

Abstract

Phospholipids are a class of lipids which contain a phosphate group, a hydrophilic head group such as choline and a hydrophobic tail. Phospholipids and their lyso forms are not only components of cell membranes but they can also act as signaling molecules in plants and animals. Sphingolipids are a sub-group of phospholipids and many different effects, from cell proliferation to apoptosis, have been assigned to this class of lipids. Sphingosylphosphorylcholine (SPC) as a member of the lysosphingolipids is known to be generated by de-acylation of its precursor molecule sphingomyelin in mammals. The chemical structure of SPC is very similar to the structure of lysophosphatidylcholine (LPC). The main difference is that SPC has a backbone of sphingosine, whereas the backbone of LPC is made of glycerol. LPC is known to be naturally occurring in plants and was, for example, shown to be a signal in the arbuscular mycorrhiza. SPC is a naturally occurring component of blood plasma and serum in humans and mediates physiological responses, such as cell differentiation, proliferation and growth inhibition, in a large variety of mammalian cell types. But to date, the presence of SPC in plants has not been reported.

In the present work experiments with suspension cultured tomato cells, which are a useful tool to identify signals from plant pathogens and symbionts and were helpful to characterize LPC, showed that SPC is also perceived by these plant cells leading to ion fluxes, which in turn alters the extracellular pH. Arabidopsis lines expressing the calcium reporter aequorin revealed that these ion fluxes are mainly consistent of Ca^{2+} currents and that the increase in cytosolic Ca^{2+} caused by SPC is channel mediated.

On the level of whole Arabidopsis seedlings it became evident that SPC and LPC can trigger similar responses, however, by contrast some effects were only found in the case of SPC treatment. SPC and to a lesser extent LPC inhibited growth of the main- and lateral roots but not of the hypocotyls, suggesting a distinct impact of SPC and LPC on cell expansion and cell division, or an unequal distribution within the plant upon uptake of these lipids. The reduction in root growth was accompanied by an increase in lateral root formation. Besides a direct influence of SPC and LPC on lateral root initiation it is likely that the reduction of main root growth subsequently triggers lateral root initiation.

The cause of the severe root growth inhibition in the case of SPC treatment was found to be due to a reduction in cell division events in the root meristem. This led to rapid exhaustion of the meristem. In contrast to SPC, LPC treated plants also developed a

smaller root meristem but the size remained stable. Moreover, auxin levels were found to be reduced in the root tip of SPC treated seedlings, suggesting a reallocation of auxin from the root tip, or an inhibition of auxin flux from the shoot to the root tip leading to increased concentrations at the more upper parts of the root resulting in lateral root initiation events.

Furthermore, only SPC and not any other related lipid induced ectopic root hair formation and it was found that local treatment at the root tip is sufficient to trigger this effect. But a general involvement of SPC in cell differentiation could be excluded because QC identity was not compromised and columella initials did not show any sign of differentiation.

This work demonstrated that SPC acts as calcium-mobilizing compound in plants. SPC not only controls cell cycle activity in the root tip but also triggers organ formation and affects epidermal cell fate. Moreover, these findings demonstrate a big potential of SPC as a messenger or signaling molecule and its possible functional conservation in dividing and differentiated cells of plants and animals. Future work, for example screening of an EMS population, might help to identify SPC receptors in plants, which are also still elusive in the animal field. Furthermore, the role of SPC as secondary messenger involved in regulating Ca^{2+} fluxes via CaM, as it was suggested in the animal system, could be clarified with experiments using CaM inhibitors or Arabidopsis CaM mutants.

Zusammenfassung

Phospholipide sind eine Klasse von Lipiden, die eine Phosphatgruppe, eine hydrophile Kopfgruppe wie zum Beispiel Cholin und ein hydrophobes Ende haben. Phospholipide und deren Lysoform sind nicht nur Komponenten von Zellmembranen, sondern können auch als Signalmoleküle in Pflanzen und Tieren agieren. Sphingolipide sind eine Untergruppe der Phospholipide und viele unterschiedliche Effekte, von Zellproliferation bis zu Apoptosis, wurden dieser Gruppe von Lipiden zugeordnet. Sphingosylphosphorylcholin (SPC) ist ein Mitglied der lysosphingolipide und es ist bekannt, dass es durch die Deacylierung von seinem Vorgängermolekül Sphingomyelin in Säugetieren generiert wird. Die chemische Struktur von SPC ist sehr ähnlich zu der Struktur von Lysophosphatidylcholin (LPC). Der Hauptunterschied ist, dass SPC ein Grundgerüst aus Sphingosine hat, wohingegen das Grundgerüst von LPC aus Glycerin besteht. LPC ist bekannt als natürlich vorkommendes Molekül in Pflanzen und es wurde zum Beispiel gezeigt, dass es als Signal in der Arbuskulären Mykorrhiza dient. SPC ist eine naturgemäß vorkommende Komponente in Blutplasma und Serum in Menschen. Es vermittelt physiologische Prozesse, wie zum Beispiel Zelldifferenzierung, Proliferation und Wachstumsinhibition, in vielen verschiedenen Zellarten von Säugetieren. Aber bis heute wurde über das Vorkommen von SPC in Pflanzen nicht berichtet.

