ETH zürich

ETH Library

On the biochemistry and physiology of vitamin B_1 and vitamin B_6 biosynthesis in Arabidopsis thaliana

Doctoral Thesis

Author(s):
Raschke, Maja

Publication date:
2009

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-005840177

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. 18235

ON THE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF VITAMIN B_1 AND VITAMIN B_6 BIOSYNTHESIS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*.

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES ETH ZURICH

presented by

MAJA RASCHKE

Dipl.-Ing., Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany

born 15 September 1977

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Nikolaus Amrhein, examiner

Prof. Dr. Teresa B. Fitzpatrick, co-examiner

Prof. Edward E. Farmer, co-examiner

2009

0 Summary

The aim of the present study is to provide a more detailed insight into the *de novo* biosynthesis of vitamin B_1 (thiamin diphosphate, ThDP) and vitamin B_6 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) in plants. Both vitamins are essential compounds for growth and development, predominantly involved in carbohydrate and amino acid metabolism, respectively. Whereas bacteria, fungi and plants can synthesize both compounds *de novo*, humans and animals have to obtain them with their diet. Their *de novo* biosynthesis has been extensively studied in bacteria (*Escherichia coli*), whereas in plants a complete understanding of vitamin B_1 biosynthesis, in particular, is fragmentary.

In this study, *de novo* biosynthesis of the precursor molecule of the pyrimidine moiety of vitamin B_1, 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine phosphate (HMP-P) was addressed. In bacteria, HMP-P originates from 5-aminoimidazole ribonucleotide (AIR_t), catalyzed by ThiC. In yeast, however, HMP-P is derived from L-histidine and vitamin B_6, catalyzed by members of the THI5 or NMT1 family. In this study, comprehensive BLAST searches revealed the presence of a homolog of ThiC in *A. thaliana*, whereas no homolog of the THI5/NMT1 family could be identified. AtTHIC is indispensable for *de novo* synthesis of vitamin B_1 and is absolutely essential for plant development beyond the cotyledon stage. A knockdown of this gene leads to a clear reduction in the vitamin B_1 level, eventually leading to seedling lethality unless thiamin is provided as a nutrient. The THIC protein is localized in the chloroplasts. Furthermore, the *THIC* transcript level was found to be regulated by light and to be repressed when thiamin is present in the medium, indicative of the occurrence of a riboswitch-mediated transcriptional control of the gene. The heterologously expressed AtTHIC protein revealed the presence of an iron-sulfur cluster, which could also be shown with the bacterial ThiC homolog.

The second part of the study dealt with vitamin B_6. This compound has been shown, only recently, to be derived in plant systems from ribose 5-phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and glutamine. The biosynthesis is catalyzed by a heteromeric protein complex, consisting of PDX1 and PDX2, which acts as a glutamine amidotransferase giving directly rise to the formation of PLP. Whereas three *PDX1* homologs, *i.e. PDX1.1*, *PDX1.2*, *PDX1.3*, were identified in *A. thaliana*, only a single homolog of *PDX2* is present. Recently, vitamin B_6 has been found to also act as a potent quencher of reactive oxygen species. To investigate whether vitamin B_6 plays a comparable role in plant systems as well, *A. thaliana* lines were established

accumulating vitamin B_6 significantly above WT levels. Plants with increased vitamin B_6 levels show a delay in bolting and a reduced seed set in the siliques, but an overall increase in seed biomass yield. An increase in the major storage substances, *i.e.* lipid, carbohydrates and protein, contributes to the enlarged seed size. Experimental evidence is provided that vitamin B_6 may indeed act as a protectant in oxidative stress responses in *Arabidopsis*, using *flu* mutant lines, that are characterized by a burst of singlet oxygen upon the shift from the dark to the light, as well as by paraquat and rose bengal treatment.

Furthermore, PDX1.1 and PDX1.3 may have distinct roles in the regulation of vitamin B_6 biosynthesis in plants. In particular, PDX1.3 (as a housekeeping enzyme) may predominantly be involved in the maintenance of a certain level of vitamin B_6 throughout plant development, while PDX1.1 may be involved in ensuring vitamin B_6 homeostasis under certain environmental conditions, as demonstrated for a combination of high light intensity and cold. Vitamin B_6 levels increase upon treatment with paraquat and decrease in the presence of NaCl as well as rose bengal treatment (the latter in combination with sucrose) and with sucrose treatment alone. However, transcript levels of *PDX1* and *PDX2* were not clearly correlated with the vitamin B_6 content, implying regulatory mechanisms of vitamin B_6 biosynthesis beyond those of transcript synthesis.

In addition, previous studies had revealed that a knockout of both *PDX1.1* and *PDX1.3* is embryo lethal, thus excluding PDX1.2 from catalytic participation in *de novo* vitamin B_6 biosynthesis. Its actual function remains unclear to date. However, the response to certain stimuli was investigated in this study and revealed that the gene is up-regulated particularly in response to sucrose treatment and to the production of singlet oxygen. Constitutively enhanced protein levels of PDX1.2 increase the susceptibility to high-light exposure in *A. thaliana* and affect the transcript levels of other genes related to vitamin B_6 biosynthesis in the abovementioned *flu* mutant line.

