



# Mecanismos de señalización celular mediados por fosfolípidos

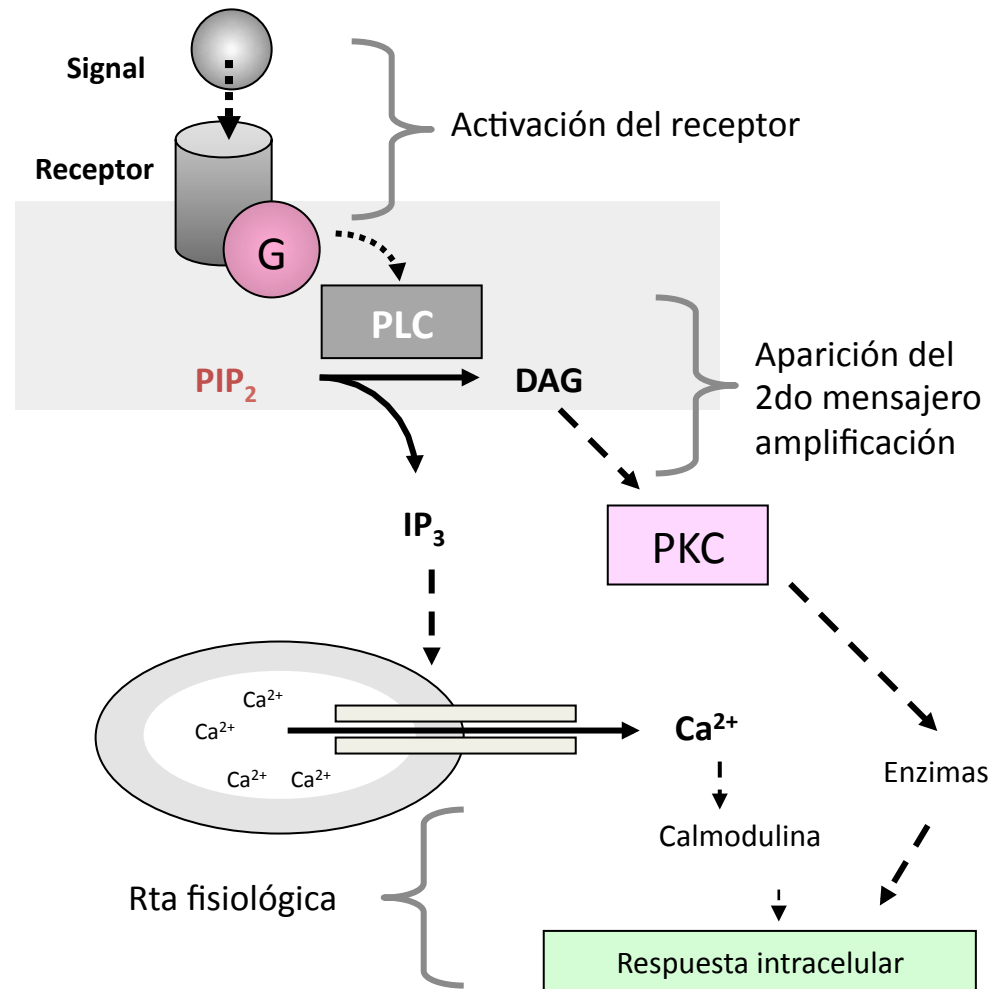
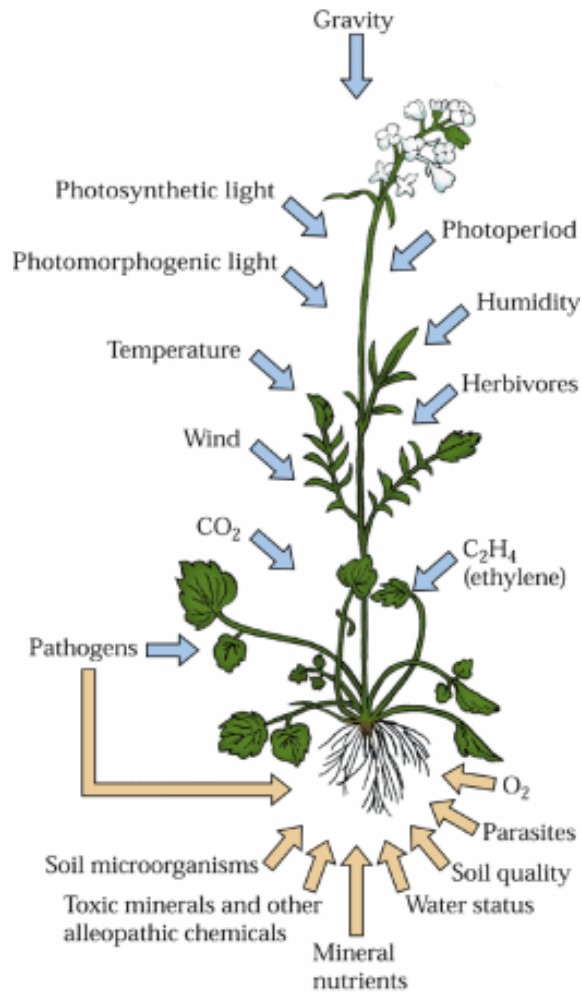
**Ana Laura Villasuso**

## **SEÑAL CELULAR**

**Mecanismo complejo de comunicación que regula y coordina diferentes funciones celulares.**

**La capacidad de una célula para percibir una señal de su medio ambiente y elaborar una respuesta correcta constituye la base de la homeostasis celular.**

# ¿Cómo funciona?



## Cellular tools for information transmission

### 2. Second messengers

•Diffusible (?) messengers interact with and cause changes in activity or location of a protein

- Messengers must be mobile, stable
- Require own regulatory networks

#### MESSENGERS

examples

metal ions

Calcium  
Zinc, also Mn<sup>2+</sup>

Lipids  
+ Inositol lipids

DAG  
PIPs, IPs

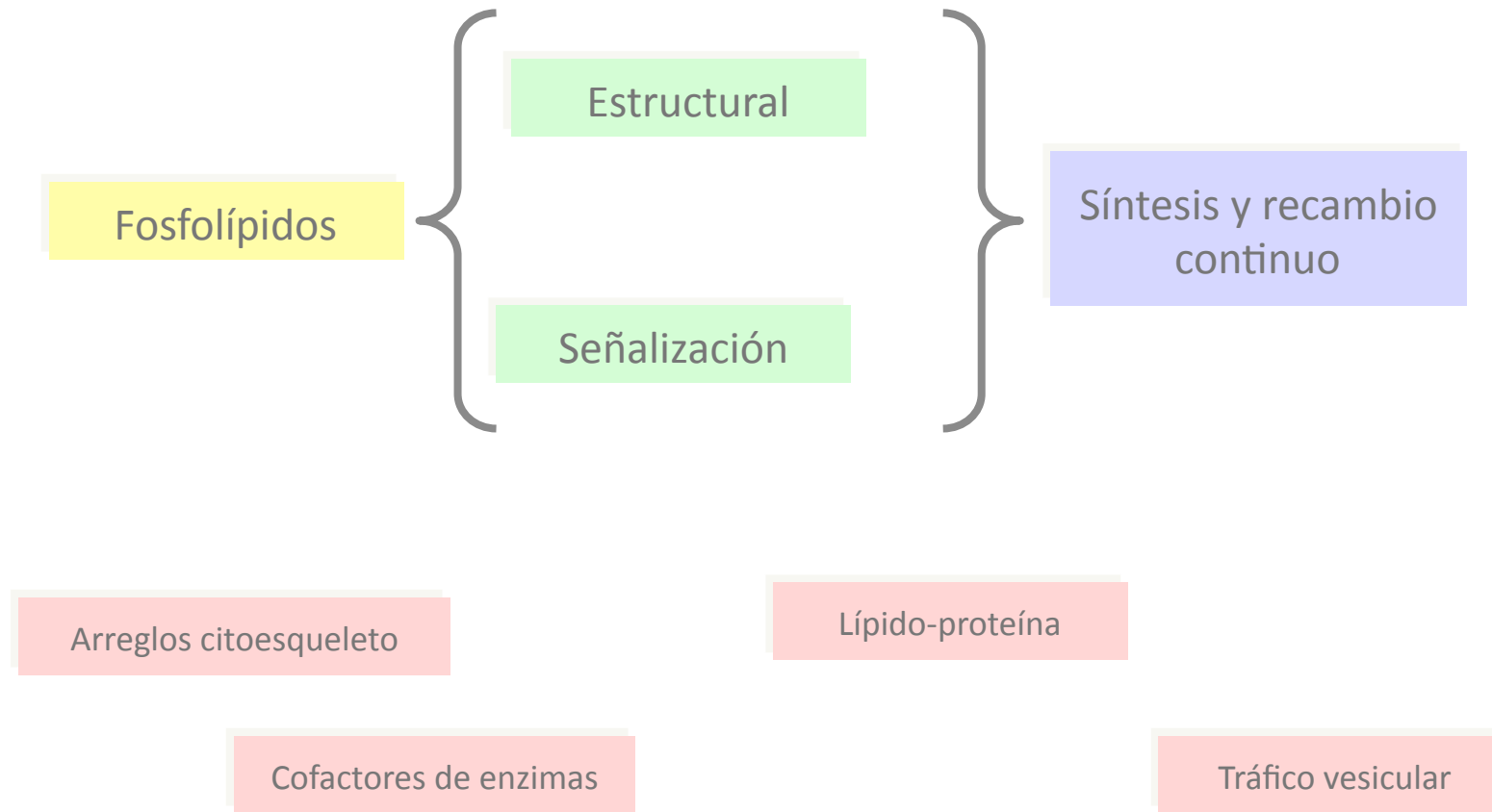
Cyclic nucleotides  
+ sugar nucleosides

