

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
13 - 0123 - 837	קטבוליזם בכלורופלסטים במהלך הזדקנות – גורמים מרכזיים בזמינות אבני הבניין לבניית חומרי התשמורת של הזרע

ג. כללי	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
אוניברסיטה עברית	
סוג הדו"ח	תאריכים
שנתי	תקופת המחקר
	עבודה מוגש הדו"ח
	התחלה
	סיום
	הדו"ח למקורות המימון
שנה / חודש	שנה / חודש
6 / 2012	5 / 2015
	שנה / חודש
	6 / 2015

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	חוקר ראשי
צח	אדם	
חוקרים משניים		
1	איל	יורם
2		
3		
4		
5		
6		
7		

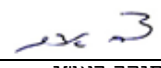
ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
קרן המדען הראשי - ביוטכנולוגיה	02-3782	210,000

<p>ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים</p> <p>תהליכי פירוק החלבונים בכלורופלסט הינם תהליכים מרכזיים לזמינות אבני בניין לייצור חומרי התשמורת של הזרע. מאידך, ההזדקנות ותהליכי הפירוק מביאים לסיום השלב הפוטוסינתטי של הצמח, המהווה גם כן מרכיב מרכזי התורם לאיכות הזרע. מסיבות אלו, לעיתוי ויעילות תהליכי ההזדקנות יש חשיבות מרכזית באיכות וכמות יבול צמחי גרעין. במחקר זה אפיינו תהליכים שונים במהלך הזדקנות טבעית של עלים, כאשר המדד להזדקנות היה רמת הכלורופיל. בהתאמה, עלים או מקטעי עלים חולקו עפ"י רמת הכלורופיל שלהם (ולא עפ"י גיל כרונולוגי). בניגוד לתפיסה המקובלת, מצאנו שבשלבים הראשונים של ההזדקנות כלורופלסטים מאבדים כ-50% מהכלורופיל לפני שמתחיל פירוק מסיבי של חלבונים קושרי כלורופיל. כמו כן, לא מצאנו עדות לשינויים בפרופיל מודיפיקציות שלאחר תרגום בחלבונים אלה במהלך ההזדקנות, ולכן נשללה ההיפותזה ששינויים כאלה מבקרים את תחילת פירוק החלבונים. אנליזה של שינויים אולטרה-סטרוקטורליים בכלורופלסט באמצעות מיקרוסקופיית אלקטרונים הראתה שבשלבים הראשונים בהם הכלורופלסט מאבד כלורופיל נשמר המבנה האופייני של תילקואידים. רק מאוחר יותר מתחילה דיסאינטגרציה של תילקואידים והופעה של פלסטוגלובולות. במקביל, מתרחשת ירידה בנפח הכלורופלסטים ושינוי צורתם ממאורכים לעגולים. על מנת לקבל אפיון גלובלי של תהליך ההזדקנות בצענו אנליזה פרוטאומית רחבת היקף, בארבעה שלבי הזדקנות שונים. זוהו למעלה מ-5,000 חלבונים שונים ואנו עסוקים עתה באפיון השינויים הכמותיים שלהם לאורך התהליך. דוגמאות נאספו גם לאנליזה טרנסקריפטומית שתחל בקרוב. אחד מאנזימי המפתח לפירוק חלבוני המערכת הפוטוסינתטית הינו הפרוטאז FtsH אשר נמצא בממברנת התילקואיד. למרות שרמתו המוחלטת יורדת במהלך ההזדקנות, הוא עדיין מצוי גם בשלבים המאוחרים. אחד הממצאים המפתיעים בעבודה היה הופעת וריאנט קצר יותר של האנזים במהלך ההזדקנות. אנליזת MS מציעה שמתקיים כאן ספלייסינג אלטרנטיבי אשר עשוי להפוך את הפרוטאז מתלוי-ATP לבלתי תלוי באנרגיה. בימים אלה מתבצע בירור מקיף של אפשרות זו, אשר יכולות להיות לה השלכות משמעותיות ביותר על הבנת תהליך פירוק המערכת הפוטוסינתטית במהלך ההזדקנות. באשר לפירוק כלורופיל, כבר בתחילת העבודה נצפתה עליה דרמטית ברמתו של האנזים פאופורביד אוקיגנאז. בהמשך מצאנו, תוך שימוש בשלוש גישות שונות, שהוא פועל כקומפלקס, והוא עובר אינטראקציה פיסיית עם כמויות משמעותיות של החלבון PsbS. נושא אחר שנלמד במהלך העבודה הוא תהליך הדה-קלציה של אטום המגנזיום של כלורופיל ותפקיד האנזים כלורופילאז בתהליך זה.</p>
--

1. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

9.7.2015

<u>תאריך</u> (שנה) (חודש) (יום)	<u>רשות</u> המחקר	<u>אמרכלות</u> (רשות המחקר)	<u>מנהל המכון</u> (פקולטה)	<u>מנהל המחלקה</u>	<u>חוקר ראשי</u> 
------------------------------------	----------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------	---

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 837-0123-12
קטבולזים בכלורופלסטים במהלך הזדקנות

Catabolism in chloroplasts during senescence

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

צח אדם המכון למדעי הצמח, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית

Zach Adam, Institute of Plant Sciences, Faculty of Agriculture, The Hebrew University, Rehovot 76100. E-mail: zach.adam@mail.huji.ac.il

