

University of Groningen

Spingolipid metabolism and programmed cell death in tomato

Spassieva, Stefanka Diankova

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2003

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Spassieva, S. D. (2003). *Spingolipid metabolism and programmed cell death in tomato*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Резюме

Програмираната клетъчна смърт (ПКС) е генетично обусловен процес, при който отделни клетки на многоклетъчен организъм се самоунищожават. Нарушената регулация на този процес може да има сериозни, дори летални последици за многоклетъчния организъм като цяло. При бозайниците невродегенеративните заболявания и ракът се асоциират с нарушения на процеса ПКС. Нормалното развитие на зародиша при животните зависи от навременното отстраняване на клетки, ненужни при следващия етап от зародишното развитие, самоотстраняването на които се извършва чрез процеса ПКС. При растенията ПКС е част от процесите на развитие и самозащита срещу вредители, т.нар. свръхчувствителен отговор. Растителните клетки могат да претърпят ПКС и в резултат на действие на токсин, отделен от вредител. ПКС включва три фази: индукция, ефекторна фаза и фаза на разграждане. Фокус на настоящата работа са сигнали, иницирани по време на индукционната фаза на ПКС.

Това което прави домата привлекателен като моделен организъм за изучаване на ПКС при растенията е от една страна факта, че е генетично добре изучен и от друга страна, не по-маловажно, наличието на моделна система *Asc*-AAL-токсин. *Asc* е локус, който определя устойчивост срещу предизвиканата от гъбата *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* алтернариоза по домати. Локусът включва два алела, *Asc*, който определя устойчивост и *asc*, който определя чувствителност към вредителя. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* отделя токсин, наречен AAL-токсин. Взаимодействието между доматиеното растение и гъбния вредител може да се опрости и представи *in vitro* като взаимодействие между отделен доматиен лист и пречистен AAL-токсин, където *Asc* и *asc* алелите определят, съответно нечувствителност и чувствителност към токсина. При третиране с AAL-токсин клетките на доматиените растения с генотип *asc/asc* претърпяват ПКС. AAL-токсина и фумонизина, също токсин секретирани от гъбен вредител (*Fusarium moniliforme*) са структурни аналози на сфингоидните дълго-верижни бази и конкурентни инхибитори на (дехидро)церамид синтазата. (Дехидро)церамид синтазата е ключов ензим от *de novo* биосинтезата на сфинголипиди. Продуктът на *Asc-1* гена принадлежи към семейство мембранни протеини, което включва представители от всички еукариотни организми царства. Сравнена с *Asc-1*, *asc-1* секвенцията съдържа няколко мутации една, от които е делеция от 2 базови двойки, която от своя страна променя рамката на четене и води до предварителен стоп кодон. Продуктът на *asc-1* гена най-вероятно е нефункционален. Ако двата грождеви хомолога на *Asc-1*, *LAG1* и *LAC1*, са делетирани, резултата, в зависимост от генетичния фон, е летален или води до грождев щам със забавен растеж. Характерно за щам със забавен растеж е дефектна клетъчна стена, забавен транспорт на белтъци, притежаващи гликозилфосфатидил-инозитол остатък и нарушена сфинголипидна биосинтеза. Резултати от изследвания на двата грождеви хомолога *LAG1* и *LAC1* ги определят като необходими компоненти на (дехидро)церамид синтазата. Горепосочените факти предполагат възможността

сфинголипидни сигнали да участват при AAL-токсин индуцираната ПКС при доматени растения с генотип *asc/asc*.

Глава 1 от настоящата дисертация представлява преглед на литературата, публикувана по въпроса растителни сфинголипиди. Сфинголипидите са липидни молекули, съставени от хидрофобен церамиден и хидрофилен остатък. Церамидите от своя страна са състоят от сфингоидна дълго-верижна база и мастна киселина, свързани чрез амидна връзка. При растенията са установени две основни групи сфинголипиди, глицерилцерамиди и инозитолфосфорилцерамиди. Разнообразието при глицерилцерамидите се дължи на разнообразие в структурата на изграждащите хидрофобния церамиден остатък мастна киселина и сфингоидна дълго-верижна база. Глицерилцерамидите са важни структурни компоненти на тонопласта и плазмалемата. Инозитолфосфорилцерамидите са открити като част от глицерилфосфатидилинозитолния остатък на растителни белтъци, които се транспортират до външния липиден слой на плазмалемата. Това предполага участие на инозитолфосфорилцерамидите в белтъчния транспорт. Неотдавна бе публикувано и първото научно съобщение за сигнална роля на растителен сфингоиден метаболит, сфингозин-1 фосфат.