cAMP, cGMP  
ADP-ribose,  
cADP-ribose

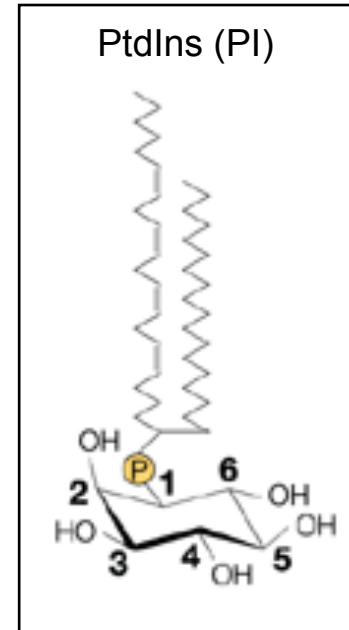
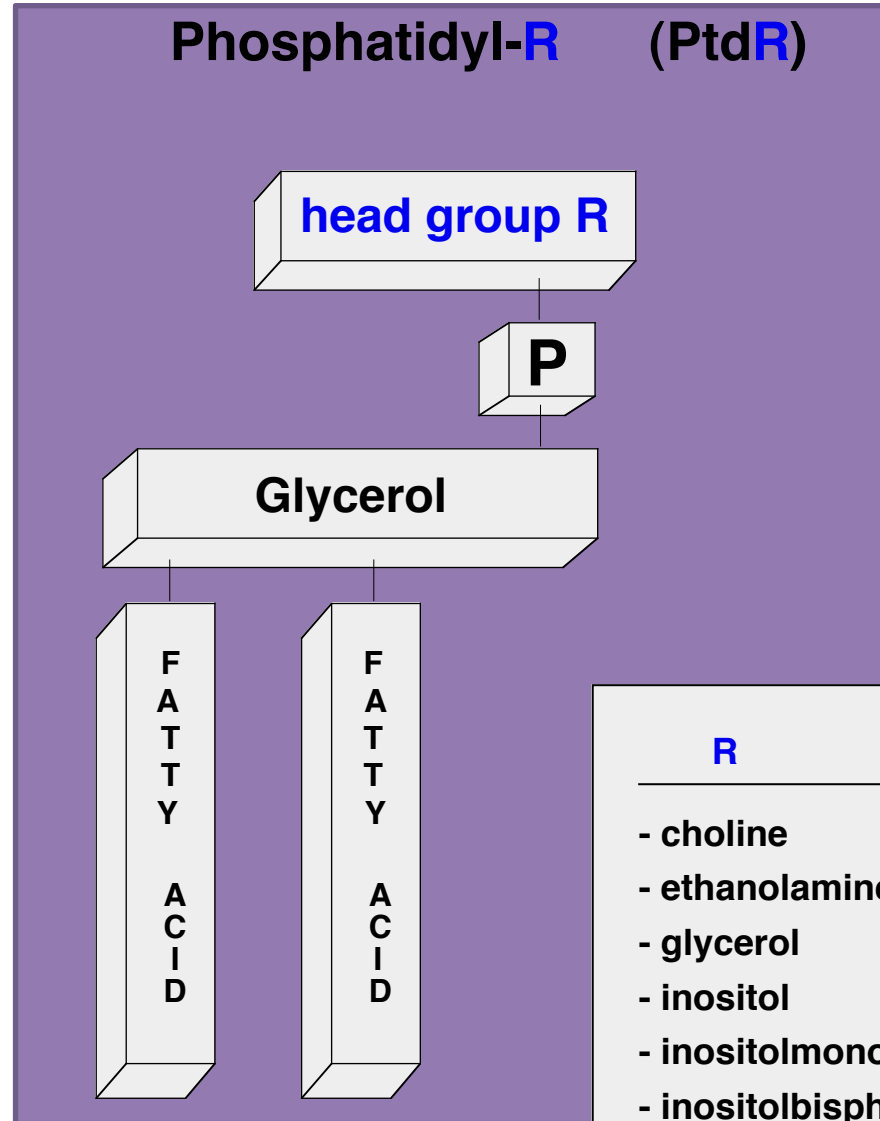
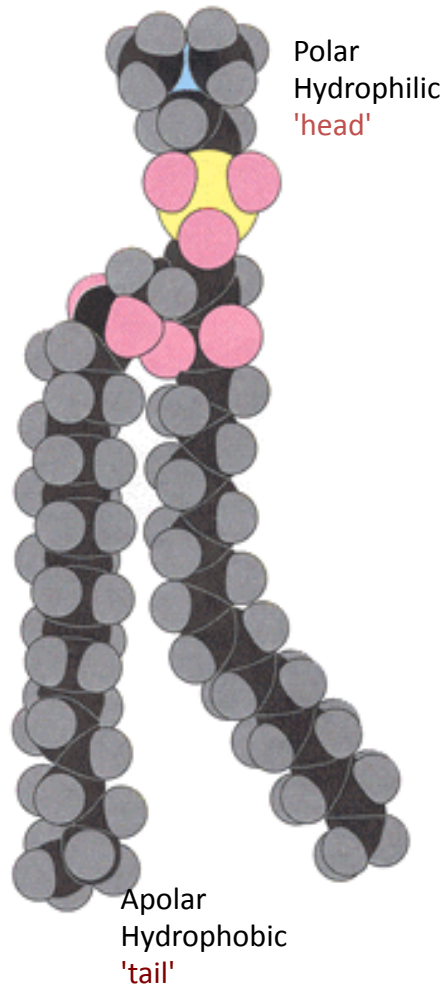
dissolved gas

NO

# Papel bi-funcional de los fosfolípidos



# Estructura y nomenclatura de los fosfolípidos: grupo polar



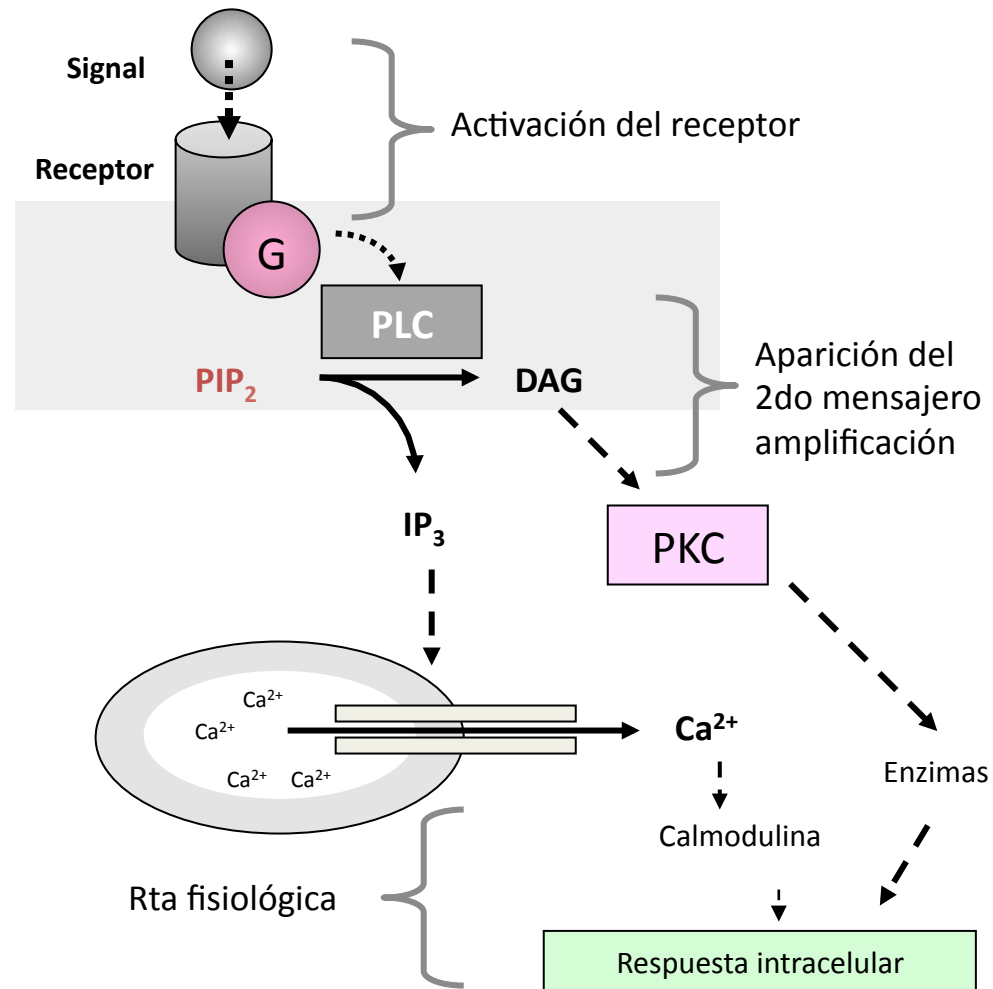
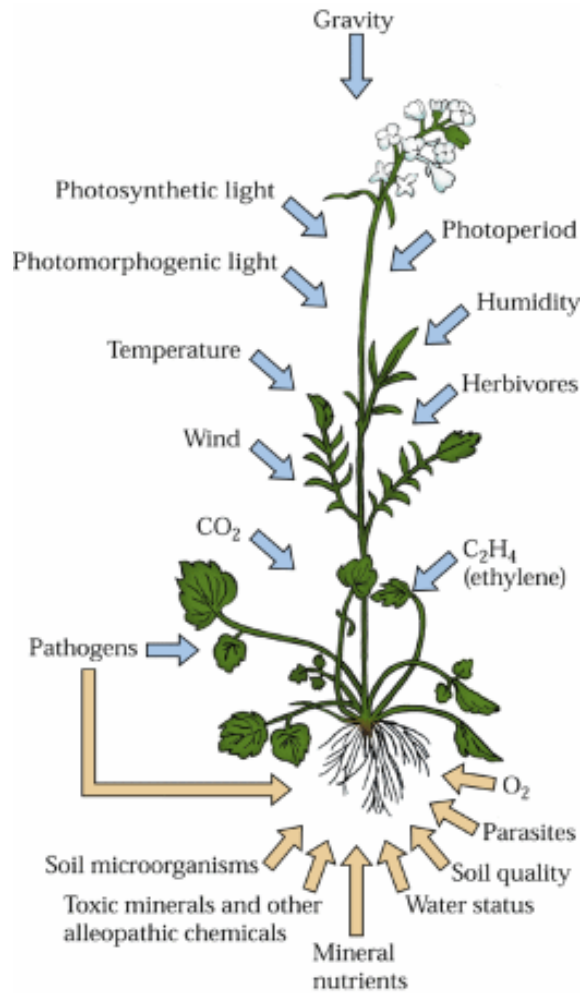
R	Lipid	
- choline	PtdCho	PC
- ethanolamine	PtdEtn	PE
- glycerol	PtdGro	PG
- inositol	PtdIns	PI
- inositolmonophosphate	PtdInsP	PIP
- inositolbisphosphate	PtdInsP <sub>2</sub>	PIP <sub>2</sub>
- OH	PtdOH	PA



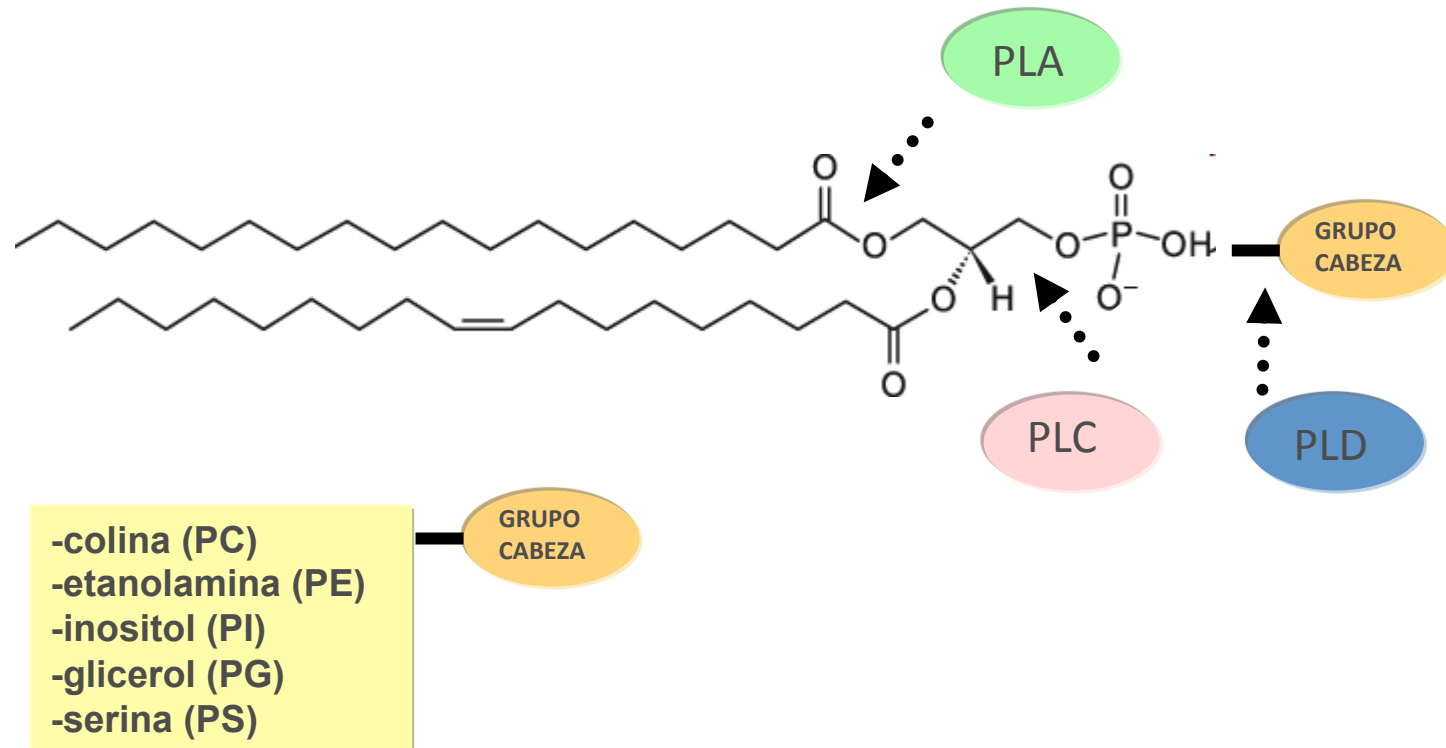
Fosfolípidos		composición (%)		
PtdCho	PC	}	~ 80	Lípidos 'estructurales'
PtdEtn	PE			
PtdGro	PG	}	~ 20	
PtdIns	PI			
-----				
PtdOH	PA		~1	Lípidos 'minoritarios'
PtdInsP	PIP	}	~1	
PtdInsP <sub>2</sub>	PIP <sub>2</sub>			



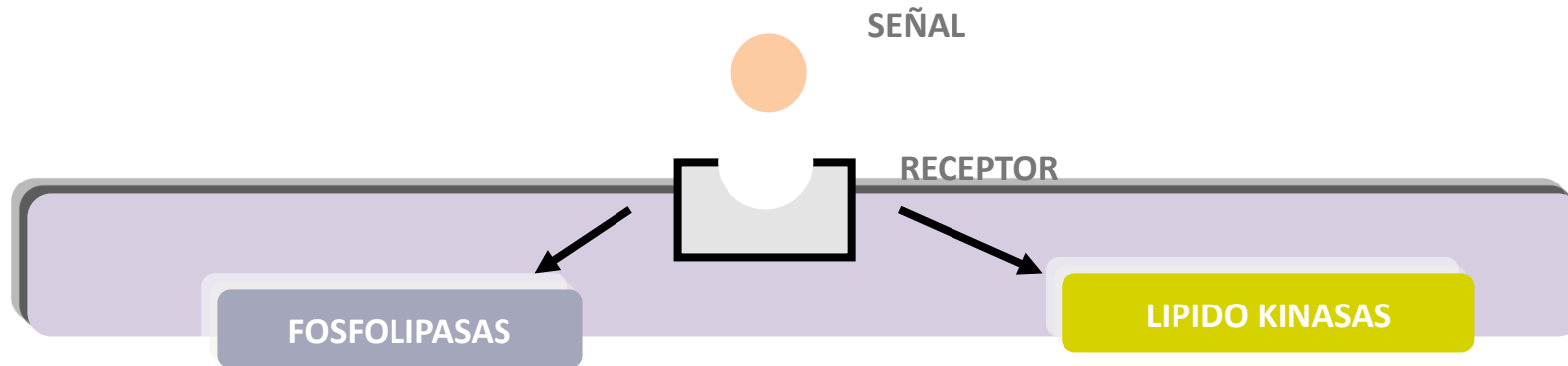
# ¿Cómo funciona?