תקציר

תהליכי פירוק החלבונים בכלורופלסט הינם תהליכים מרכזיים לזמינות אבני בניין לייצור חומרי התשמורת של הזרע. מאידך, ההזדקנות ותהליכי הפירוק מביאים לסיום השלב הפוטוסינתטי של הצמח, המהווה גם כן מרכיב מרכזי התורם לאיכות הזרע. מסיבות אלו, לעיתוי ויעילות תהליכי ההזדקנות יש חשיבות מרכזית באיכות וכמות יבול צמחי גרעין. במחקר זה אפיינו תהליכים שונים במהלך הזדקנות טבעית של עלים, כאשר המדד להזדקנות היה רמת הכלורופיל. בהתאמה, עלים או מקטעי עלים חולקו עפ"י רמת הכלורופיל שלהם (ולא עפ"י גיל כרונולוגי). בניגוד לתפיסה המקובלת, מצאנו שבשלבם הראשונים של ההזדקנות כלורופלסטים מאבדים כ-50% מהכלורופיל לפני שמתחיל פירוק מסיבי של חלבונים קושרי כלורופיל. כמו כן, לא מצאנו עדות לשינויים בפרופיל מודיפיקציות שלאחר תרגום בחלבונים אלה במהלך ההזדקנות, ולכן נשללה ההיפותזה ששינויים כאלה מבקרים את תחילת פירוק החלבונים. אנליזה של שינויים אולטרה-סטרוקטורליים בכלורופלסט באמצעות מיקרוסקופיית אלקטרונית הראתה שבשלבם הראשונים בהם הכלורופלסט מאבד כלורופיל נשמר המבנה האופייני של תילקואידים. רק מאוחר יותר מתחילה דיסאינטגרציה של תילקואידים והופעה של פלסטוגלובולות. במקביל, מתרחשת ירידה בנפח הכלורופלסטים ושינוי צורתם ממאורכים לעגולים. על מנת לקבל אפיון גלובלי של תהליך ההזדקנות בצענו אנליזה פרוטאומית רחבת היקף, בארבעה שלבי הזדקנות שונים. זוהו למעלה מ-5,000 חלבונים שונים ואנו עסוקים עתה באפיון השינויים הכמותיים שלהם לאורך התהליך. דוגמאות נאספו גם לאנליזה טרנסקריפטומית שתחל בקרוב. אחד מאנזימי המפתח לפירוק חלבוני המערכת הפוטוסינתטית הינו הפרוטאז FtsH אשר נמצא בממברנת התילקואיד. למרות שרמתו המוחלטת יורדת במהלך ההזדקנות, הוא עדיין מצוי גם בשלבים המאוחרים. אחד הממצאים המפתיעים בעבודה היה הופעת וריאנט קצר יותר של האנזים במהלך ההזדקנות. אנליזת MS מציעה שמתקיים כאן ספלייסינג אלטרנטיבי אשר עשוי להפוך את הפרוטאז מתלוי-ATP לבלתי תלוי באנרגיה. בימים אלה מתבצע בירור מקיף של אפשרות זו, אשר יכולות להיות לה השלכות משמעותיות ביותר על הבנת תהליך פירוק המערכת הפוטוסינתטית במהלך ההזדקנות. באשר לפירוק כלורופיל, כבר בתחילת העבודה נצפתה עליה דרמטית ברמתו של האנזים פאופורביד אוקיגנאז. בהמשך מצאנו, תוך שימוש בשלוש גישות שונות, שהוא פועל כקומפלקס, והוא עובר אינטראקציה פיסית עם כמויות משמעותיות של החלבון PsbS. נושא אחר שנלמד במהלך העבודה הוא תהליך הדה-קלציה של אטום המגנזיום של כלורופיל ותפקיד האנזים כלורופילאז בתהליך זה.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: ש"ה"ם)

תאריך: 9.7.2015

3

חתימת החוקר

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. מאמר ראשון המסכם את תוצאות הניסויים בנושא פירוק הכלורופיל נמצא בהכנה.
2. מאמר בנושא שינויים סטרוקטורליים ופרוטאומיים נמצא בהכנה.

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 837-0123-12
קטבולזים בכלורופלסטים במהלך הזדקנות

Catabolism in chloroplasts during senescence

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

צח אדם המכון למדעי הצמח, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית

Zach Adam, Institute of Plant Sciences, Faculty of Agriculture, The Hebrew University, Rehovot 76100. E-mail: zach.adam@mail.huji.ac.il

תקציר

תהליכי פירוק החלבונים בכלורופלסט הינם תהליכים מרכזיים לזמינות אבני בניין לייצור חומרי התשמורת של הזרע. מאידך, ההזדקנות ותהליכי הפירוק מביאים לסיום השלב הפוטוסינתטי של הצמח, המהווה גם כן מרכיב מרכזי התורם לאיכות הזרע. מסיבות אלו, לעיתוי ויעילות תהליכי ההזדקנות יש חשיבות מרכזית באיכות וכמות יבול צמחי גרעין. במחקר זה אפיינו תהליכים שונים במהלך הזדקנות טבעית של עלים, כאשר המדד להזדקנות היה רמת הכלורופיל. בהתאמה, עלים או מקטעי עלים חולקו עפ"י רמת הכלורופיל שלהם (ולא עפ"י גיל כרונולוגי). בניגוד לתפיסה המקובלת, מצאנו שבשלבם הראשונים של ההזדקנות כלורופלסטים מאבדים כ-50% מהכלורופיל לפני שמתחיל פירוק מסיבי של חלבונים קושרי כלורופיל. כמו כן, לא מצאנו עדות לשינויים בפרופיל מודיפיקציות שלאחר תרגום בחלבונים אלה במהלך ההזדקנות, ולכן נשללה ההיפותזה ששינויים כאלה מבקרים את תחילת פירוק החלבונים. אנליזה של שינויים אולטרה-סטרוקטורליים בכלורופלסט באמצעות מיקרוסקופיית אלקטרוניים הראתה שבשלבם הראשונים בהם הכלורופלסט מאבד כלורופיל נשמר המבנה האופייני של תילקואאידים. רק מאוחר יותר מתחילה דיסאינטגרציה של תילקואידים והופעה של פלסטוגלובולות. במקביל, מתרחשת ירידה בנפח הכלורופלסטים ושינוי צורתם ממאורכים לעגולים. על מנת לקבל אפיון גלובלי של תהליך ההזדקנות בצענו אנליזה פרוטאומית רחבת היקף, בארבעה שלבי הזדקנות שונים. זוהו למעלה מ-5,000 חלבונים שונים ואנו עסוקים עתה באפיון השינויים הכמותיים שלהם לאורך התהליך. דוגמאות נאספו גם לאנליזה טרנסקריפטומית שתחל בקרוב. אחד מאנזימי המפתח לפירוק חלבוני המערכת הפוטוסינתטית הינו הפרוטאז FtsH אשר נמצא בממברנת התילקואיד. למרות שרמתו המוחלטת יורדת במהלך ההזדקנות, הוא עדיין מצוי גם בשלבים המאוחרים. אחד הממצאים המפתיעים בעבודה היה הופעת וריאנט קצר יותר של האנזים במהלך ההזדקנות. אנליזת MS מציעה שמתקיים כאן ספלייסינג אלטרנטיבי אשר עשוי להפוך את הפרוטאז מתלוי-ATP לבלתי תלוי באנרגיה. בימים אלה מתבצע בירור מקיף של אפשרות זו, אשר יכולות להיות לה השלכות משמעותיות ביותר על הבנת תהליך פירוק המערכת הפוטוסינתטית במהלך ההזדקנות. באשר לפירוק כלורופיל, כבר בתחילת העבודה נצפתה עליה דרמטית ברמתו של האנזים פאופורביד אוקיגנאז. בהמשך מצאנו, תוך שימוש בשלוש גישות שונות, שהוא פועל כקומפלקס, והוא עובר אינטראקציה פיסית עם כמויות משמעותיות של החלבון PsbS. נושא אחר שנלמד במהלך העבודה הוא תהליך הדה-קלציה של אטום המגנזיום של כלורופיל ותפקיד האנזים כלורופילאז בתהליך זה.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: ש"ה"ם)

