

**Identifizierung und Charakterisierung von *soldat10*, einem
Unterdrücker des durch Singulett Sauerstoff induzierten
Zelltodprogramms in *Arabidopsis* Keimlingen**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
MARCO WÜRSCH
Dipl. Natw. ETH
geboren am 11. Oktober 1978
Bürger von Emmetten, NW

Angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. Klaus Apel, Referent
Prof. Dr. Nikolaus Amrhein, Korreferent

Summary

The *Arabidopsis flu* mutant accumulates high amounts of free protochlorophyllide in plastids during the dark period. After re-illumination, free protochlorophyllide can act as a photosensitizer. Transfer of light energy from protochlorophyllide to molecular triplet oxygen leads to highly reactive singlet oxygen. Singlet oxygen activates a genetically determined stress programme which, in seedlings, leads to cell death and, in mature plants, to growth inhibition, respectively. EMS mutagenesis of *flu* led to the identification of several mutants that were able to suppress one or both of the above mentioned stress reactions. The *executer/flu* double mutant is able to suppress both stress reactions, whereas the *soldat/flu* double mutant (*singlet oxygen linked death activator*) is only able to suppress the cell death reaction of seedlings. One of the *soldat* mutants, *soldat10*, was further characterised, both genetically and physiologically, during this work. Seedlings of *soldat10/flu* survive light/dark cycles even though they accumulate similar amounts of free protochlorophyllide as *flu* seedlings. The growth inhibition of mature *flu* plants is only partially suppressed by the *SOLDAT10* mutation, showing an intermediate phenotype of the *soldat10/flu* mutant. Map-based cloning revealed that the locus of *soldat10* shows homology to a mitochondrial transcription termination factor (mTERF). Complementation was achieved by inserting a wild-type copy of the *SOLDAT10* gene into the *soldat10/flu* double mutant. This led to the restoration of the original *flu* phenotype when grown under long-day conditions. *SOLDAT10* codes for the protein TERF1. A TERF1-GFP fusion protein could be localised in the chloroplasts of transiently transformed *Arabidopsis* protoplasts.

The *soldat10* mutant has a light-green phenotype and develops more slowly. Protein analysis showed that *soldat10* has a drastically reduced amount of the D1 protein. This could lead to permanent light stress. It is noteworthy that *soldat10* seedlings show a higher tolerance to a combined light and cold stress than wild-type. This could be due to an early activation of an acclimatory response caused by permanent light stress. In the *soldat10/flu* double mutant this activation of the acclimatory response seems to reduce the extent of singlet oxygen-mediated stress.

Zusammenfassung

Die *Arabidopsis flu* Mutante akkumuliert im Dunkeln grosse Mengen an freiem Protochlorophyllid in den Plastiden. Protochlorophyllid kann als Photosensitizer Lichtenergie aufnehmen und diese auf molekularen Triplett Sauerstoff übertragen, was zur Entstehung von hoch reaktivem Singulett Sauerstoff, einer nicht-radikale reaktive Sauerstoffspezies, führt. Die Freisetzung von Singulett Sauerstoff beginnt in der *flu* Mutante unmittelbar nach einem Wechsel vom Dunkeln ins Licht. Singulett Sauerstoff aktiviert genetisch festgelegte Stressprogramme, welche zum Zelltod bei Keimlingen und zur Wachstumshemmung von adulten Pflanzen führen. Nach einer EMS-Mutagenese der *flu* Mutante wurden Pflanzen identifiziert, welche entweder eine oder beide Stressantworten unterdrücken und in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden konnten. Die *executer/flu* Doppelmutanten unterdrücken beide Stressantworten, während die *soldat/flu* Doppelmutanten (*singlet oxygen linked death activator*) nur die Zelltodreaktion von Keimlingen unterdrücken. Eine dieser *soldat* Mutanten, *soldat10*, wurde in der vorliegenden Arbeit einer genetischen und physiologischen Untersuchung unterzogen. *soldat10/flu* Keimlinge überleben Licht-/Dunkelrhythmen, obwohl sie im Dunkeln ähnliche Mengen an freiem Protochlorophyllid akkumulieren wie die *flu* Mutante. Die Wachstumshemmung von reifen *flu* Pflanzen wird durch die *SOLDAT10* Mutation zum Teil unterdrückt. Dies führt im Vergleich zum wt und zur *flu* Mutante zu einem intermediären Phänotyp von reifen *soldat10/flu* Pflanzen. Mit einer Kartierung konnte gezeigt werden, dass der mutierte Locus von *soldat10* für ein Protein kodiert, das mit einem mitochondrialen Transkriptions-Terminations-Faktor (mTERF) verwandt ist. Mit dem Einführen einer Wildtyp-Kopie des *SOLDAT10* Gens in die *soldat10/flu* Doppelmutante konnte die Mutation komplementiert und somit der ursprüngliche *flu* Phänotyp unter Langtagbedingungen wieder hergestellt werden. *SOLDAT10* kodiert für das Protein TERF1, welches in transient transformierten Protoplasten in den Chloroplasten lokalisiert werden konnte.

Die *soldat10* Mutante zeigt einen helleren Phänotyp und eine etwas verzögerte Entwicklung. *soldat10* hat eine drastisch verringerte D1 Proteinmenge und leidet dadurch unter einem permanenten Lichtstress. Interessanterweise haben aber

soldat10 Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber kombiniertem Licht- und Kältestress.

soldat10 könnte aufgrund einer frühzeitigen Aktivierung eines Akklimatisierungsprozesses, die auf den permanenten Lichtstress zurückzuführen ist, die beobachtete erhöhte Stresstoleranz aufbauen. In der *soldat10/flu* Doppelmutante scheint aufgrund dieser aktivierten Akklimatisierungsprozesse das Ausmass der durch Singulett Sauerstoff induzierten Stressantworten stark unterdrückt zu sein, was zum Überleben von *soldat10/flu* Keimlingen unter Licht-/Dunkelrhythmen führt.