# Estructura de fosfolípidos/ actividad de fosfolipasas

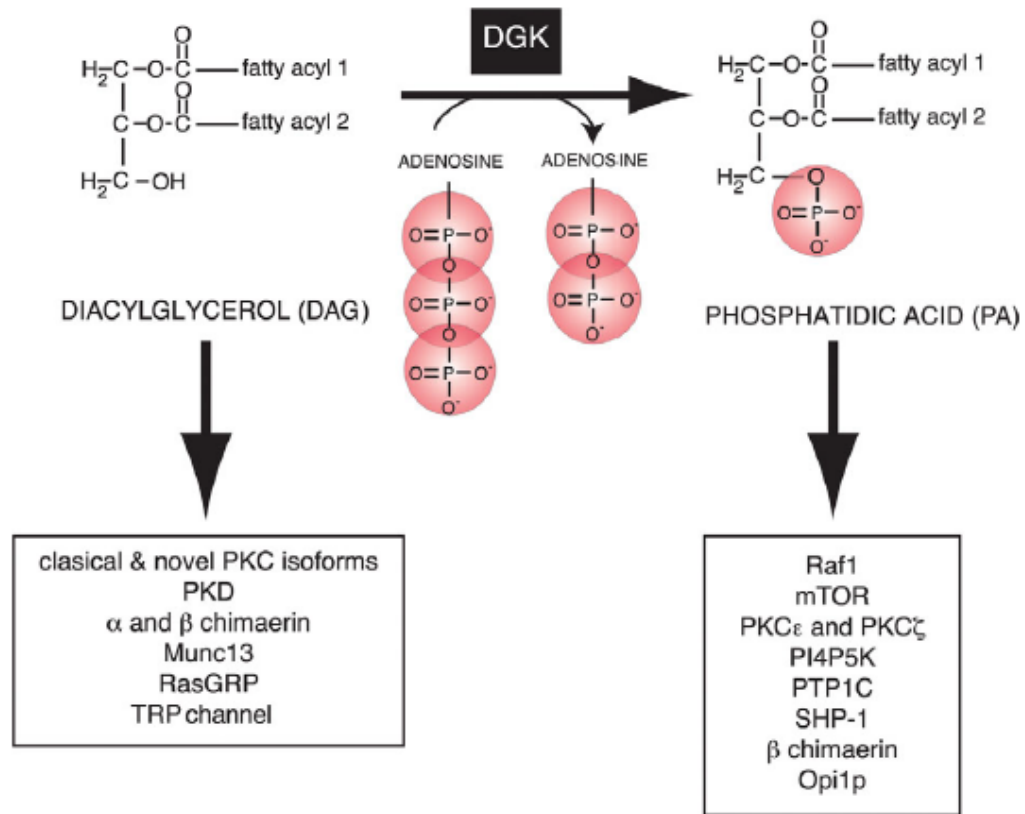


# Cascadas de señalización



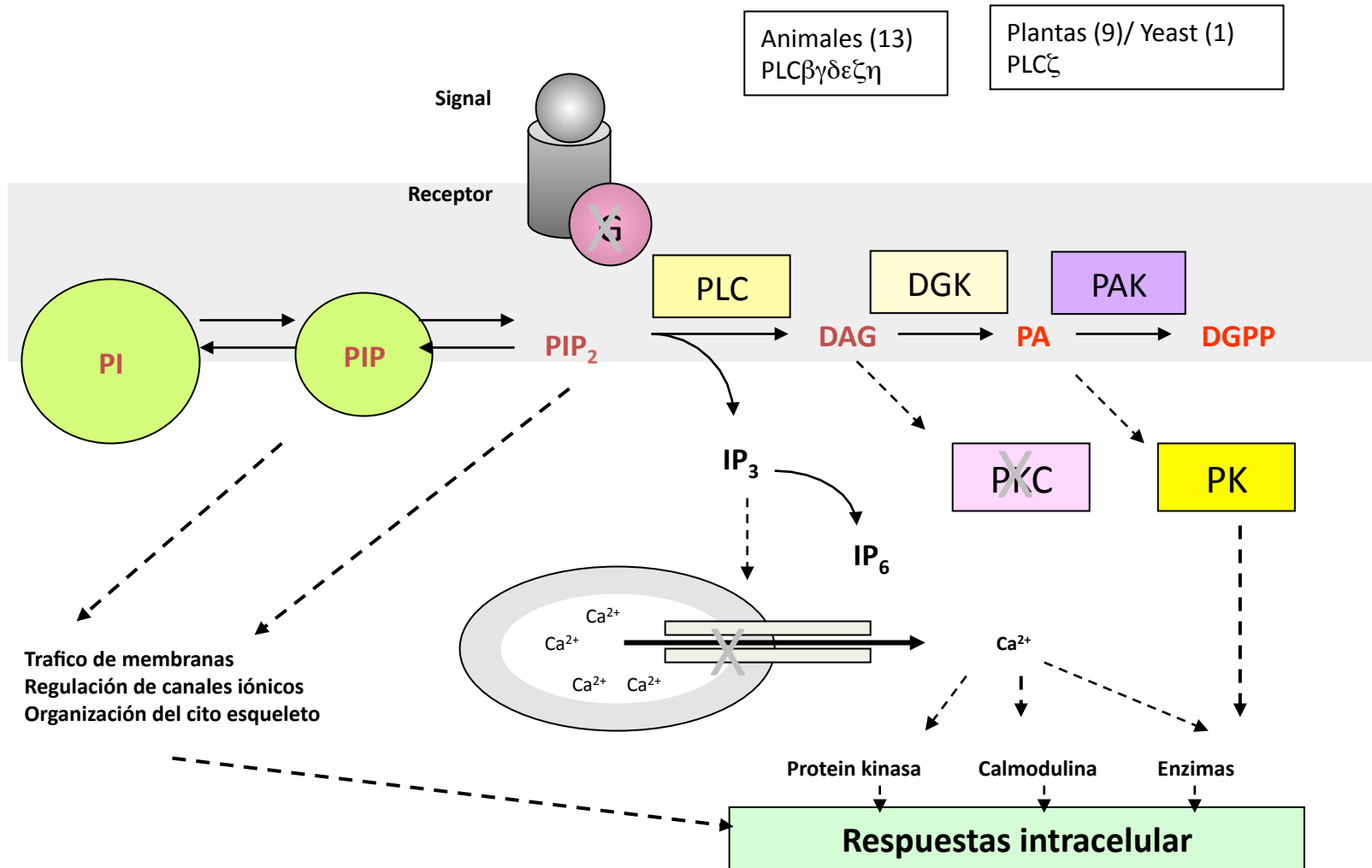
ENZIMA	PLA <sub>2</sub>	PLC	PLD	DGK	PAK	PI3K	PI4K	PI3P5K	PI4P5K
PRECURSOR	PC	PIP <sub>2</sub>	PC	DG	PA	PI	PI	PI3P	PI4P
PRODUCTOS	LPC + FA	IP <sub>3</sub> + DG	PA + Colina	PA	DGPP	PI3P	PI4P	PI(3,5)P <sub>2</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub>

