to characterize *flu* cell death. Although carotenoid content decreased after a dark-light shift, the level of one pigment increased dramatically. MS and NMR analysis revealed that this pigment was an oxidation product of

chlorophyll a, the 13²-HO-Chl. a. Further characterization showed that it was located in all photosystem subcomplexes. Synthesis of 13²-HO-Chl. a could be reproduced *in vitro* using the photosensitizer Rose Bengal. Its accumulation *in vivo* was also observed following treatment with superoxide or H₂O₂. The 13²-HO-Chl. a might have some role in promoting the cell death during oxidative stress.

Zusammenfassung

Die konditionale fluoreszierende Arabidopsis-Mutante (*flu*) akkumuliert im Dunkeln freies Protochlorophyllid (Pchlid) in Plastiden. Pchlid kann als Photosensitizer Lichtenergie auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei Singulett Sauerstoff produziert wird, eine nichtradikalische, reaktive Sauerstoffspezies. Unmittelbar nach Belichtung der *flu* Mutante beginnt die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff, durch den anschließend ein genetisch determiniertes Stress-Programm aktiviert wird, welches zum Zelltod bei Keimlingen und zur Wachstumshemmung bei vollentwickelten *flu* Pflanzen führt. „Second-site“-Mutanten wurden identifiziert, welche fähig sind, eine oder beide Stressreaktionen der *flu* Mutante zu unterdrücken. Diese Mutanten wurden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Der „*singlet oxygen-linked death activator*“ (*soldat*) bezeichnet eine dieser Klassen. Eine der *soldat* Mutanten, *soldat30*, wurde in der vorliegenden Arbeit einer detaillierten genetischen und physiologischen Analyse unterzogen. Keimlinge der *soldat30/flu* Mutante können einen Wechsel von Dunkelheit zu Licht überleben, obwohl sie ähnliche Mengen an Pchlid wie *flu* akkumulieren. Die Wachstumshemmung der adulten *flu* Pflanzen während eines Licht-Dunkel-Wechsels wird dagegen durch die *soldat30* Mutation nicht unterdrückt. Mittels kartierungsbasierter Klonierung konnte gezeigt werden, dass der mutierte Locus von *soldat30* die plastidäre Polyribonuclease Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) kodiert. Die Wildtyp-Kopie des PNPase-Genes konnte, nachdem sie in die *soldat30/flu* Mutante eingeführt worden war, die Mutation komplementieren und den elterlichen *flu* Phänotyp wiederherstellen.

Die PNPase Aktivität beeinflusst die Effizienz der mRNA Prozessierung am 3'Ende, die korrekte Reifung der rRNA in Chloroplasten, den Abbau der tRNA und den Grad der Polyadenylierung in Chloroplasten, die die Stabilität der chloroplastidären RNA verändert. Die Mutation von *SOLDAT30* verursacht so eine Ueberakkumulation von Enzymen des Methyl Erythritol Phosphat (MEP) Weges, der zu einer erhöhten Akkumulation von α -Tocopherol führt, einem Scavenger von Singulett-Sauerstoff. Die Schutzfunktion von Tocopherol wurde in der *flu* Mutante durch die Untersuchung des Zelltods in der *flu/vte1* Doppelmutante und durch die Wirkung von exogenem Tocopherol in *flu* Protoplasten nach einem Dunkel/Licht Wechsel bestätigt. Keimlinge von *soldat30* zeigten gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz unter einer kombinierten Starklicht/Niedrigtemperatur Behandlung, die auf eine erhöhte Akkumulation von Tocopherol zurückgeführt werden kann. Insgesamt lassen diese Ergebnisse

vermuten, dass die PNPase eine Schlüsselaufgabe bei der Wahrnehmung von Umweltreizen spielt, durch die Tocopherole hochreguliert werden und eine erhöhte Resistenz gegenüber photooxidativem Stress ausgelöst wird. Die PNPase könnte auch eine wichtige Rolle bei der Akklimatisierung spielen.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mit einem biochemischen Ansatz der Zelltod in der *flu* Mutante charakterisiert. Obwohl nach einem Dunkel/Licht Wechsel der Carotinoidgehalt allgemein abnimmt, steigt die Konzentration eines einzelnen Pigments drastisch an. MS- und NMR-Analysen identifizierten dieses Pigment als ein Oxidationsprodukt von Chlorophyll a, das 13²-HO-Chl a. Die weitere Charakterisierung ergab, dass dieses Pigment in allen Subkomplexen der Photosynthesemembran auftritt. Die Synthese von 13²-HO-Chl a konnte auch unter in vitro Bedingungen durch Zugabe des Photosensitizers Rose Bengal sowie nach Behandlung mit Superoxid oder H₂O₂ erreicht werden. 13²-HO-Chl a könnte bei der Auslösung des Zelltods während oxidativem Stress eine Rolle spielen.