תאריך: 9.7.2015

3

חתימת החוקר

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. מאמר ראשון המסכם את תוצאות הניסויים בנושא פירוק הכלורופיל נמצא בהכנה.
2. מאמר בנושא שינויים סטרוקטורליים ופרוטאומיים נמצא בהכנה.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס ל**כל** השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1. תפקידן של פרוטאזות FtsH ו-Deg בפירוק חלבונים קושרי כלורופיל במהלך הזדקנות
2. לימוד תפקודם של חלבונים מפרקי כלורופיל במהלך הזדקנות
3. לימוד אינטראקציות אפשריות בין פרוטאזות לחלבונים קושרי כלורופיל במהלך הזדקנות
4. לימוד מודיפיקציות שלאחר תרגום בבקרת פירוק חלבונים קושרי כלורופיל
עיקרי התוצאות
1. אופיין מצבו הנטיבי של האנזים PAO בשלבי הזדקנות שונים ונמצא שהיום קושר את החלבון PsbS
2. אופיינו שינויים ברמתם של חלבונים קושרי כלורופיל שונים, ומודיפיקציות שלאחר תרגום על חלבונים אלה, בשלבי הזדקנות שונים. נעשתה אנליזה פרוטאומית מקיפה המאפשרת קטלוג של כלל השינויים.
3. נבחנו ואופיינו שינויים באולטרה-סטרוקטורה של הכלורופלסט במהלך הזדקנות.
4. הסתיימה הכנתם של צמחים טרנסגניים שמשמשים עתה לזיהוי סובסטרטים של פרוטאזת FtsH במהלך הזדקנות. נמצא שהאנזים בעלים מזדקנים עובר שינוי אשר עשוי להפוך אותו לבלתי תלוי ב-ATP.
מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
נמצא שבעוד שהשלב הבולט הראשון בהזדקנות העלה הינו פירוק כלורופיל, פירוקם של חלבוני כלורופיל מתחיל בשלב מאוחר יותר. כמו כן מצאנו שמודיפיקציות מסוימות שלאחר תרגום אינן מעורבות בבקרת פירוק חלבונים אלה. גם עיקר השינויים המבניים בכלורופלסט, פירוק תילקואידים והופעת פלסטוגלובולות מוגבלים לשלבים מאוחרים של התהליך.
בעיות שנתרו לפתרון
זיהוי סובסטרטים של פרוטאזת FtsH. השלמת האפיון הטרנסקריפטומי.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; שני פרסומים מדעיים נמצאים בהכנה.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
< ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) - V
< חסוי - לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* -

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

1. Changes in the levels of chlorophylls and their binding proteins during senescence

We originally planned to use the 7th rosette leaf at different ages, as was previously done, especially in transcriptomic studies of senescence. As mean values of chlorophyll content, a visible obvious marker for senescence, demonstrated relatively high level of standard deviations, we restored to the alternative method that we suggested in our proposal. We sectioned leaves from the same plant according to their visual level of chlorophyll into three groups: dark green (DG), green (G) and yellow (Y), having 100, 50 and 15% chlorophyll, respectively. We took a special care to distinguish between living yellowish sectors and the dead brown ones, and excluded the latter from the collected material.

Initial PAGE and immunoblot analyses revealed a gradual decrease in the level of Rubisco (Fig. 1A), a marked increase in the level of PAO, a key enzyme in chlorophyll catabolism, and a decrease in the level of the thylakoid FtsH protease (Fig. 1B). Monitoring the level of the major antenna protein of PSII LHCII has suggested to us that the decrease in the level of Chl is not necessarily accompanied by a parallel decrease in the level of Chl-binding proteins (Fig. 1A and B). Thus, we performed MS analyses that could distinguish between the different Chl-binding proteins comprising the photosynthetic antenna. As shown in Figure 2A-C, the transition from DG to the G stage is accompanied only by a small decrease in the level of most Chl-binding proteins, although almost 50% of the Chl has already been lost during this transition. This implies that Chl-degradation precedes that of Chl-binding proteins. The most pronounced degradation of these proteins occurs during the transition from the G to the Y stage. A similar pattern was observed for the ClpP4 and the ClpR2 proteins, representative components of the core complex of Clp protease (Fig. 2D).

To test the hypothesis that post-translational modifications (PTMs) may influence the stability of LHCs, and through that, regulate degradation during senescence, we tested possible changes in the level the following PTMs: N-terminal acetylation, K acetylation, and S, T and Y phosphorylation. However, we could not identify any changes in the level of any of these modifications (not shown). Although these are negative results, they rule out the possibility that at least these PTMs are involved in regulating the degradation of LHCs during senescence.

2. Changes in the ultrastructure of chloroplasts during senescence

Sticking to our categorization of three stages of senescence, we initially performed cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) analysis on samples from these stages. However, as dramatic changes occurred between G and Y samples, we sought to add an intermediate stage, light green (LG), between these two. Representative electron micrographs of chloroplasts from leaf samples containing 100, 50, 20 and 10% chlorophyll, respectively, are shown in Figure 3A. A decrease in the size of plastids and a change in their shape, from elongated to round, is observed along this developmental gradient. Thylakoid membranes, including grana stacks, although at lower density, are present all the way through the LG stage. Only at the Y stage almost all thylakoid membranes are lost (Fig. 3A). The decrease in the size of chloroplasts during senescence is also evident in confocal microscopy. In parallel to the decrease in Chl fluorescence, chloroplasts become smaller, and their population more homogeneous (Fig. 3B, upper and lower panels). Another distinguished difference is the number and size of plastoglobules. They are rare and very small in the DG stage, and their number and size increase until the Y stage, when they fill almost the entire volume of the round plastids (Fig. 3A).

3. Changes in leaf transcriptome and proteome during senescence

After procedures for next-generation-sequencing have been established in our lab in the context of another project, we decided to take advantage on these for the current project as well. Samples have been collected from four different stages of senescence and are now being processed to allow mRNA sequencing. We anticipate completing data collection in the next three months.

In parallel, we set up a proteomic study on total leaf extracts from the four stages of senescence. These samples are now being subjected to MS analysis and the results are expected in the next few weeks. Processing them will most likely occupy us for the next few months, before obtaining a clear picture of proteome dynamics during leaf senescence. These, in conjunction with the transcriptomic analysis, will complete our comprehensive analysis of the senescence process.

4. Novel changes in the behavior of the thylakoid FtsH protease during senescence

As the FtsH protease complex is the most abundant protease in the thylakoid membrane, we naturally devote a lot of our attention to it also in the context of senescence. As shown in Figure 1B, its level is relatively high also at the Y stage, when there are not much thylakoid membranes left (see Fig. 3), and almost all Chl-binding proteins have disappeared (Fig. 2A-C). Monitoring tobacco leaves, we discovered that the FtsH protease changes early in senescence. At 70% Chl (an intermediate stage between DG and G), FtsH migrates on the gel as a doublet. At 40% Chl, only the lower band is observed (Fig. 4A-B). A slightly faster migration of FtsH on the gel was also observed in Arabidopsis Y leaves (Fig. 1B). This suggested to us that FtsH underwent either a proteolytic processing or some kind of post-translational modification (PTM). To test these possibilities, we separated the two bands from the tobacco gel and subjected them to MS analysis. Surprisingly, the PTMs pattern in the upper and lower bands were similar (not shown). Moreover, the same peptides were identified in the N- and C-termini of both bands (Fig. 4C), excluding the possibilities of differential PTMs or proteolytic processing at either N- or C-terminus. However, several peptides, corresponding to the central region of the protein, were recovered from the upper band, but not from the lower, suggesting that alternative splicing might have occurred during senescence. Interestingly, the apparently missing region from the lower band contains the ATPase domain of FtsH, whereas the proteolytic active site with its Zn²⁺-binding domain is present in both bands (Fig. 4C). This senescence-associated scenario may have implications for the activity and selectivity of the FtsH protease during advanced stages of the senescence process. We are currently looking into this in more detail.