# Diacilglicerol kinasa

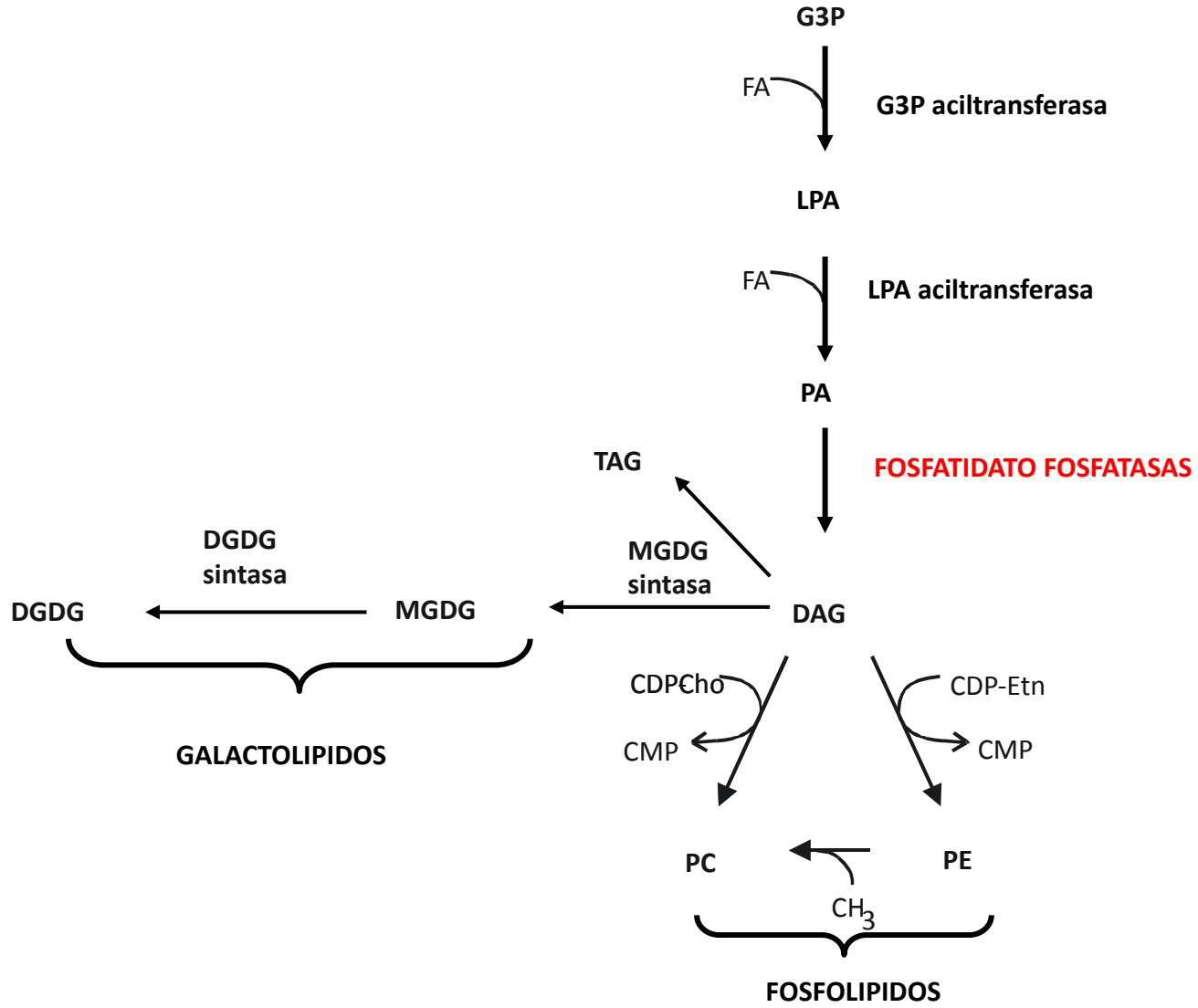


# Señalización PI/ PLC en plantas

## Diferencias con el modelo propuesto en mamíferos



# Kennedy pathway

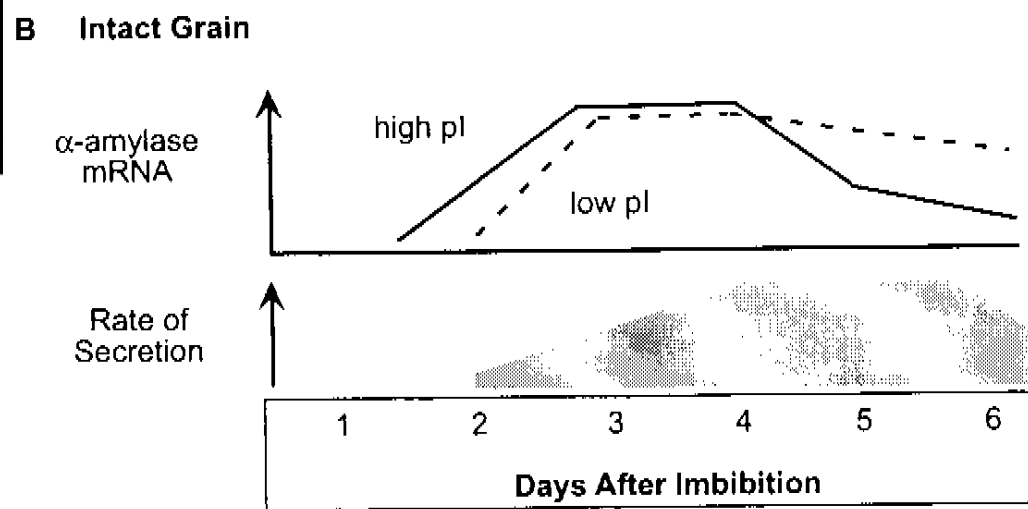
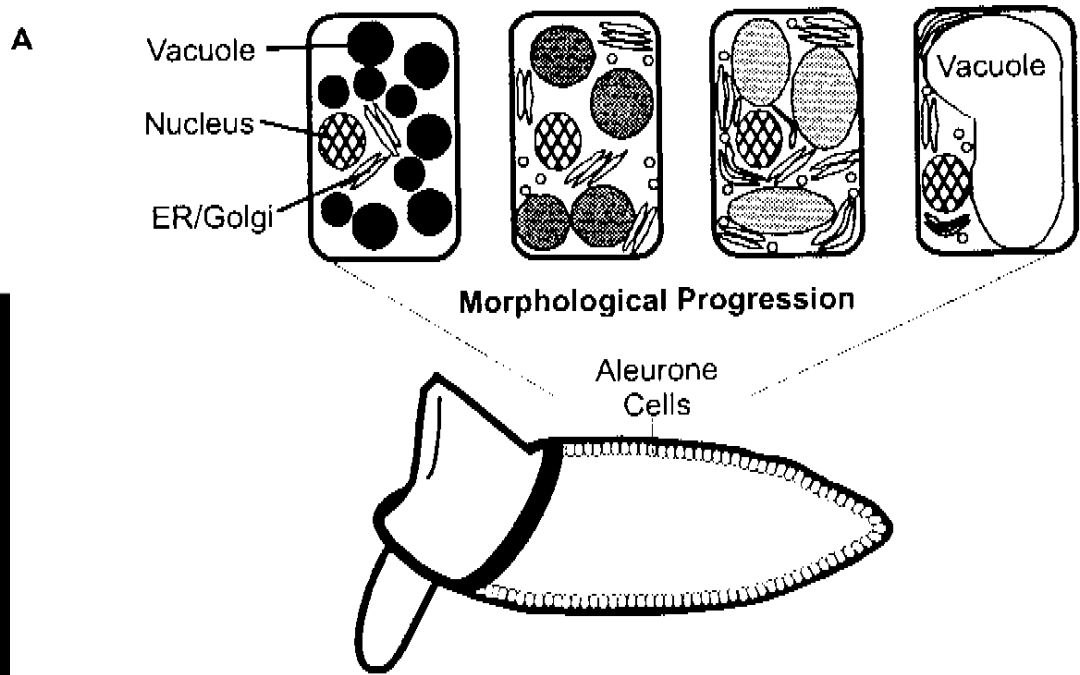
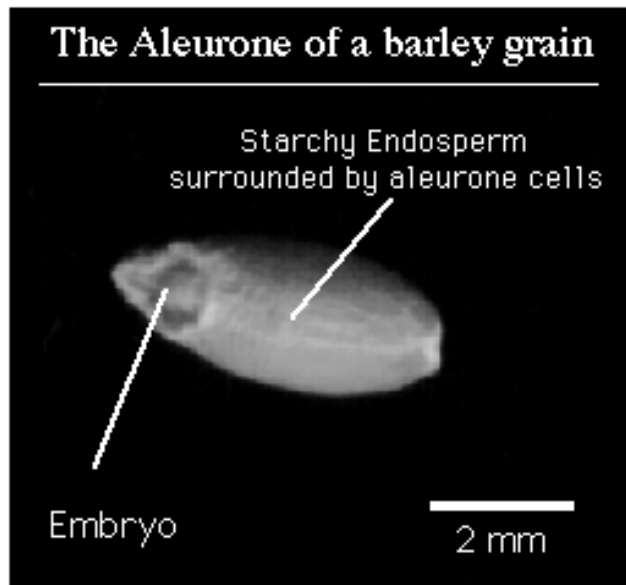


# Participación de fosfolípidos en la señal de Giberelina y Acido abscísico

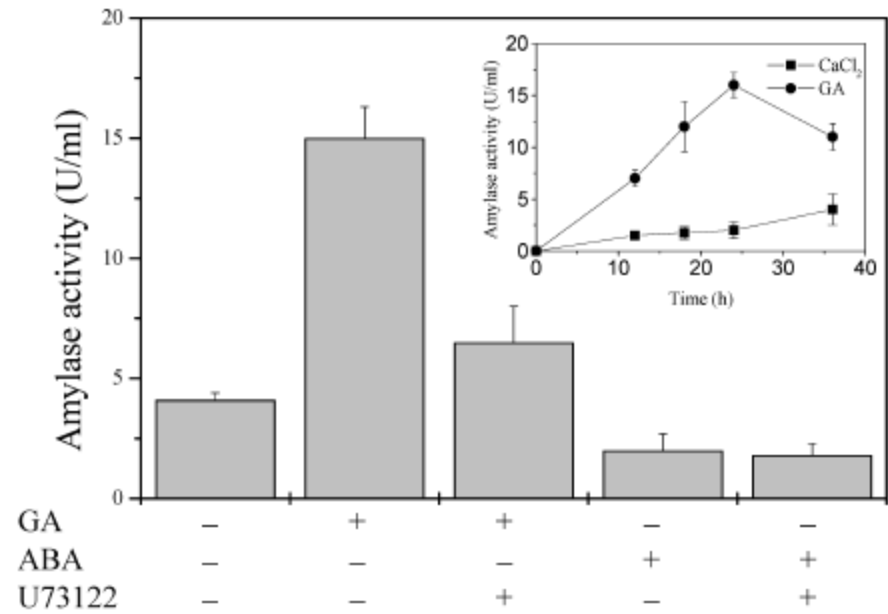
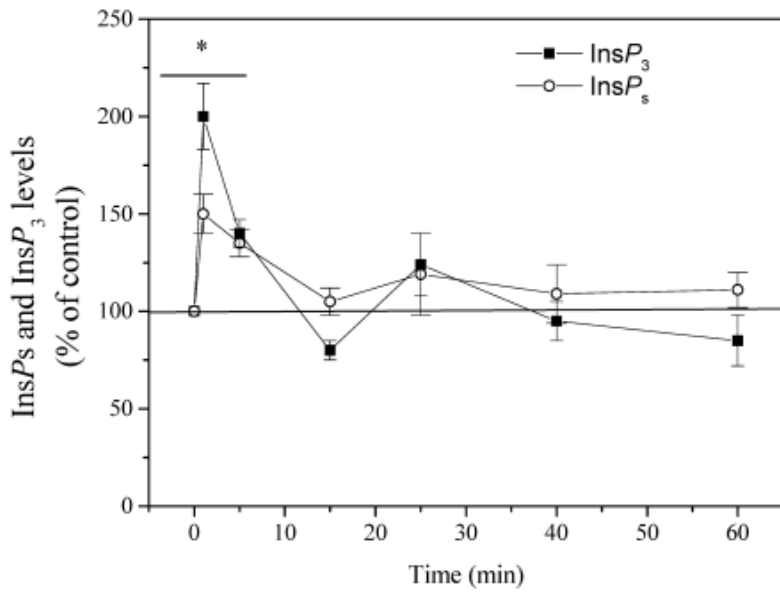
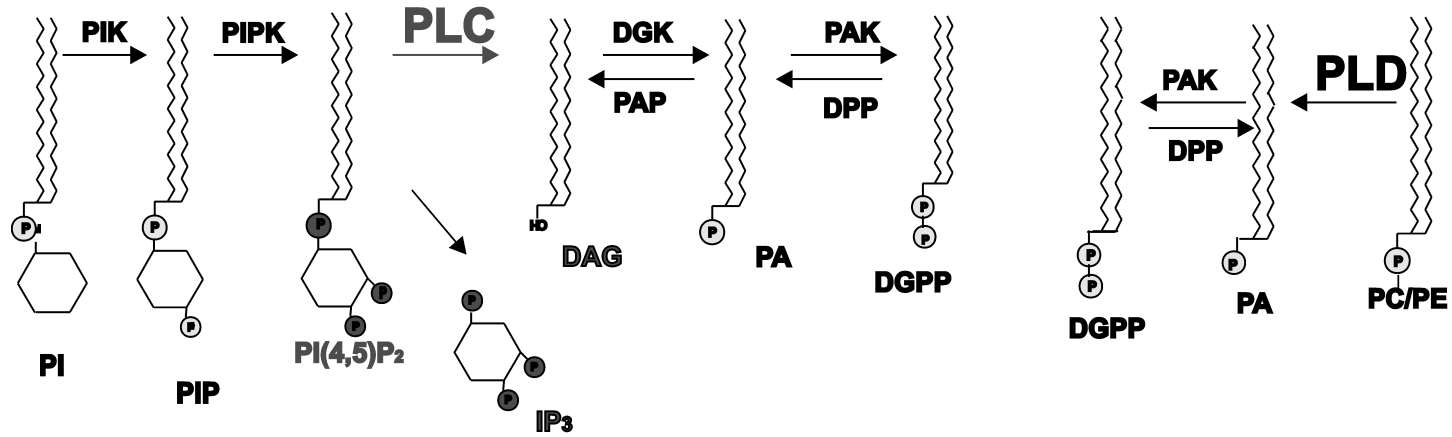
Objetivo: estudiar la participación de fosfolipasas y lípidos señales en el proceso de germinación.