Experimente mit kultivierten Tomatenzellkulturen, welche als nützliches Werkzeug zur Identifizierung von Signalen aus Pflanzenpathogenen, Symbionten und auch LPC dienten, zeigten, dass auch SPC durch diese Zellen erkannt wird und zu Ionenflüssen führt die den extrazellulären pH ändern. Arabidopsis-Linien, die den Kalziumreporter Aequorin exprimieren, zeigten, dass diese Ionenflüsse hauptsächlich aus Ca^{2+} Strömen bestehen und dass der Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} , ausgelöst durch SPC, kanalvermittelt ist.

Auf der Ebene ganzer Arabidopsis Keimlinge konnte gezeigt werden, dass SPC und LPC ähnliche Reaktionen auslöst, jedoch einige Effekte nur im Falle von SPC auftreten. SPC und in geringerem Ausmaß LPC inhibierten das Wachstum von Haupt- und Seitenwurzeln, aber nicht das Wachstum des Hypokotyls, was nahelegt, dass SPC und LPC Zellexpansion und Zellteilung unterschiedlich beeinflussen, oder dass diese Lipide nach Aufnahme in die Pflanze unterschiedlich verteilt werden. Die Verringerung des Wurzelwachstums wurde begleitet von einem Anstieg der Anzahl an Seitenwurzeln. Neben einem direkten Einfluss von SPC und LPC auf die Initiation von Seitenwurzeln ist

es auch gut möglich, dass die Reduktion des Hauptwurzelswachstums nachfolgend zur Auslösung von Seitenwurzelbildung führt.

Die Ursache der starken Wurzelwachstumshemmung im Falle von SPC konnte auf die Reduktion von Zellteilungen im Wurzelmeristem zurückgeführt werden. Das führte zu einer schnellen Erschöpfung des Meristems. Im Gegensatz zu mit SPC behandelten Pflanzen entwickelten mit LPC behandelte Pflanzen zwar auch ein kleineres Wurzelmeristem, aber die Größe des Meristems blieb stabil. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Auxinkonzentrationen in der Wurzelspitze von mit SPC behandelten Pflanzen reduziert sind. Dies deutet entweder auf eine Reallokation von Auxin aus der Wurzelspitze hin, oder auf eine Inhibition des Auxinflusses vom Spross zur Wurzelspitze. Dies führte zu einer erhöhten Konzentration von Auxin an höher gelegenen Stellen der Wurzel und resultierte in der Bildung von Seitenwurzeln.

Zusätzlich induzierte SPC und kein anderes verwandtes Lipid die Bildung ektoptischer Wurzelhaare und es konnte gezeigt werden, dass eine lokale Behandlung mit SPC an der Wurzelspitze ausreicht um diesen Effekt auszulösen. Eine generelle Beteiligung von SPC in Zelldifferenzierungsvorgängen konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Identität des ruhenden Zentrums nicht kompromittiert wurde und Columella Stammzellen keine Anzeichen von Ausdifferenzierung zeigten.

Diese Arbeit demonstriert, dass SPC als kalziummobilisierendes Molekül in Pflanzen agiert. SPC kontrollierte nicht nur die Aktivität des Zellzyklus in der Wurzelspitze sondern löste auch die Bildung von Pflanzenorganen aus und beeinflusste das Schicksal von Epidermiszellen. Weiterhin demonstrieren diese Befunde das große Potential von SPC als Botenstoff oder Signalmolekül und zeigen seine möglicherweise funktionelle Konservierung in sich teilenden und differenzierenden Zellen von Pflanzen und Tieren. Zukünftige Arbeiten, wie zum Beispiel das Screenen von EMS Populationen, könnte zur Identifizierung von SPC-Rezeptoren in Pflanzen führen, welche auch im tierischen System noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen wurden. Weiterhin könnte die Beteiligung von SPC in der Regulation von Kalziumströmen via CaM, wie es für das tierische System vorgeschlagen wurde, durch Versuche mit CaM Inhibitoren oder Arabidopsis CaM Mutanten aufgeklärt werden.