5. Pheophorbide *a* oxygenase increases during senescence and interacts with PsbS

Pheophorbide *a* oxygenase (PaO) is a key enzyme in the degradation pathway of chlorophylls. In our previous reports we demonstrated that its levels increases during senescence (Fig. 5A). We also optimized a blue-native gel system to monitor the native state of this enzyme. We have now extended this to test whether the native state of PAO changes during senescence, and observed that it as an oligomer of ca.

180 kD regardless of the stage of senescence (Fig. 5B). This suggested to us that PAO is found in leaves either as a homo-trimer or a hetero-oligomer with other protein(s).

To distinguish between these two possibilities, we optimized a clear-native gel system (Fig. 5C) and used it, in conjunction with immune-blot analysis to isolate a gel slice where PaO should be located (Fig. 5D). This piece of gel was subjected to MS analysis. As expected, peptides corresponding of PaO were recovered (Fig. 5E, lowest entry). Surprisingly, a fair amount of PsbS was also detected in the analysis. (Although quantitative comparison between two different proteins is impossible in this type of analysis, the same order-of-magnitude in peak areas suggest that the two proteins are both highly represented in that gel slice).

The possible physical interaction between PaO and PsbS was further tested by CO-IP experiments with the PaO antibody on DG and Y leaf extracts. As shown in Fig. 5E (two upper entries), in both cases PsbS was precipitated along with PaO, further supporting the notion that the two proteins interact in vivo. We still do not know what is the functional significance of this interaction, but this will be the focus of future experiments.

6. Insights regarding the Mg²⁺ de-chelation step and the role of chlorophyllase in chlorophyll catabolism

Magnesium de-chelation in the context of the chlorophyll catabolic pathway remains an enigmatic step; There is no assigned enzyme/gene for this activity and it is not clear how chlorophyll is de-chelated into pheophytin and how chlorophyllide is de-chelated into pheophorbide. We note that we cannot deduce any possible leads from the study of other tetrapyrroles; In heme, for instance, loss of the central Fe ion occurs only following ring opening to derive a linear tetrapyrrole.

Chlorophyllase is established as an enzyme that catalyzes de-phytylation of chlorophyll, and yet its product/s have mostly been studied in phase separation assays and not by analytical tools. We studied the products of recombinant *Citrus* chlorophyllase (Jacob-Wilk et al., 1999) in an in-vitro assay using thin layer chromatography and accurate mass LC/MS. Figure 6A shows that, as expected, recombinant chlorophyllase produced in *E. coli* (as an ingredient in the soluble protein extract of *E. coli* or in purified form) catalyzed dephytylation of the chlorophyll substrate, while control *E. coli* soluble protein extract did not affect chlorophyll. Figure 6B shows that the de-phytylated product consisted of both chlorophyllide and

pheophorbide, suggesting that removal of the magnesium occurs spontaneously following de-phytylation. One possibility to explain this has been raised by Leschek et al. 2008, which suggested intramolecular chelation of the central Mg by the C-17³ propionate of chlorophyllide that is exposed following de-chelation. We note that this could well explain the de-chelation of chlorophyllide to pheophorbide. However, this does not explain de-chelation of chlorophyll to pheophytin, since the phytol chain is still attached via ester bond to C-17³.

We also analyzed the products of chlorophyllase activity in-planta by expressing *Citrus* chlorophyllase under a 35S promoter in tobacco. Figure 7A&B shows that transgenic plants expressing chlorophyllase have a phenotype consisting of variegated pigmentation combined with regions of cell death. Figure 7 C&D shows that the variegated regions contain much less chlorophyll in their chloroplasts, attesting to chlorophyll breakdown. Figure 7E demonstrates that these phenotypic leaves contain high levels of *Citrus* chlorophyllase, which correlates well with the phenotype observed. Chlorophylls extracted from pre-phenotypic leaves (ie. young leaves that have not yet developed the typical phenotype) were subject to phase separation, demonstrating the accumulation of de-phytylated product (Figure 7F). Analysis of the de-phytylated product/s by TLC and LC/MS demonstrated accumulation of pheophorbide *a* and *b*, but no chlorophyllide, suggesting that de-chelation does occur spontaneously in-vivo, and most likely immediately follows de-phytylation.

De-phytylation in the chlorophyll catabolic pathway has also been an issue of much recent debate in the literature. The enzyme pheophytinase is a de-phytylation enzyme that appears to be involved in senescence processes, yet it catalyzes dephytylation of pheophytin (not chlorophyll) and is not an initiator of chlorophyll breakdown (Schelbert et al., 2009). Chlorophyllase catalyzes dephytylation of chlorophyll and can function as an initiator of chlorophyll breakdown (Harpaz-Saad et al., 2007), yet its role in senescence is in question and recently the involvement of *Arabidopsis* chlorophyllase in chlorophyll breakdown and its location in the chloroplast has been questioned (Hu et al., 2015). The results (Figure 7) support previous results suggesting that citrus chlorophyllase is targeted to the chloroplast where it accesses chlorophyll and catalyzes chlorophyll breakdown. Another issue of interest is the cell death phenotype in plants transgenically expressing chlorophyllase. It remains to be determined whether cell death occurs solely due to the photodynamic

properties of the breakdown products (pheophorbide a and b) and the resulting ROS generated, or whether they serve as transportable signals for cell death by themselves.

References

Fiedor L., Kaniab A., Myśliwa-Kurdziela B., Orzełb L., Stochel G. (2008) Understanding chlorophylls: Central magnesium ion and phytyl as structural determinants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 1491–1500.

Harpaz-Saad S., Azoulay T., Arazi T., Ben-Yaakov E., Mett A., Shibolet Y.M., Hörtensteiner S., Gidoni D., Gal-On A., Goldschmidt E.E., Eyal Y. (2007) Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *Plant Cell* 19:1007-1022.

Hu X., Makita S., Schelbert S., Sano S., Ochiai M., Tsuchiya T., Hasegawa S.F., Hörtensteiner S., Tanaka A., Tanaka R. (2015) Re-examination of chlorophyllase function implies its involvement in defense against chewing herbivores. *Plant Physiol.* 167:660-670.

Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt E.E, Riov J, Eyal Y. (1999) Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.* 20:653-661.

Schelbert S., Aubry S., Burla B., Agne B., Kessler F., Krupinska K., Hörtensteiner S. (2009) Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:767-785.