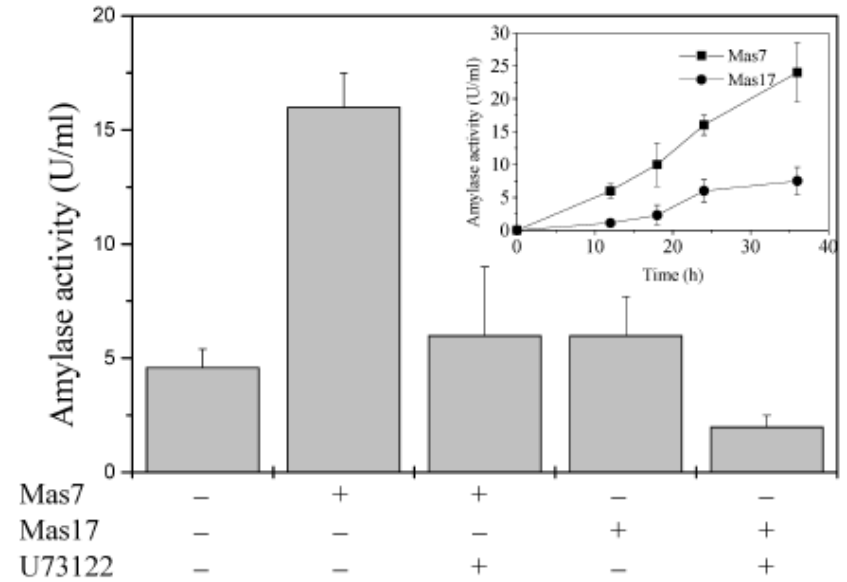
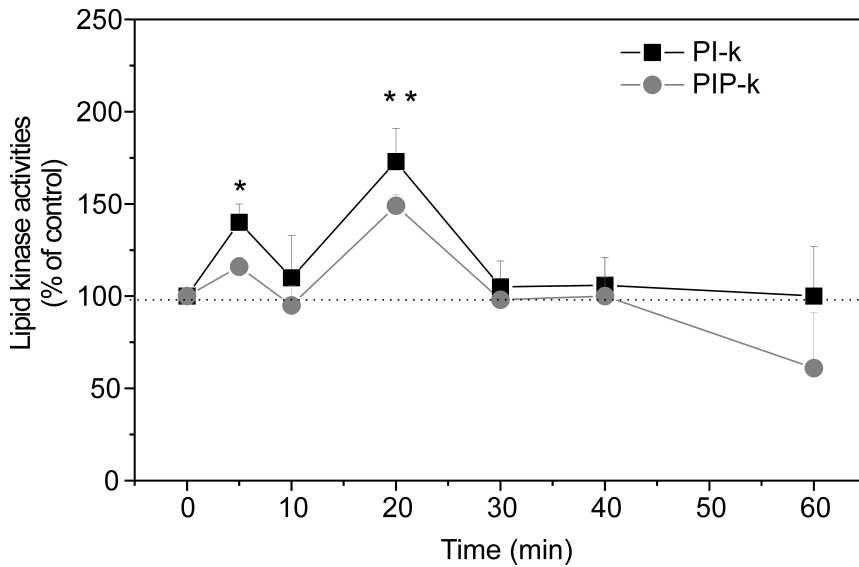
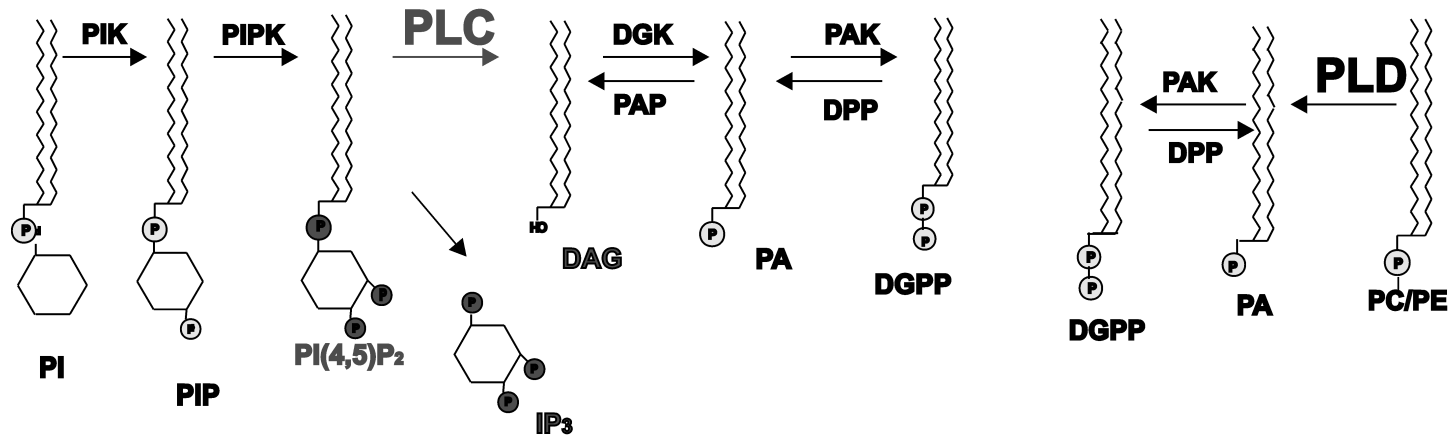
# SISTEMA EXPERIMENTAL



**Participación del ciclo del  
inositol fosfato  
en la señal de GA**



Villasuso y col., 2003 Plant Growth Regulation



## Gibberellin signaling

Paul C Bethke\* and Russell L Jones

Recent findings provide insights into the gibberellin signaling system in plants. Genes for gibberellin biosynthetic enzymes have been cloned, and an emerging theme is that gibberellin biosynthesis is negatively regulated by gibberellin responses. Mutants defective in gibberellin signaling have been analyzed, and an important finding is that gibberellin represses growth inhibition. The list of intracellular gibberellin signal-transduction elements has been expanded to include G-proteins and protein kinases.

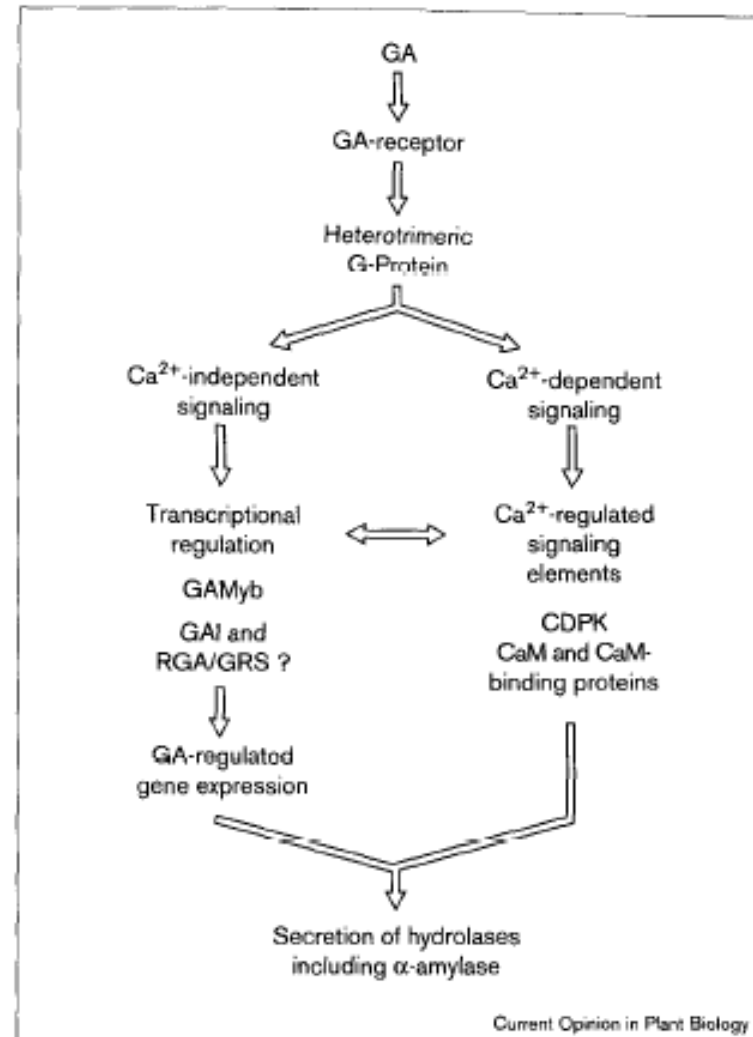
### Addresses

111 Koshland Hall, Department of Plant and Microbial Biology,  
University of California, Berkeley, CA 94720, USA  
\*e-mail: pcbethke@nature.berkeley.edu

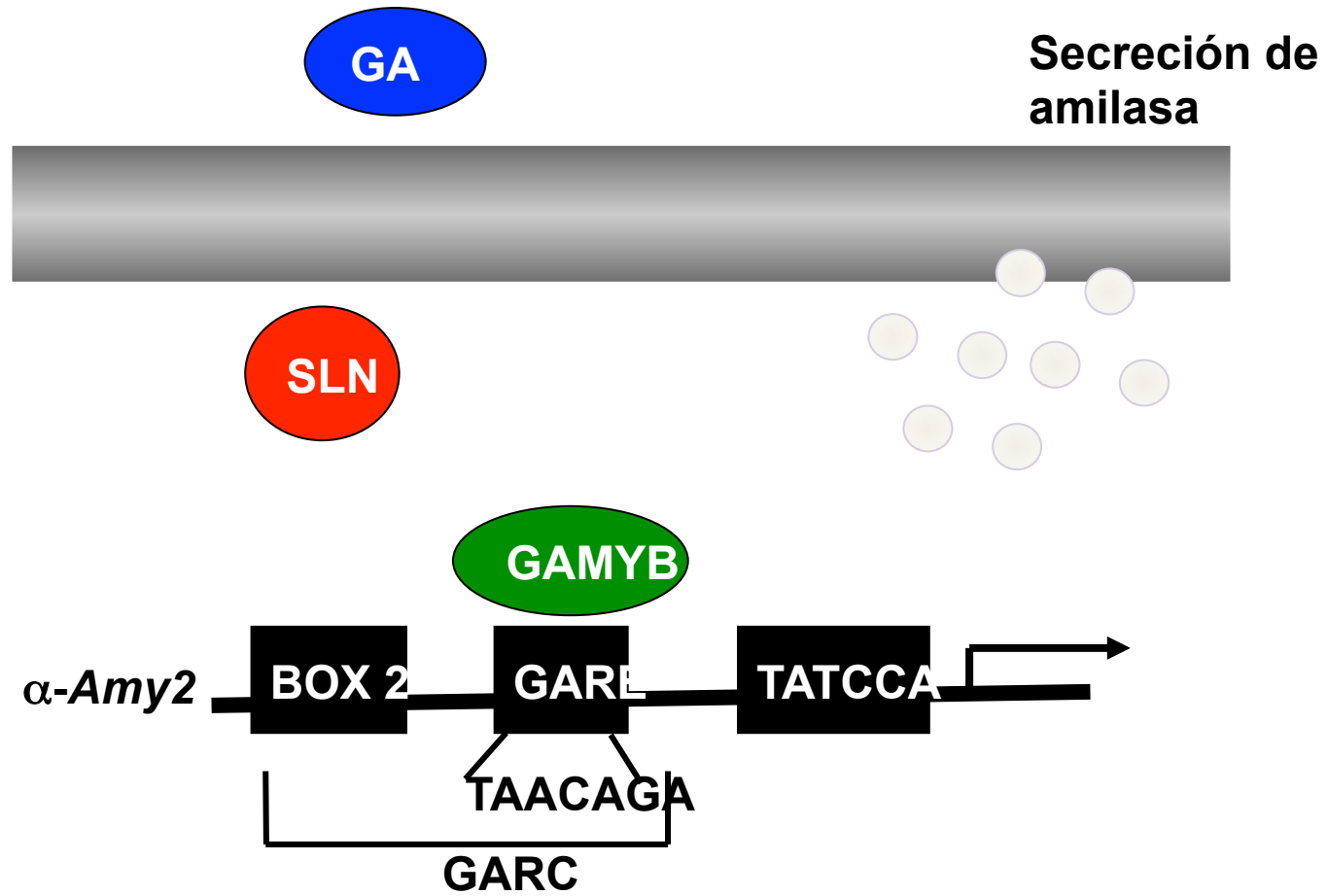
**Current Opinion in Plant Biology** 1998, 1:440-446