0 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der de novo Biosynthese von Vitamin B1 (Thiaminpyrophosphat, ThDP) und Vitamin B_6 (Pyridoxal 5'-Phosphat, PLP) in Pflanzen. Diese Vitamine sind essentiell für Wachstum und Entwicklung und insbesondere in Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus involviert. Während sie von Bakterien, Pilzen und Pflanzen synthetisiert werden, müssen Menschen und Tiere sie mit der Nahrung aufnehmen. Im Gegensatz zu Bakterien (*Escherichia coli*), in denen die *de novo* Biosynthese beider Substanzen detailliert untersucht wurde, ist das Wissen über die Vitamin B_1 Biosynthese in Pflanzen noch immer unvollständig.

In dieser Studie wurde die Biosynthese der Vorstufe der Pyrimidin-Untereinheit von Vitamin B_1, 2-Methyl-4-Amino-5-Hydroxymethylpyrimidinphosphat (HMP-P), betrachtet. In Bakterien wird HMP-P ausgehend von 5-Aminoimidazol Ribonukleotid (AIR_t), durch das Enzym ThiC, synthetisiert. Im Gegensatz dazu wird HMP-P in Hefen aus L-Histidin und Vitamin B_6 durch Mitglieder der Enzymfamilie THI5 bzw. NMT1 gebildet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Homolog von ThiC, jedoch nicht von THI5/NMT1, in *A. thaliana* identifiziert werden. AtTHIC ist für die *de novo* Biosynthese von Vitamin B_1 unabdingbar und ist damit für die Pflanze nach der Entwicklung der Keimblätter essentiell. Eine reduzierte Expression des Genes führt zu einer Reduktion des Vitamin B_1-Gehaltes und letztendlich zum Absterben des Sämlings, sofern kein Vitamin B_1 zugeführt wird. THIC ist ein chloroplastidäres Protein. Die THIC Transkription wird durch Licht stimuliert sowie durch exogenes Thiamin reprimiert. Letzteres weist auf die Kontrolle der Transkription durch einen sogenannten Riboswitch hin. In *E. coli* heterolog exprimiertes AtTHIC enthält, wie das bakterielle Homologe, ein Eisen-Schwefel-Cluster.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit Vitamin B_6. Die Biosynthese, ausgehend von Ribose 5-Phosphat, Glycerinaldehyd 3-Phosphat und Glutamin, wurde in Pflanzen gezeigt. Die Katalyse erfolgt durch einen heterogenen Proteinkomplex mit Glutaminamidotransferase-Aktivität bestehend aus den Proteinen PDX1 und PDX2. In *A. thaliana* wurden drei *PDX1* Gene, *PDX1.1*, *PDX1.2* und *PDX1.3*, identifiziert, hingegen nur ein *PDX2* Gen. Es wurde berichtet, dass Vitamin B_6, neben seiner Cofaktorfunktion, reaktive Sauerstoffspezies unschädlich macht. Um die Funktionen von Vitamin B_6 in Pflanzen weiter zu untersuchen, wurden *A. thaliana* Linien mit erhöhten Vitamin B_6 Gehalten erzeugt. Die Vitamin B_6 überproduzierenden Pflanzen zeigen einen verzögerten Beginn des Schossens und eine verringerte

Samenzahl pro Schote, jedoch ein höheres Samengewicht. In den signifikant grösseren Samen wurde eine Zunahme der drei Hauptspeicherstoffe Fette, Kohlenhydrate und Einweisse nachgewiesen. In Vitamin B_6 akkumulierenden *A. thaliana flu*-Mutanten Linien, in denen durch Belichtung Singulettsauerstoff freigesetzt wird, sowie bei Behandlung mit Paraquat und Rose Bengal, erhöht Vitamin B_6 die Toleranz gegen oxidativen Stress.

Des weiteren könnten PDX1.1 und PDX1.3 unterschiedliche Aufgaben in der Vitamin B_6-Biosynthese in Pflanzen übernehmen. PDX1.3 scheint vorrangig für die Sicherstellung des Vitamin B_6 Grundbedarfs verantwortlich zu sein, während PDX1.1 die Versorgung bei Stressreaktionen zu übernehmen scheint. Letzteres wurde mittels einer kombinierten Behandlung mit Starklicht und Kälte demonstriert. Der Gehalt an Vitamin B_6 nimmt bei Behandlung mit Paraquat zu, durch Behandlung mit NaCl oder Sacchrose, allein oder in Verbindung mit Rose Bengal, nimmt er ab. Es konnte aber keine Korrelation zwischen den Transkriptmengen von *PDX1* und *PDX2* sowie Vitamin B_6 gezeigt werden, was vermuten lässt, dass die Vitamin B_6 Biosynthese nicht ausschliesslich durch die Transkription von PDX1 und PDX2 reguliert wird.

Da der gleichzeitige Ausfall von *PDX1.1* und *PDX1.3* für die Pflanze letal ist, kann PDX1.2 nicht an der Katalyse der Biosynthese von Vitamin B_6 beteiligt sein. Eine spezifische Funktion konnte PDX1.2 bisher jedoch nicht zugeordnet werden. Daher wurde der Effekt verschiedener Stressfaktoren im Rahmen dieser Arbeit untersucht und es zeigte sich, dass insbesondere hohe Konzentrationen an Saccharose oder Singulettsauerstoff einen erhöhten *PDX1.2* Transkriptgehalt bewirken. Ein konstitutiv erhöhter Gehalt an PDX1.2 Protein vermindert die Toleranz gegenüber Starklicht und beeinflusst in der oben genannten *flu*-Mutanten Linie den Transkriptgehalt von Genen, die mit der Vitamin B_6 Biosynthese in Zusammenhang stehen.