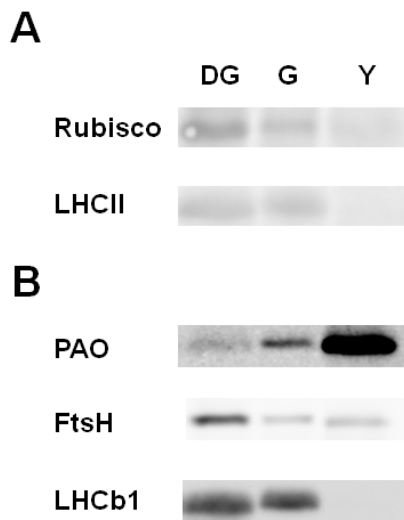


Figure 1. Changes in the level of some chloroplast proteins during senescence.

Total protein extracts from dark green (DG), green (G) and yellow (Y) leaves were subjected to PAGE (panel A) or immunoblot (panel B) analyses. Proteins were loaded based on equal leaf area.

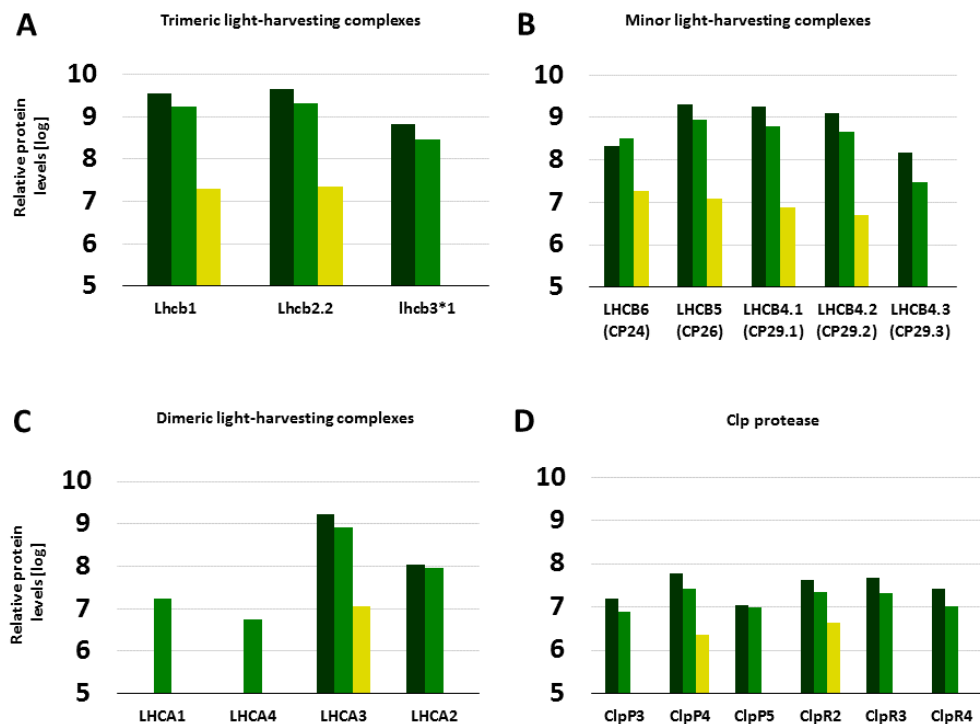
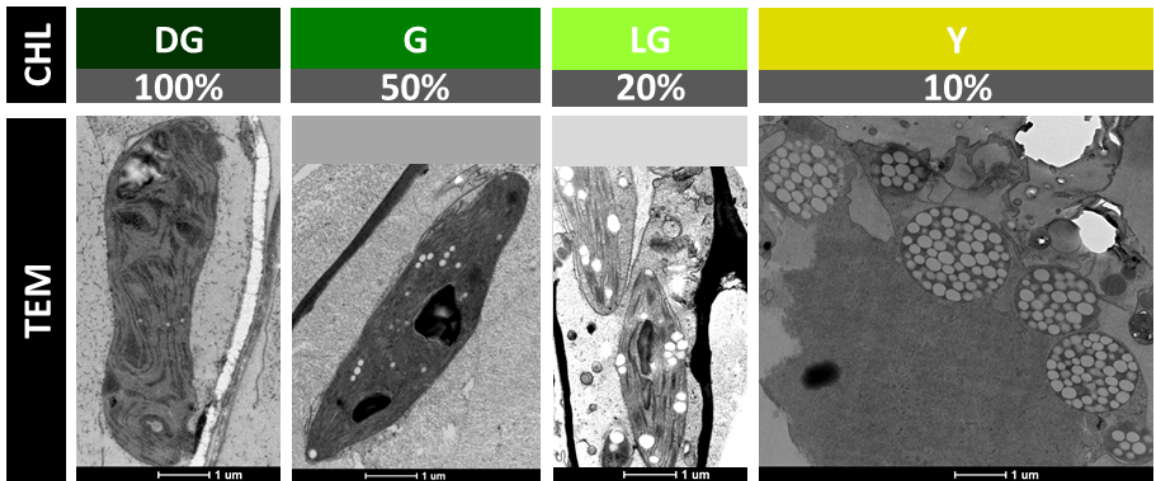


Figure 2. Changes in the level of chlorophyll-binding proteins during senescence. Proteins from the three stages of senescence were subjected to MS analysis. Levels of different groups of these proteins are presented in panels A-C. Levels of subunits of the stromal Clp protease complex are presented in panel D. Abundance of the proteins in the Y axis is presented in a logarithmic scale.