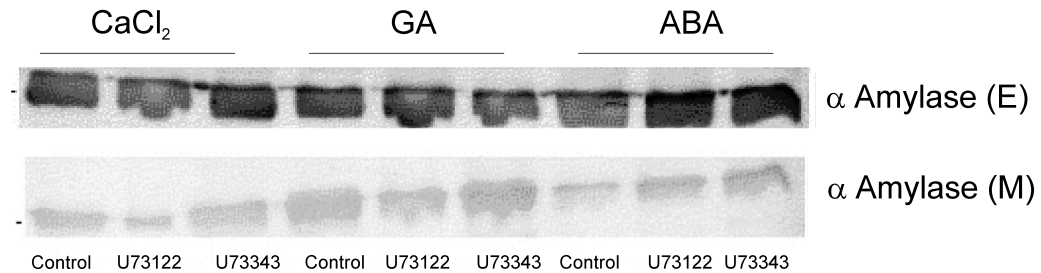
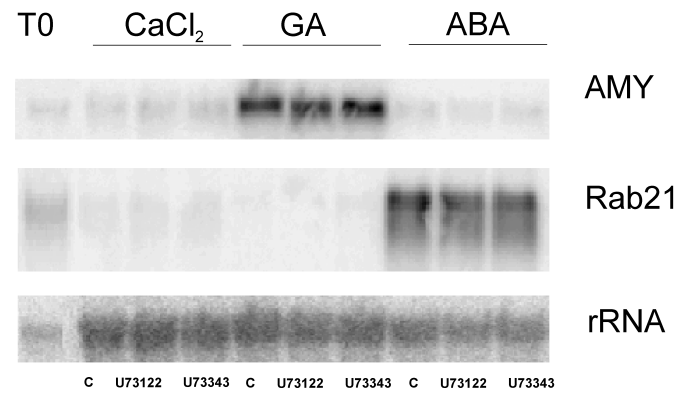
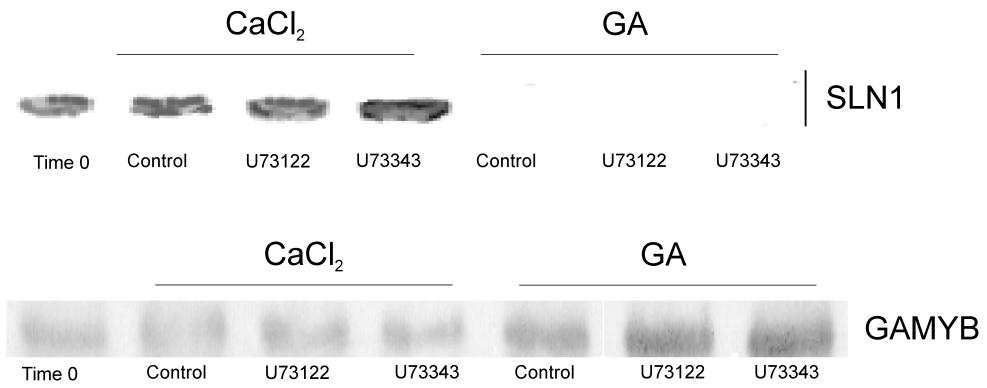
<http://biomednet.com/elecreff/1369526600100440>

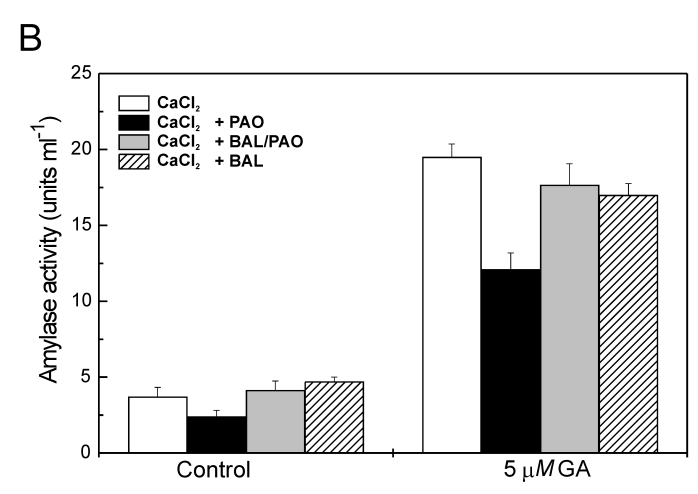
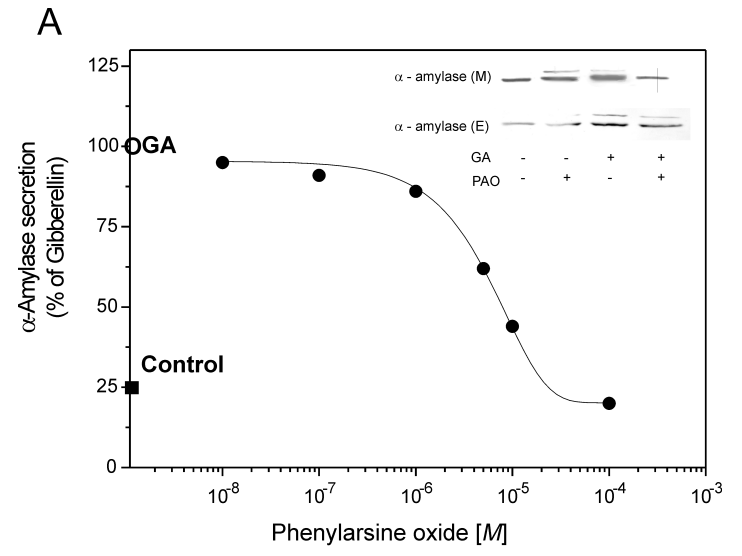
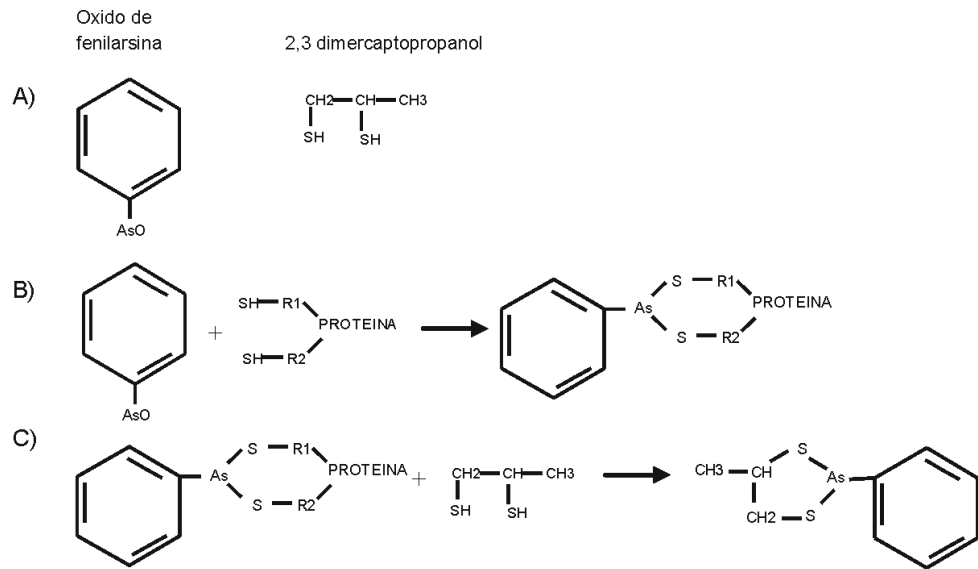
© Current Biology Ltd ISSN 1369-5266



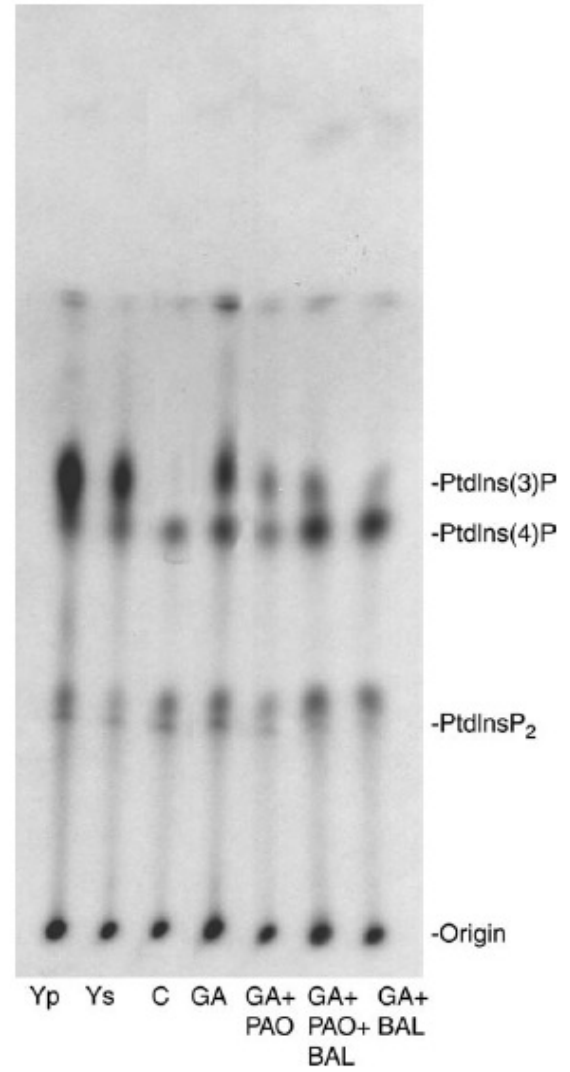
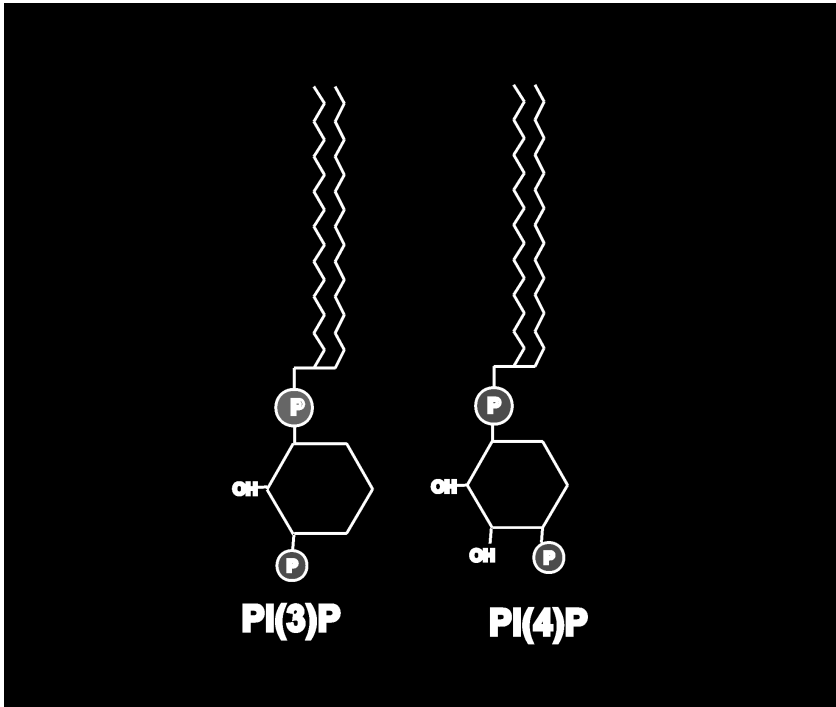
# Señal de GA independiente de Ca<sup>2+</sup>



