ETH zürich

ETH Library

Charakterisierung des EXECUTER1-Proteins von Arabidopsis thaliana

Doctoral Thesis

Author(s):
Mahler, Hanno

Publication date:
2010

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-006023062

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.

Dissertation ETH Nr. 18825

Charakterisierung des EXECUTER1-Proteins von *Arabidopsis thaliana*

Abhandlung zur Erlangung des Titels Doktor der Wissenschaften

Dr. sc. ETH Zürich

Vorgelegt dem Departement Biologie der

Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von

Hanno Mahler

Diplom Biologe, Justus-Liebig-Universität Giessen, Deutschland

geboren am 21. Juli 1978 in Friedberg, Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Claudia Köhler, Prof. Klaus Apel

2010

Summary

The EXECUTER1 protein performs an essential function in singlet oxygen activated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. This discovery is due to the research carried out with the *flu* mutant, in which oxidative stress can be provoked in a controlled manner.

The *flu* mutant suffers extensive damage after a change from a period of darkness to light. Adult individuals develop necrosis and growth inhibition while seedlings bleach and die. The reason for this phenotype is the loss of control over chlorophyll biosynthesis. Protochlorophyllide is unphysiologically accumulated in darkness and produces singlet oxygen after onset of light. The visible damage is not directly caused by this component, though. The *flu*-phenotype rather is the result of a genetically controlled cell death. This became evident through a second site mutation, which completely reverses the original *flu*-phenotype without decreasing the amount of excess protochlorophyllide. The mutated gene was labelled *EXECUTER1* (*EX1*). Since this mutation almost completely inhibits stress related gene activation after stress induction, the corresponding protein EX1 must have a pivotal role in oxidative stress signal transduction. While research had already been conducted on FLU and the protein had been closely described, the EX1 protein is still a less understood entity.

In this study, the properties of the EX1 protein have been analysed, possible interacting proteins searched for and found. It could be determined that EX1 is part of a protein complex that is associated with the thylakoid membrane. It is located at the stromal side of the membrane. In an immunoprecipitation assay with extracted proteins from intact chloroplasts possible partners of interaction have been found which could reveal the mode of action of EX1. Among those the γ-subunit of the ATP-synthase already has been described as being significant in the matter of oxidative stress. Other interacting proteins are two FtsH-metalloproteases and several subunits of photosystem II. With this information a new model of stress related programmed cell death can be established which emanates from the chloroplast.

Zusammenfassung

Das Protein EXECUTER1 übt seine Funktion an einer entscheidenden Stelle der durch Singulett-Sauerstoff aktivierten Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* aus. Diese Entdeckung ist der Erforschung der *flu*-Mutante zu verdanken, in der sich auf kontrollierte Weise oxidativer Stress induzieren lässt.

Die *flu* Mutante trägt nach einem Wechsel von Dunkel nach Licht Schäden in Form von Läsionen und Wachstumshemmung davon. Keimlinge der Mutante werden durch diese Prozedur ausgeblichen und abgetötet. Der Grund für diesen Phänotyp ist der Verlust einer Kontrollfunktion der Chlorophyllsynthese. Im Gegensatz zum Wildtyp wird die Synthese von Protochlorophyllid im Dunkeln nicht blockiert. Es akkumuliert und erzeugt mit einsetzender Belichtung Singulett-Sauerstoff. Dieser ist jedoch nur indirekt für die sichtbaren Schäden verantwortlich. Vielmehr handelt es sich beim *flu*-Phänotyp um die Auswirkung einer genetisch kontrollierten Zelltodreaktion. Dies wurde durch eine erneute Mutagenisierung deutlich, welche den *flu*-Phänotyp vollständig revertiert ohne die Bildung von Protochlorophyllid zu vermindern. Das mutierte Gen wurde *EXECUTER1* (*EX1*) genannt. Da die Mutation von *EX1* die für Wildtyp charakteristische Genaktivierung nach Stressinduktion fast komplett unterdrückt, muss es sich hierbei um ein entscheidendes Glied der Signaltransduktionskette des oxidativen Stresses handeln. Während FLU bereits untersucht und die Funktion des Proteins genau beschrieben wurde, ist über das EX1 Protein wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften des EX1-Proteins untersucht, nach möglichen Interaktionspartnern gesucht und diese gefunden. Es konnte festgestellt werden, dass EX1 ein Teil eines Proteinkomplexes ist, der mit der Thylakoidmembran assoziiert vorliegt. Dabei befindet er sich an der stromatären Seite der Membran. Als mögliche Interaktionspartner des EX1 konnten in einer Immunopräzipitations-Analyse mit Proteinextrakt aus intakten Chloroplasten Bindungspartner gefunden werden, welche Aufschluss über die Funktion des Proteins geben können. Darunter findet sich zum einen die γ-Untereinheit der ATP-Synthase, welche bereits in früheren

Untersuchungen in Zusammenhang mit oxidativem Stress gebracht wurde. Zum anderen stehen auch FtsH-Metalloproteasen und Bestandteile des Photosystems II in Interaktion mit EX1. Hieraus könnte sich ein neues Modell des stressaktivierten programmierten Zelltods ergeben, welches seinen funktionalen Ausgangspunkt im Chloroplast hat.