A



B

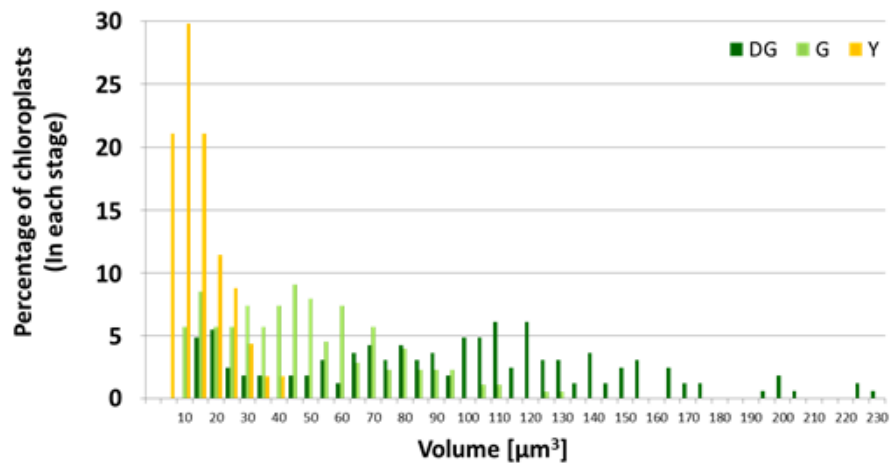
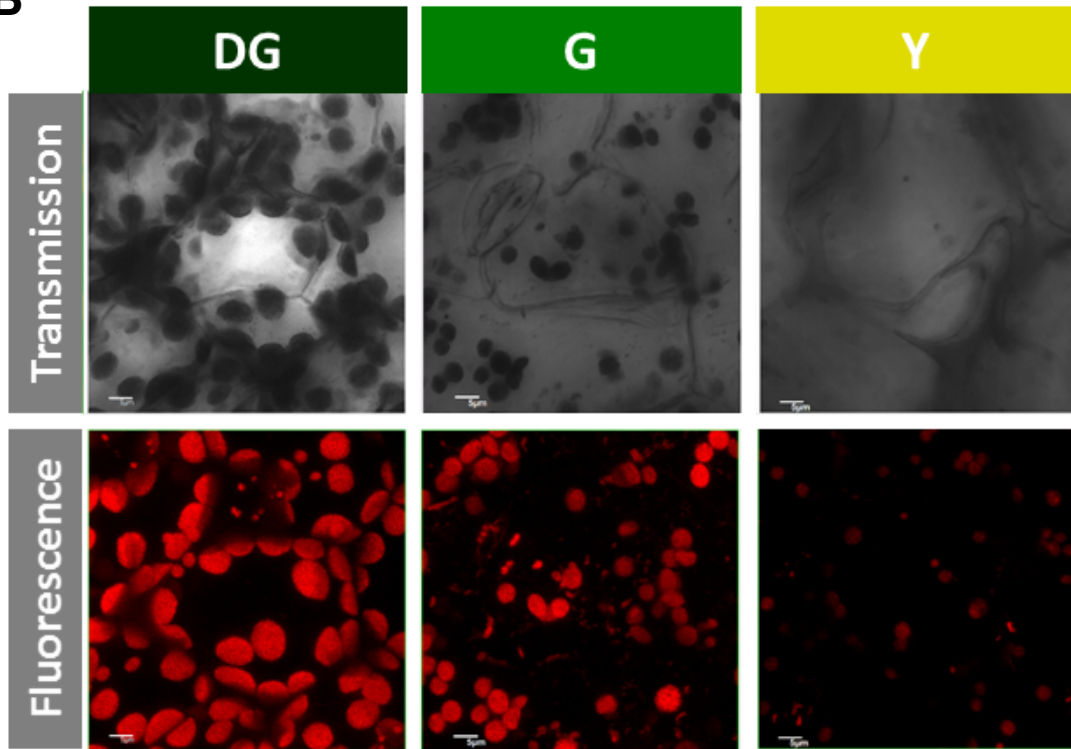


Figure 3. Electron and confocal microscopy of chloroplasts from different stages of senescence.

A. Transmission electron microscopy of senescing leaf samples containing different levels of chlorophyll. **B.** Confocal microscopy of senescing leaves (upper panel) and volumes of different chloroplasts in each stage (lower panel).

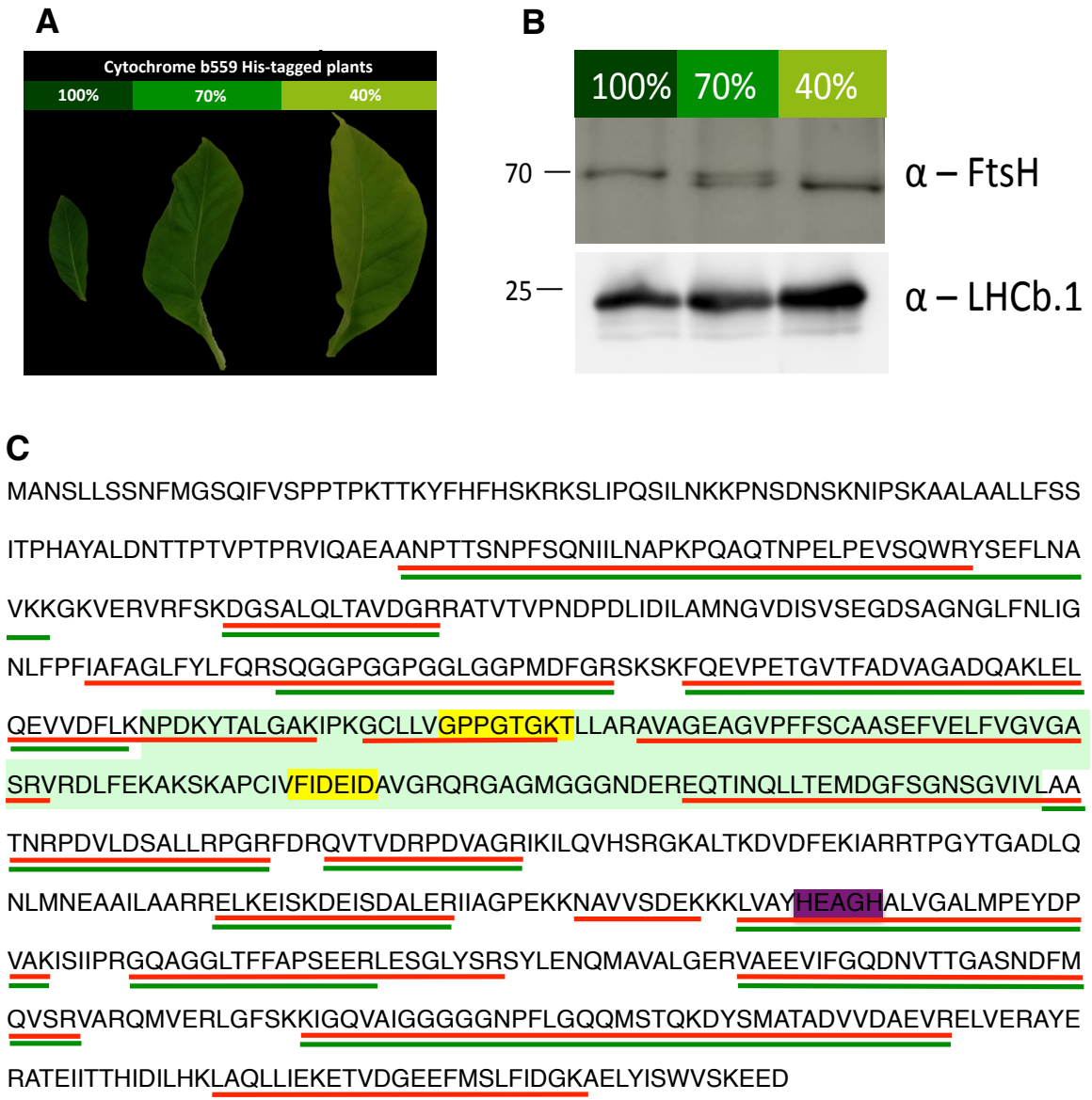


Figure 4. Changes in the behavior of the FtsH protease during senescence.

A. Tobacco leaves during initial stages of senescence. **B.** Immunoblot analysis of FtsH protease. **C.** The lower and upper bands of FtsH were subjected to MS analysis. FtsH peptides recovered in the analysis of the upper and lower bands are underlined in red and green, respectively. The sequence for which peptides were recovered from the upper but not the lower band is highlighted in faint green. The location of the Walker A and B motifs of the ATPase domain is indicated in yellow, and that of the proteolytic active site in purple.

