

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.

## Samenvatting

Geprogrammeerde celdood is een proces in multicellulaire organismen waarbij cellen zelfmoord plegen. Geprogrammeerde celdood wordt genetisch bepaald. Als dit proces ontregeld is kan dit ernstige of letale gevolgen hebben voor het organisme. Kanker en degeneratieve ziektes van het zenuwgestel in zoogdieren worden vaak geassocieerd met afwijkingen in het proces van geprogrammeerde celdood. De ontwikkeling van een dierlijk embryo is afhankelijk van de correcte uitvoering van geprogrammeerde celdood in bepaalde celtypes, die niet langer nodig zijn voor de volgende ontwikkelingsstadia. In planten komt geprogrammeerde celdood voor gedurende de ontwikkeling, als reactie op een pathogene interactie (bekend als hypersensitieve response) of als het effect van specifieke toxinen die door pathogene organismen worden uitgescheiden. De voortgang van de geprogrammeerde celdood kan verdeeld worden in drie onderscheiden fasen, inductie, uitwerking en degradatie. Ons onderzoek richt zich vooral op de initiatiesignalen die plaats vinden tijdens de inductiefase van de geprogrammeerde celdood in de tomatenplant.

De tomaat werd gekozen als modelorganisme omdat het een genetisch goed gekarakteriseerde plant is en omdat het *Asc*-AAL-toxine systeem een goed beschreven model is. *Asc* is een ziekteresistentielocus in de tomaat dat resistentie geeft tegen de ziekte *Alternaria stem canker* (*Alternaria* stengel rot). Het locus heeft twee allelen, *Asc*, dat resistentie geeft tegen de schimmel pathogeen *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* en *asc* dat gevoeligheid voor deze schimmel geeft. De schimmel *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* scheidt een toxine uit, het zogenaamde AAL-toxine. De interactie tussen tomatenplanten en de schimmelpathogeen kan vereenvoudigd worden tot het effect van het gezuiverde AAL-toxine op een blad van de plant. Het *Asc* allel veroorzaakt ongevoeligheid voor het toxine en omgekeerd het *asc* allel veroorzaakt gevoeligheid. Gevoelige *asc/asc* tomatenplanten sterven af door geprogrammeerde celdood als ze in aanraking komen met het AAL-toxine. AAL-toxine samen met fumonisine, een ander toxine dat door een schimmel (*Fusarium moniliforme*) wordt geproduceerd, zijn structurele homologen van sfingoïde lang-ketenige basen en competitieve remmers van (dihydro)ceramide synthase, een sleutelenzym in de sfingolipide biosynthese. Het product van het *Asc-1* gen behoort tot een genefamilie van integrale-membraan eiwitten die homologen omvat uit alle eukaryotische rijken. Vergeleken met *Asc-1*, bevat *asc-1* een paar mutaties, een daarvan, een deletie van 2bp, resulteert in een frame-shift en daardoor hoogst waarschijnlijk in de afwezigheid van het eiwit. Als de twee homologen van *Asc-1* uit gist, *LAG1* en *LAC1*, uitgeschakeld worden is het resultaat letaal of een langzaam groeiend fenotype. Het langzaam groeiende fenotype vertoont ernstige celwand afwijkingen, vertraagd transport van eiwitten met een glycosylfosfatidylinositol (GPI) anker en afwijkingen in de sfingolipide biosynthese. De twee gist homologen, *LAG1* en *LAC1*, blijken essentiële componenten van (dihydro)ceramidesynthase te zijn. Hiermee wordt

gesuggereerd dat sfingolipide signalen een rol spelen in de door AAL-toxine geïnduceerde geprogrammeerde celdood in *asc/asc* tomatenplanten.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de huidige kennis over plantensfingolipiden. Sfingolipiden zijn lipide moleculen met een hydrofobe ceramide ruggengraat en een hydrofiele kop. De ceramide ruggengraat bestaat uit een sfingoïde langketenige base en een vetzuur verbonden door een amide binding. In planten zijn twee groepen sfingolipiden beschreven, glucosylceramiden en inositolfosforylceramiden. De diversiteit van plantenglucosylceramiden wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de verschillen in de structuur van de langketenige base en/of de vetzuur component van de ceramide ruggengraat. Glucosylceramiden zijn belangrijke structurele componenten van de tonoplast en de plasmamembraan. Inositolfosforylceramiden worden gevonden als onderdeel van het GPI-anker van planteneiwitten, waarvan de uiteindelijke bestemming de buitenste laag van de plasmamembraan is, hetgeen een rol suggereert voor de planteninositolfosforylceramiden in het eiwit transport. In planten zijn reeds een aantal genen gekloneerd die betrokken zijn bij de sfingolipide biosynthese. De eerste melding van de rol van een plantensfingolipide metaboliet, sfingosine-1-fosfaat, in signaal overdracht is onlangs verschenen.

De functie van *Asc-1p* in het sfingolipide metabolisme van gist wordt aangetoond in Hoofdstuk 2. Expressie van het tomaten *Asc-1* gen in de *lag1/lac1* gist mutant complementeert gedeeltelijk het langzaam groeiende fenotype, herstelt de wildtype morfologie van de celwand en belangrijk, herstelt de sfingolipide biosynthese. De *lag1/lac1* gist mutant vergeleken met het wildtype vertoont verschillen in het patroon van celwandeiwitten. In gist wordt een gedeelte van de eiwitten met een GPI-anker losgemaakt van hun anker en verbonden met de polysaccharide matrix van de celwand. Samen met een andere groep van eiwitten (eiwitten met een zogenaamde interne herhaling van een aminozuurvolgorde) vormen zij de buitenste eiwitlaag van de gist celwand. Als *Asc-1* tot expressie wordt gebracht in de *lag1/lac1* mutant van gist wordt het wildtype patroon van celwandeiwitten hersteld, waarschijnlijk door het tenietdoen van de vertraging in het transport van eiwitten met een GPI-anker.