Втората глава третира функцията на Asc-1p, като белтък участващ в сфинголипидната обмяна. В изследването е използван мутантен дрождев щам, при който двата хомолога на *Asc-1*, *LAG1* и *LAC* са делетирани. Експресията на *Asc-1* частично възстановява забавения растеж на щам, възстановява също така морфологията на клетъчната стена и главно възстановява сфинголипидния биосинтез. Част от изследванията в същата глава са върху протеините на дрождевата клетъчна стена. При дрождите част от тези белтъци са белтъците притежаващи глицерилфосфатидилинозитолен остатък, осигуряващ транспорта им до външния слой на плазмалемата. След транспортирането им част от тези белтъци се освобождават от липидния си остатък и ковалентно се свързват с полизахаридния скелет на клетъчната стена. Уестърн блот резултатите показват, че патрона на протеините на клетъчната стена на мутантния щам се различава от този на дивия тип. Експресията на *Asc-1* гена възстановява това отклонение, най-вероятно възобновявайки забавения транспорт на белтъците с глицерилфосфатидилинозитолен остатък, което е характерно за мутантния щам.

В глава трета и четвърта на дисертацията е показано, че когато доматени експлантати се третират с AAL-токсин, наличието или отсъствието на интактен *Asc-1* ген води до различия в сфинголипидния биосинтез. В глава трета използваме *in vivo* белязане на сфинголипидните предшественици и новосинтезираните сфинголипиди с радиоактивен серин. На първо място, в резултат на това белязане се наблюдава увеличение на нивото на церамидните предшественици, 3-кетодихидросфингозин и дихидросфингозин, в сфинголипидните извлекци на третираните с токсин експлантати. Това увеличение е по-силно изразено при *asc/asc* генотипа. На второ място, извлекците на третираните експлантати и от двата генотипа, *Asc/Asc* и *asc/asc*, показват различия в нивото на сфинголипидите. *Asc/Asc*

извлеките показват наличие на допълнителни, новосинтезирани сфинголипиди, докато *asc/asc* извлеките показват занижено ниво новосинтезирани сфинголипиди. Сфинголипидните извлекци не показват различия между *Asc/Asc* и *asc/asc* генотипите, когато не са третирани с токсин. В глава четвърта използваме *in vivo* белязане на сфинголипидите с радиоактивен инозитол. Това белязане показва, че третирането на доматиените експланти с AAL-токсин води до промени при инозитолфосфорилцерамидите. В глава четвърта са представени и резултатите от масспектрометричния анализ на глюкозилцерамиди в липидни извлекци, получени от доматиен лист. В извлеките са идентифицирани 26 глюкозилцерамидни вида. Относителното раз-пределение на отделните глюкозилцерамидни видове не се повлиява съществено от генотипа или третирането с AAL-токсин.

Сфингоидните дълго-верижни бази, церамидите и техните фосфорилирани производни са известни от изследванията при дрожди и бозайници като сигнални молекули, участващи в процесите ПКС, клетъчната пролиферация и в стресовите реакции. Клетъчната съдба може да зависи не само от концентрацията на отделните сфинголипиди, но и от тяхното съотношение. В резултат на въздействието на AAL-токсина, клетките на доматиен лист с генотип *asc/asc* претърпяват ПКС, която се предшества от увеличено количество сфингоидни дълговерижни бази и намалено количество инозитолфосфорилцерамиди. Едновременно третиране на *asc/asc* експлантите с AAL-токсин и мириоцин, инхибитор на първата реакция от *de novo* церамидната биосинтеза, значително редуцира клетъчната смърт. Това е допълнително доказателство, че първоначалните сигнали при индуцираната от AAL-токсин ПКС са сфингоидни метаболити. Остава открит въпроса дали сигнала е увеличеното количество дълговерижни бази или е съвместен ефект на това и намаленото ниво инозитолфосфорилцерамиди.

Друга форма на ПКС при растенията е т. нар. свръхчувствителен отговор. Свръхчувствителен отговор се получава в резултат на взаимодействие на елиситор, отделен от вредител и продукта на растителен резистентен ген. Включените в резултат на това взаимодействие сигнали водят до загиване на растителните тъкани в непосредствена близост до вредителя. По този начин вредителят остава локализиран в мъртвата растителна тъкан и растението не проявява болестни симптоми. Тази форма на ПКС може да се изучава с помощта на мутанти, чиито фенотип представлява проявление на свръхчувствителен отговор без наличието на вредител. При царевицата такъв фенотип може да се получи като резултат от мутиране на *Lls1* гена. Клонирайки доматиен хомолог на този ген и подтискайки неговата експресия на ниво РНК, успяхме да получим подобен мутантен фенотип при доматиите. Сравнителният анализ на установената белтъчна последователност показва, че този ген е уникален за фотосинтезиращите организми.

ПКС е процес при многоклетъчните организми, важен за оцеляването на организма като цяло. Сигналите и гените, които контролират този процес са запазили между отделните видове (*Lls1*) и в някои случаи дори

преминават границите между организмите царства, както е примера с *Asc-1* и сфинголипидните сигнали. *Asc-1* е част от основен обменен път, сфинголипидния биосинтез, чието дисбаланс може да доведе до летални последици за клетката.