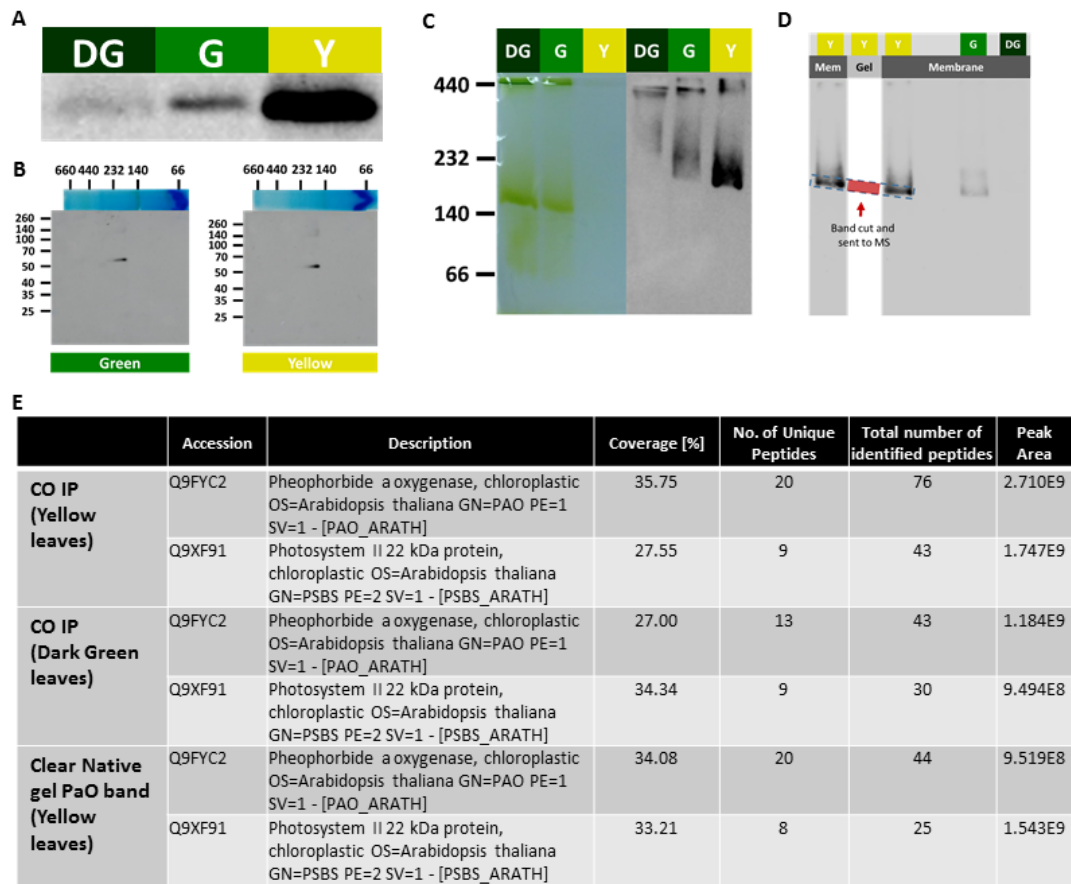


Figure 5. Interaction between PaO and PsbS.

- A.** Immunoblot analysis of leaf extracts from senescing leaves with antibodies against PaO.
- B.** 2-D separation (blue-native and SDS-gels) of PaO from G and Y leaves. Migration of MW markers is indicated above and on the left of both dimensions, respectively.
- C.** Clear-native separation of leaf extracts (left panel) and their blot probed with PaO antibody (right panel).
- D.** Clear native gel flanked by PaO blots, used for isolating a gel slice containing PaO.
- E.** Results of MS analyses performed on immuno-precipitated PaO from Y and DG leaf extracts (two upper entries) and on the gel slice described in D (lower entry).

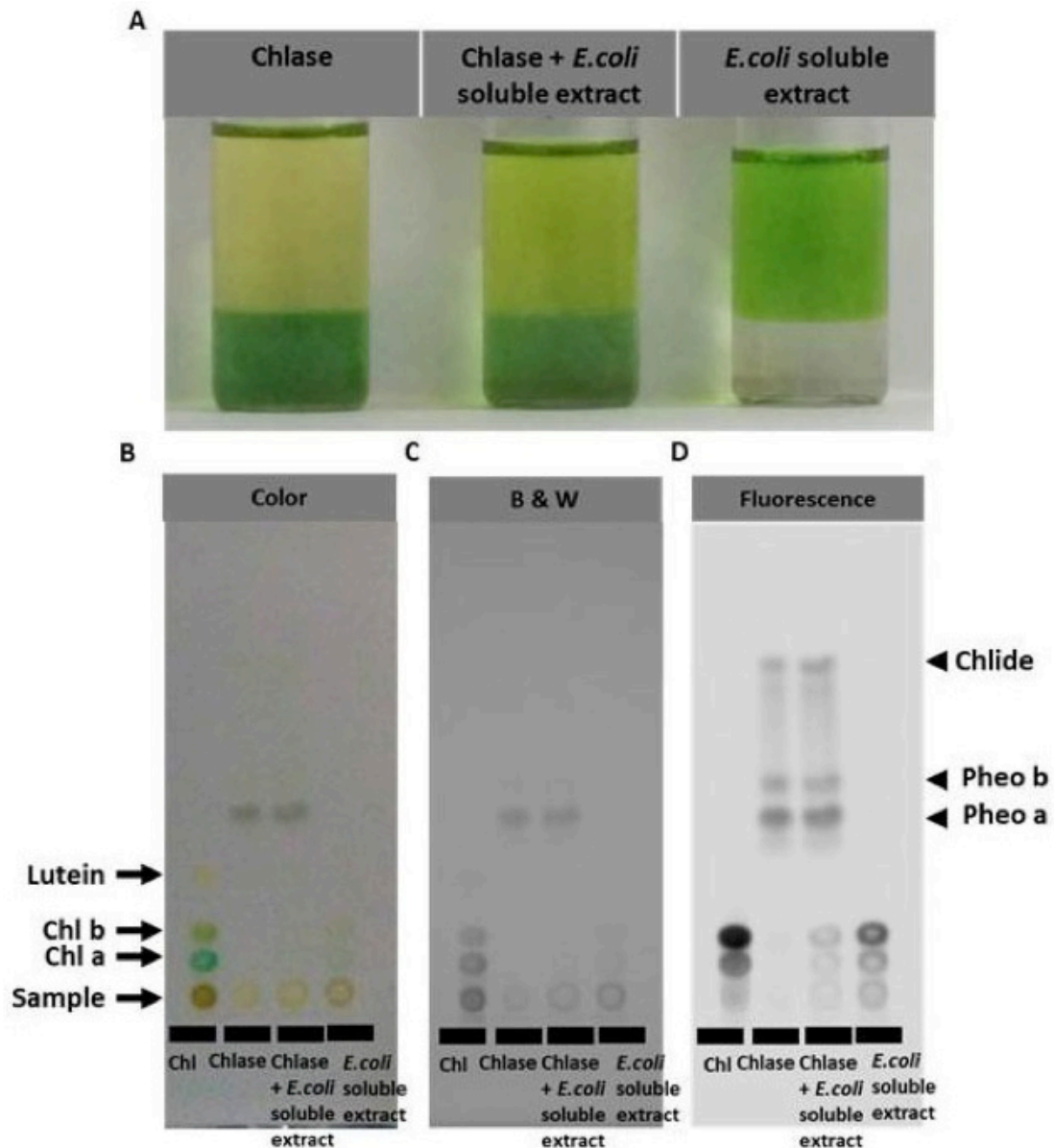


Figure 6. Chlorophyll catabolites obtained following in-vitro chlorophyllase activity assay.

