

Diss. Nr. ETH 11250

Isolation and characterization of a novel NADPH-
protochlorophyllide oxidoreductase (PORB)
from barley (*Hordeum vulgare* L.)

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Hauke Holtorf
Dipl.-Biologe
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
born January, 6th, 1964 in Schleswig,
BR Deutschland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. K. Apel, examiner
PD Dr. G. Neuhaus, co-examiner

Zürich 1995

Partially published in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, No 8, pp 3254 - 3258

Abstract

The key regulatory step in angiosperm chlorophyll (Chl) biosynthesis, the light-dependent photoconversion of protochlorophyllide (Pchl_{id}) to chlorophyllide (Chl_{id}), is catalyzed by the enzyme NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (POR, EC 1.6.99.1). Results presented thus far on this POR-catalyzed formation of Chl_{id}, could not satisfactorily explain the steady supply of Chl_{id} in light-adapted, green angiosperms. Light exerts a dramatic negative regulation on POR-mediated light-dependent Pchl_{id} reduction. POR enzyme activity and protein as well as *Por* mRNA disappear rapidly upon illumination of barley seedlings. Substantial amounts of Chl first begin to accumulate at a time when POR enzyme activity is already at the limit of detection. This pattern of negative light regulation of POR is inconsistent with sustained Chl synthesis required by plants to meet pigment demands during normal growth. Several ideas have been proposed to explain this apparent paradox. First, a light-independent Chl biosynthetic pathway was reported for dark-adapted, preilluminated angiosperms. Another light-independent mechanism for Chl formation was shown to operate in anoxygenic photosynthetic bacteria, cyanobacteria, algae, and gymnosperms. This pathway, however, needs no preillumination and the genes which control light-independent Chl synthesis are not related to *Por*. No sequences homologous to such genes could be identified in angiosperms. Second, small amounts of a POR enzyme have been detected in greened plants and it was proposed that such residual amounts of a single light-dependent POR suffice to satisfy the steady demand for freshly synthesized Chl during normal plant development. Third, constant Chl formation could also be achieved by distinct and differentially regulated light-dependent POR enzymes. Occasionally, multiple POR polypeptide species recognized by anti-POR antibodies have been described. However, no evidence has been presented thus far for the presence of more than one POR protein, since previous studies with several angiosperms have reported only single *Por* cDNAs or nuclear genes. In this study an attempt was made to amplify additional *Por*-related cDNA sequences from barley by RT-PCR, an approach that was based on the observation that POR proteins from various gymnosperm and angiosperm species exhibit a high degree of protein and nucleotide sequence homology. *Por*-specific primers were derived from regions which are conserved among *Por* coding sequences from different species. RT-PCR was performed with poly(A)⁺ RNA, which was extracted from such tissue samples that had formerly been demonstrated to contain only trace amounts of *Por* mRNA. The existence of a second POR-related protein was verified by isolating and sequencing cDNAs that encode a novel POR polypeptide (PORB) with an amino acid sequence identity of 75% to the thus far characterized POR (PORA). The existence of two *Por* genes - *PorA* and *PorB* - in the barley genome was

confirmed. In the presence of NADPH and Pchl_a the *in vitro* synthesized PORB protein could be reconstituted to a ternary enzymatically active complex that reduced Pchl_a to Chl_a only after illumination. It was further demonstrated that light and the developmental state of the barley seedling impose dramatically different patterns of regulation on the expression of *PorA* and *PorB* genes. *PorB* was clearly shown to be expressed in greened plants. Collectively these results suggest that Chl synthesis is controlled by two different light-dependent POR enzymes, which perform distinct functions.