In de tomaat hebben wij aangetoond dat de aan- of afwezigheid van het *Asc-1* gen, een veranderd labeling patroon van sfingolipiden tot gevolg had, als AAL-toxine wordt toegevoegd (Hoofdstuk 3). Ten eerste waren de concentratie precursors voor ceramide, 3-ketodihydrosfingosine en dihydrosfingosine, verhoogd in de extracten van beide genotypen, echter in het *asc* genotype in hogere mate. Ten tweede behandeling met AAL-toxine beïnvloedde de sfingolipiden. De sfingolipiden waren verlaagd in lipide extracten van *asc*, terwijl de *Asc* extracten wildtype niveaus vertoonden van sfingolipiden en additionele nieuwe sfingolipide soorten. Als bladschijfjes van de tomaat niet werden behandeld met het AAL-toxine was er geen verschil in sfingolipiden en sfingoïde precursors tussen *Asc* en *asc*, aangetoond door middel van dunnelaagchromatografie.

In Hoofdstuk 4 laat labelen van de tomatenbladschijfjes met myo-[<sup>3</sup>H]inositol zien dat de synthese van inositolfosforylceramides wordt beïnvloed door behandeling met AAL-toxine. Door gebruik te maken van vloeistof chromatografie met tegengestelde fase en in tandem gekoppelde massa spectrometrie, hebben we 26 soorten glucosylceramide in tomatenbladeren geïdentificeerd. De relatieve hoeveelheden van de verschillende glucosylceramiden werd niet significant beïnvloed door het genotype of door behandeling met AAL-toxine.

Lang-ketenige basen, ceramide en de gefosforyleerde afgeleiden, zijn bekend uit gist en zoogdier systemen als krachtige signaalmoleculen die een rol spelen in apoptosis, cel vermenigvuldiging en stress reacties. Niet alleen de verlaging of verhoging van de concentraties van individuele svingoïde verbindingen zijn belangrijk voor de bestemming van een cel maar ook hun onderlinge verhouding. In het geval van de interactie tussen *asc* en AAL-toxine in de tomaat, dat geprogrammeerde celdood tot gevolg heeft, vond een verhoging van de concentratie van de lang-ketenige basen gelijktijdig plaats met een verlaging in de inositolfosforylceramide synthese. Myriocine, een remmer van de eerste stap in de ceramide synthese, onderdrukt voor een groot deel, hoewel niet volledig, het verschijnsel van celdood door AAL-toxine in *asc* planten. Dit is een additioneel bewijs dat het primaire signaal voor AAL-toxine geïnduceerde geprogrammeerde celdood wordt verkregen uit svingolipide metaboliëten. Beantwoord moet nog worden of het signaal alleen maar het verhoogde niveau van de lang-ketenige basen is of dat er een synergistisch effect is tussen het verhoogde niveau van de lang-ketenige basen en het verlaagde niveau van inositolfosforylceramiden en mogelijk diacylglycerol.

Een andere vorm van geprogrammeerde celdood in planten is de zogenaamde hypersensitieve response. De hypersensitieve response vindt plaats na herkenning van een elicitor geproduceerd door een pathogeen door het resistentie gen van een plant. De daar op volgende signaal overdrachten leiden tot de dood van het weefsel dat de pathogeen omringt. De pathogeen blijft ingesloten en de plant is resistent. De inductie van geprogrammeerde celdood in planten kan worden bestudeerd door mutanten die dit soort lesies nabootsen. Deze lesie nabootsende mutanten vertonen een hypersensitieve response-achtig fenotype in de afwezigheid van een pathogeen. Een mutatie in het *Lls1* gen van maïs geeft zo'n lesie nabootsend fenotype. Door de tomaten homoloog van *Lls1* te kloneren en uit te schakelen waren wij in staat een lesie nabootsende mutant van de tomaat te construeren (Hoofdstuk 5). De analyse van het voorspelde *Lls1*-eiwit toonde aan dat het eiwit uniek is voor fotosynthetiserende organismen. Licht afhankelijkheid van het fenotype van de *lls1* mutant en de homologie van het *Lls1*-eiwit met eiwitten die een rol spelen in de fotosynthese duidt mogelijk op reactieve zuurstof radicalen als mogelijke signalen voor de celdood.

Geprogrammeerde celdood is een van de basis processen in multicellulaire organismen van belang voor de overleving van het organisme als geheel. Signalen

die dit proces controleren en genen die een rol spelen in de regulatie van dit proces zijn geconserveerd tussen soorten, zoals aangetoond in de *Lls1* studie. De conservering van dergelijke mechanismen kan zelfs de grenzen tussen rijken overschrijden, zoals aangetoond in het geval van *Asc-1* en sfingolipide signalen. *Asc-1p* is onderdeel van een basale metabolische route, de sfingolipide biosynthese, disruptie hiervan kan letale gevolgen hebben voor de cel.