Citrus sinensis chlorophyllase was expressed in *E.coli* in its native form (excluding the naturally processed N-terminal 21 amino acids) or fused to Strep-Tag affinity tag. Protein extracts from *E.coli* control (*E.coli* soluble extract), *E.coli* expressing native chlorophyllase (Chlase + *E.coli* soluble extract) or affinity purified Strep-Tag-chlorophyllase (Chlase) were incubated with chlorophyll substrate at 37°C for one hour. (A) Substrates/products were separated by hexane/acetone phase separation to derive chlorophyll (hexane upper phase) and product (acetone lower phase); note that almost all the chlorophyll was dephytylated. (B-D) Substrates/products of the reactions, as well as chlorophyll substrate (Chl) were separated by reverse-phase thin layer chromatography (C18 TLC) and visualized under visible light in color (B) and black and white (C) as well as via fluorescence (D) by excitation in blue light and filtering emission for red. Chlorophyll, breakdown products and Lutein (carotenoid contamination in the chlorophyll substrate) are labeled as follows: Chl a = chlorophyll a, Chl b = chlorophyll b, Pheo a = pheophorbide a, Pheo b = pheophorbide b, Chlide =

chlorophyllide. Note the accumulation of chlorophyllide and pheophorbide catabolites in samples containing recombinant chlorophyllase (crude extract or affinity purified).

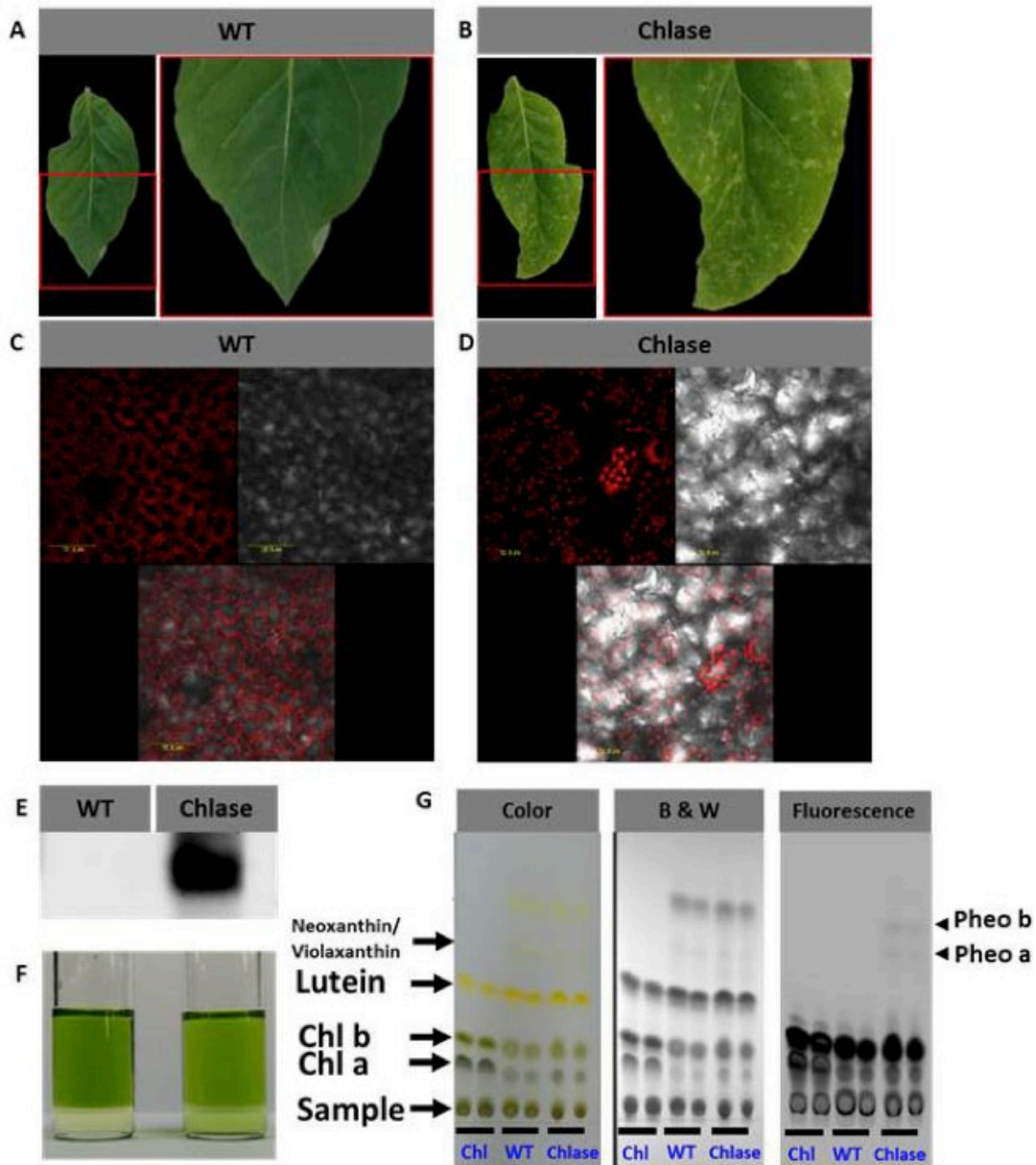


Figure 7. Chlorophyll catabolites in transgenic plants overexpressing chlorophyllase.

Transgenic tobacco plants overexpressing *Citrus sinensis* chlorophyllase were generated and grown together with wild type plants under "Day-light" lamps (~ 80 mE). Fully extended leaves of wild type (A) and transgenic (B) plants were documented by digital camera; note chlorosis and lesions only in the transgenic plants. Plants were also documented by confocal microscopy demonstrating reduced chlorophyll fluorescence in sectors of the transgenic plant leaves (C and D). Protein samples of wild type (WT) and transgenic (Chlase) plants were separated by SDS-PAGE and subject to immunoblot using antibodies raised against citrus chlorophyllase (E). Chlorophylls and catabolites were extracted from wild type and transgenic plants and subject to hexane/acetone phase separation (F) note the accumulation of catabolites in the acetone phase only in the transgenic plants. Chlorophylls and catabolites extracted from wild type and transgenic plants were also separated by reverse phase thin layer chromatography (C18 TLC) and visualized under visible light in color and black and white as

well as via fluorescence by excitation in blue light and filtering emission for red (G). Chlorophyll, breakdown products and Lutein & neoxanthin/violaxanthin (carotenoid contaminations in the extracts of chlorophylls) are labeled as follows: Chl a = chlorophyll a, Chl b = chlorophyll b, Pheo a = pheophorbide a, Pheo b = pheophorbide b. Note the accumulation of pheophorbide catabolites only in leaves of the transgenic tobacco plants.