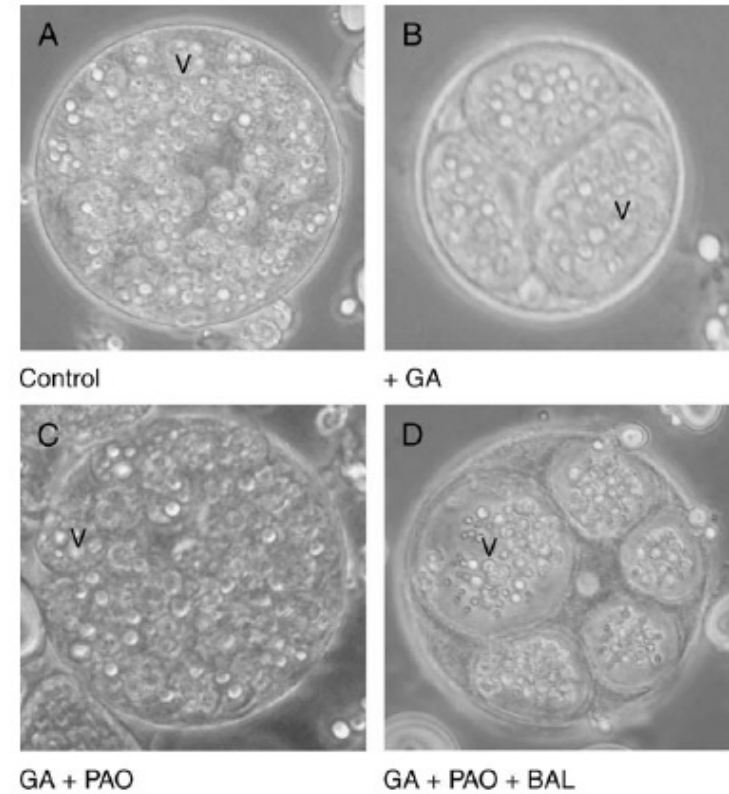
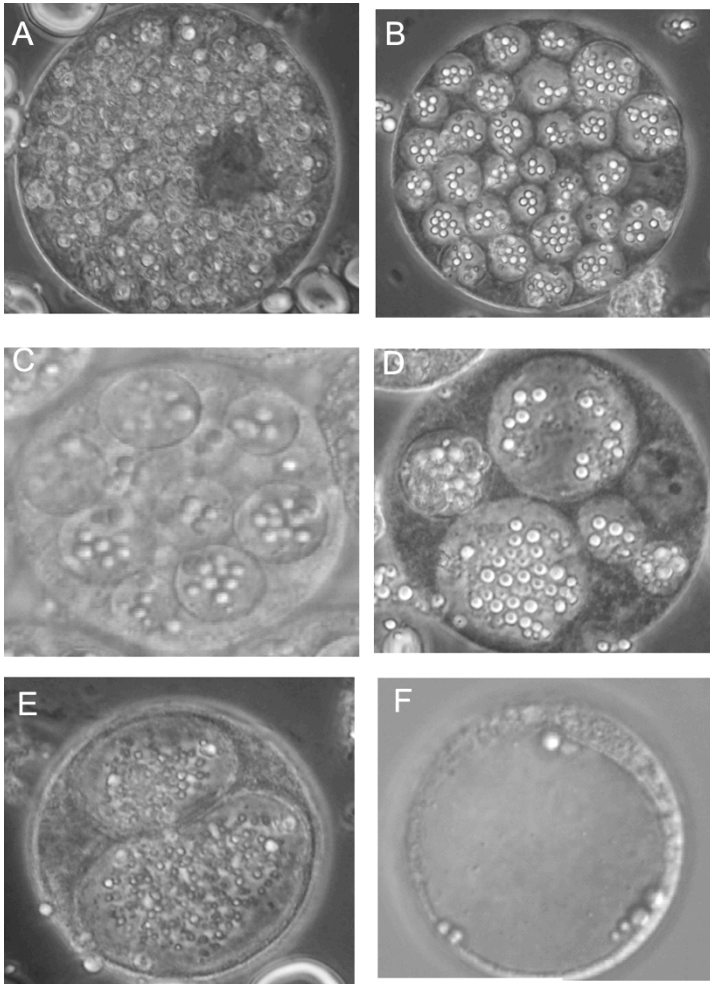








Villasuso y col., 2008 *Physiologia Plantarum*



# **Participación de fosfolípidos en la señal de ABA**

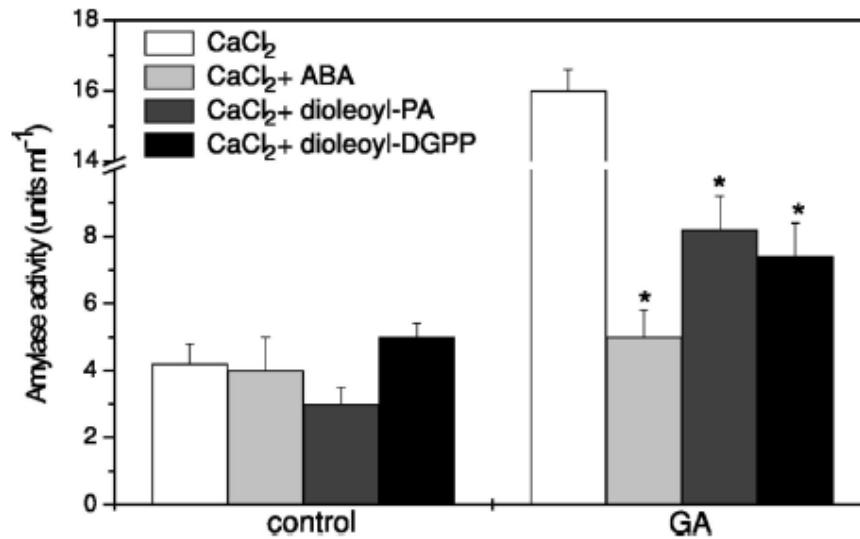
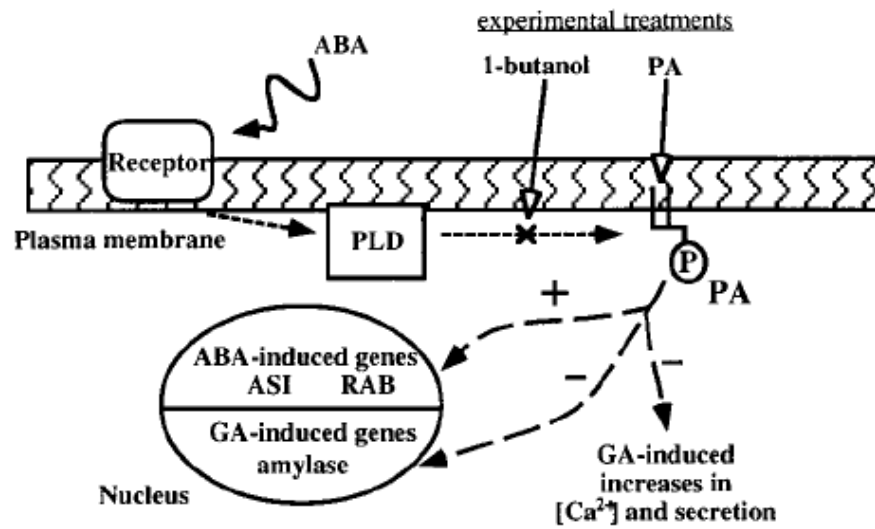
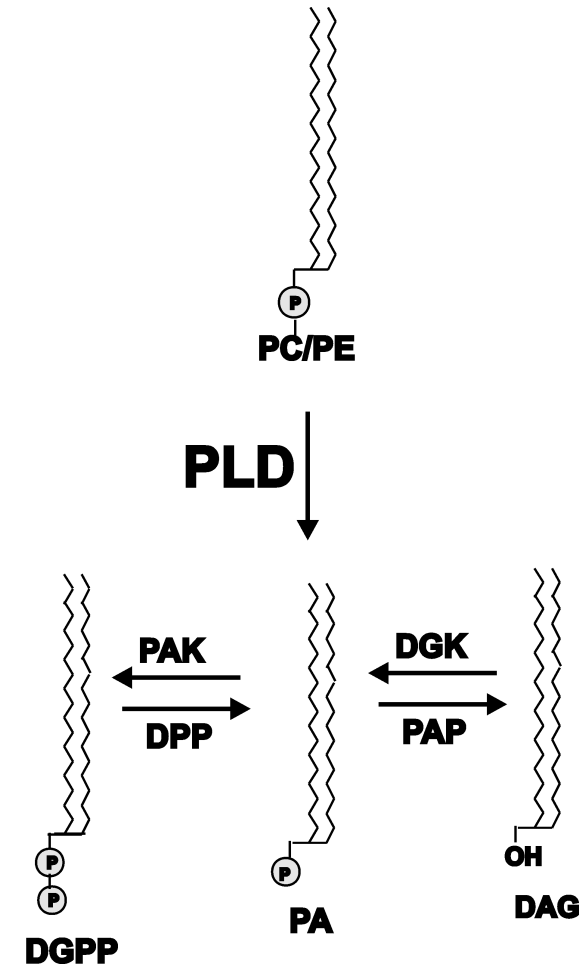