Zusammenfassung

Die lichtabhängige Umwandlung von Protochlorophyllid (Pchlid) zu Chlorophyllid (Chlid), katalysiert durch die NAPDH-Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR, EC 1.6.99.1), nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Chlorophyll(Chl)-Biosynthese ein. Mit Hilfe der veröffentlichten Ergebnisse über die POR-katalysierte Chl-Bildung, konnte die fortwährende Bereitstellung von Chl(id) in grünen, lichtadaptierten angiospermen Pflanzen nur unzureichend erklärt werden. Licht führt auf dramatische Weise zur negativen Regulation der POR-vermittelten Pchlid-Reduktion. Sowohl die POR Enzymaktivität als auch POR Protein- und mRNA-Mengen nehmen bei Belichtung von Gerstenkeimlingen schnell ab. Wesentliche Mengen an Chl beginnen erst dann zu akkumulieren, wenn die POR Enzymaktivität bereits an der Nachweisgrenze ist. Dieses Muster der negativen Lichtregulation der POR ist schwer vereinbar mit einer fortwährenden Chl-Synthese, die gefordert werden muss, um den Bedarf der Pflanze an Pigmenten während des normalen Wachstums zu decken. Verschiedene Vorstellungen wurden entwickelt, um dieses offensichtliche Paradoxon zu erklären. Erstens wurde ein lichtunabhängiger Chl-Biosyntheseweg in dunkeladaptierten, vorbelichteten Angio-spermen beschrieben. Ein anderer, ebenfalls lichtunabhängiger Mechanismus der Chl-Bildung konnte für anoxygene, photosynthetisierende Bakterien, Cyanobakterien, Algen und Gymnospermen gezeigt werden. Dieser Stoffwechselweg benötigt allerdings keine Vorbelichtung und die Gene, die diese lichtunabhängige Chl-Synthese steuern, sind in keiner Weise verwandt mit *Por*. In Angiospermen konnten keine Sequenzen identifiziert werden, die zu solchen Genen homolog sind. Zweitens wurde gefunden, dass geringe Mengen eines POR Proteins in ergrünten Pflanzen nachweisbar sind und vorgeschlagen, dass während der normalen Pflanzenentwicklung Restmengen einer einzigen lichtabhängigen POR ausreichen, um den kontinuierlichen Bedarf an neu synthetisiertem Chl zu decken. Drittens könnte eine fortwährende Chl-Synthese auch durch unterschiedliche und differentiell regulierte lichtabhängige POR Enzyme erreicht werden. Gelegentlich wurde beschrieben, dass mehrere POR Polypeptid-Species von anti-POR-Antikörpern erkannt werden können. Bisher wurden jedoch keine Beweise erbracht, die die Existenz von mehr als einer POR unterstützen, da in vorangegangenen Untersuchungen an Angiospermen nur einzelne *Por* cDNAs oder Kerngene beschrieben wurden. Ausgehend von der Beobachtung, dass POR Proteine von Gymnospermen und Angiospermen ein hohes Mass an Protein- und Nukleotidsequenzhomologie aufweisen, wurde hier versucht mittels der RT-PCR Technik zusätzliche *Por* cDNA Sequenzen der Gerste zu amplifizieren. *Por* spezifische Primer wurden von solchen Bereichen abgeleitet, die in für *Por* kodierenden Sequenzen verschiedener Arten konserviert sind. Die PCR wurde

mit poly(A)⁺ RNA durchgeführt, die aus solchem Gewebe extrahiert wurde, für das früher gezeigt werden konnte, dass es nur geringste Mengen an *Por* mRNA enthält. Die Existenz eines zweiten POR-verwandten Proteins konnte durch Isolierung und Sequenzierung von cDNAs bestätigt werden, die für ein neuartiges POR Polypeptid (PORB) kodieren, das eine Aminosäuresequenzidentität von 75% mit der bisher untersuchten lichtsensitiven POR (PORA) aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass zwei *Por* Gene - *PorA* und *PorB* - im Genom der Gerste vorhanden sind. In Anwesenheit von NADPH und Pchlid konnte das *in vitro* synthetisierte PORB Protein zu einem ternären, enzymatisch aktiven Komplex rekonstituiert werden, der Pchlid nur nach Belichtung zu Chlid reduzierte. Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass Licht und der Entwicklungszustand des Gerstenkeimlings stark unterschiedliche Regulationsmuster der *PorA* und *PorB* Genexpression hervorrufen. Für *PorB* konnte klar eine Expression in ergrüntem Pflanzen gezeigt werden. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Chl-Biosynthese von zwei verschiedenen lichtabhängigen POR Enzymen kontrolliert wird, die unterschiedliche Funktionen ausüben.