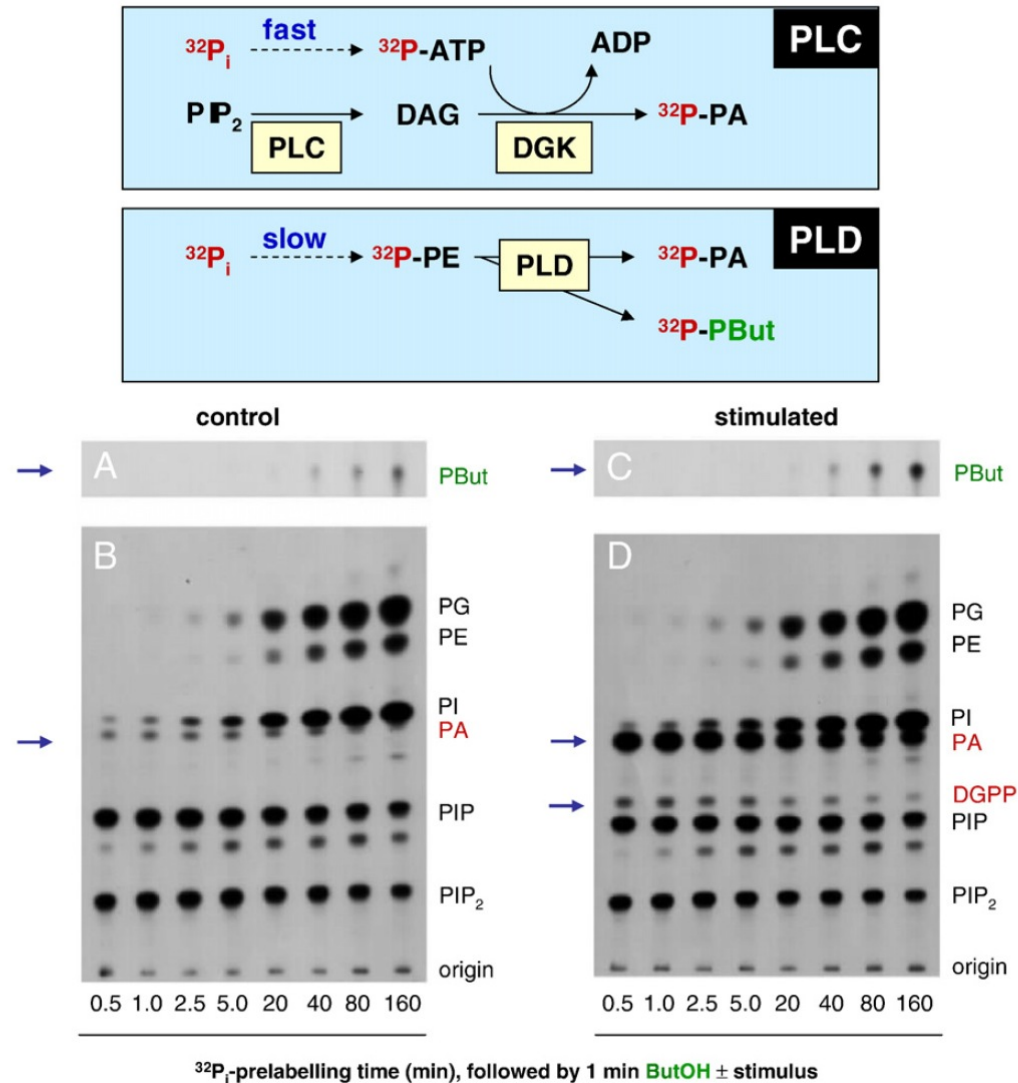
Figure 1

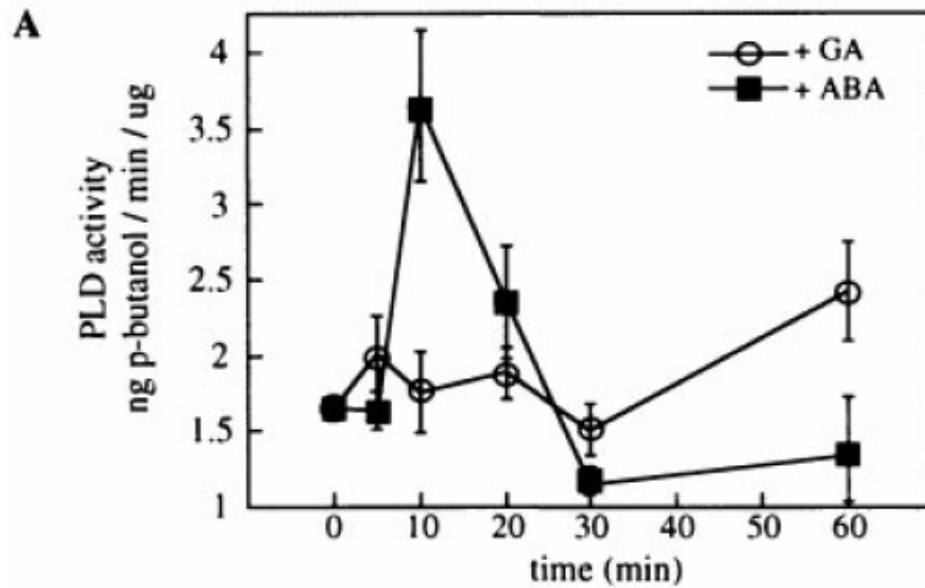
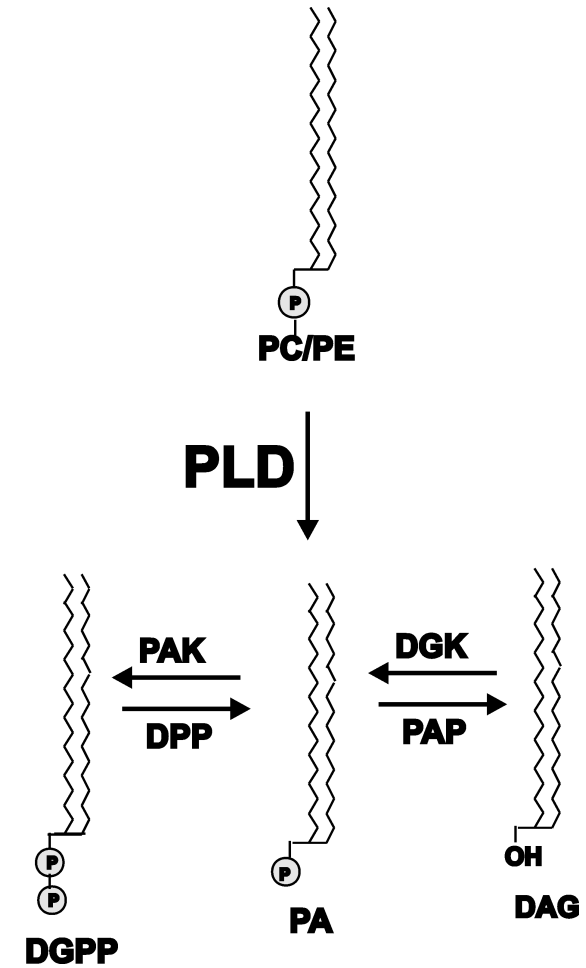
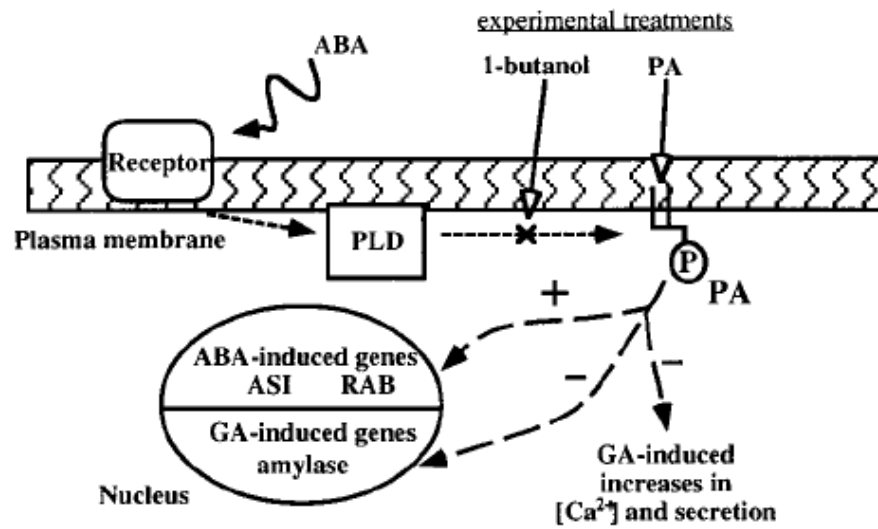


**¿Cómo se distingue el PA que proviene de PLD de aquel producido por DGK?**

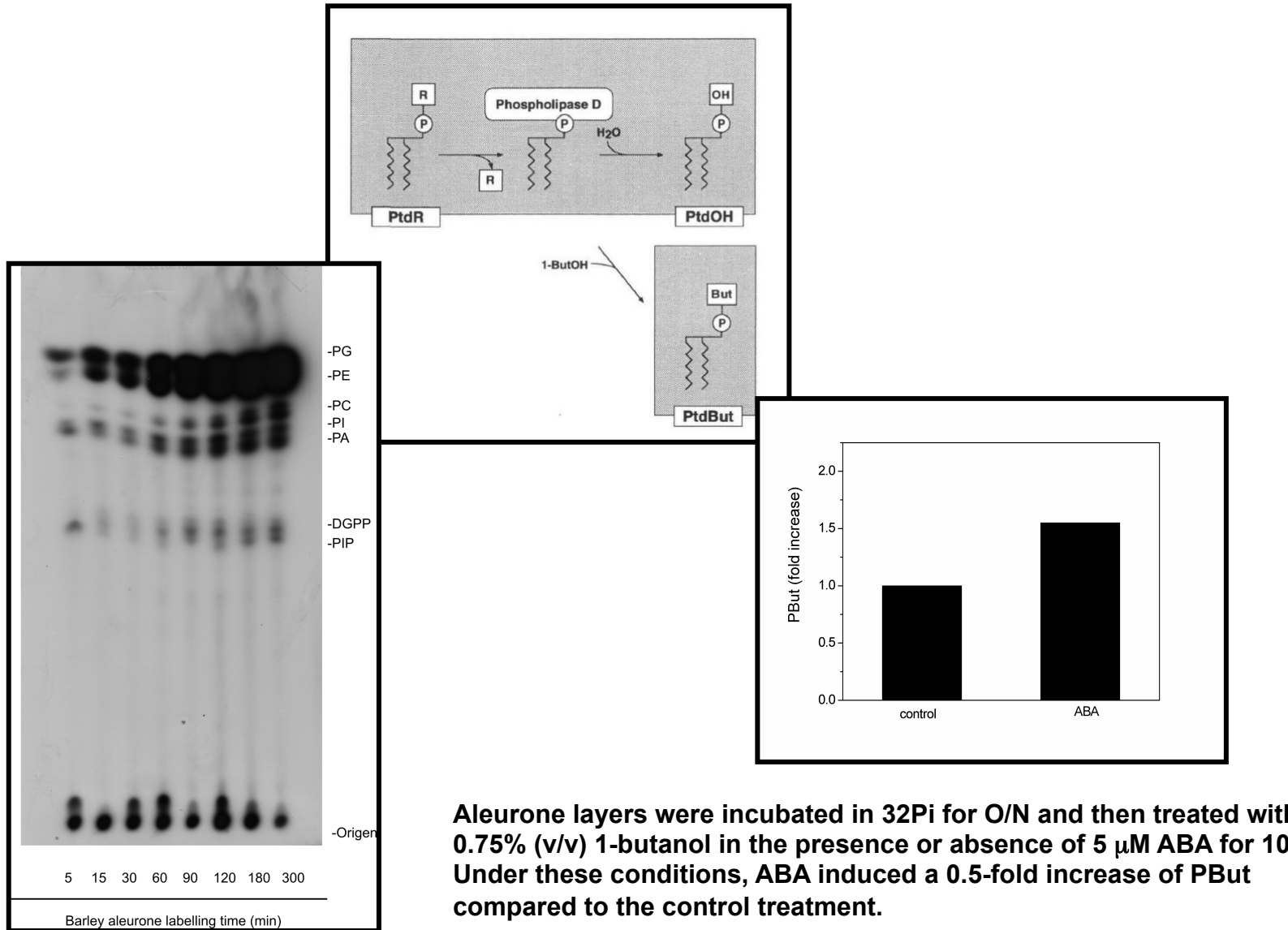
- **Manipulación genética: ablación o sobre-expresión de PLD.**
- **Marcaje diferencial: se mide el PA radiactivo que se forma a tiempo corto o largo.**
- **Tratamiento farmacológico: suprime la formación de PA proveniente de PLD por usar alcoholes como 1-butanol mediante la reacción de transfosfatidilación.**

# Estrategia de marcación diferencial con $^{32}\text{P}$

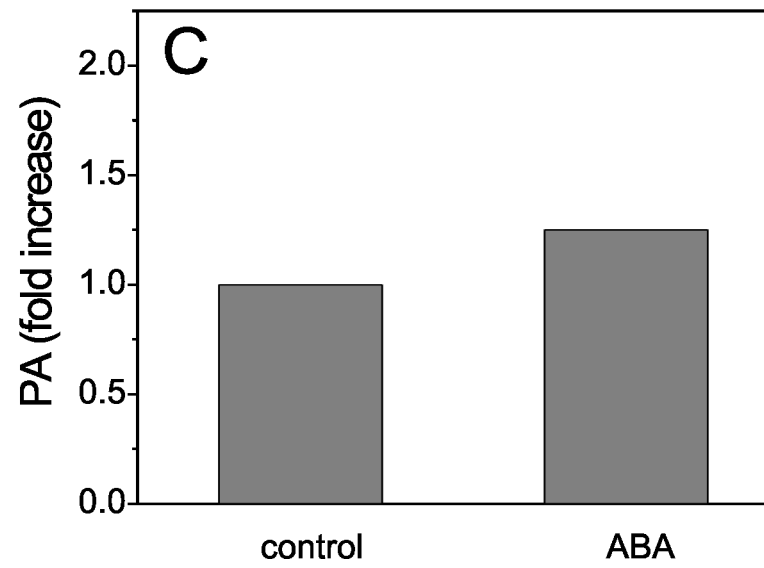
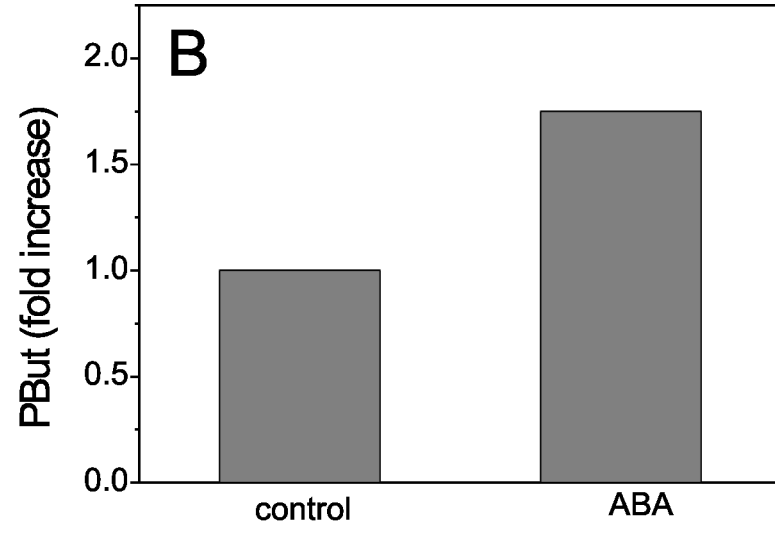
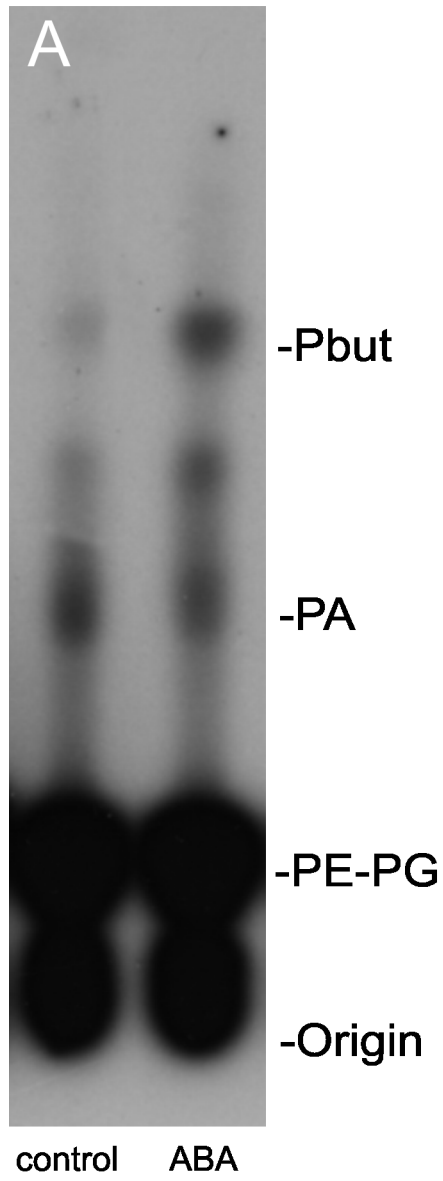




# PLD is involved in the increase of PA

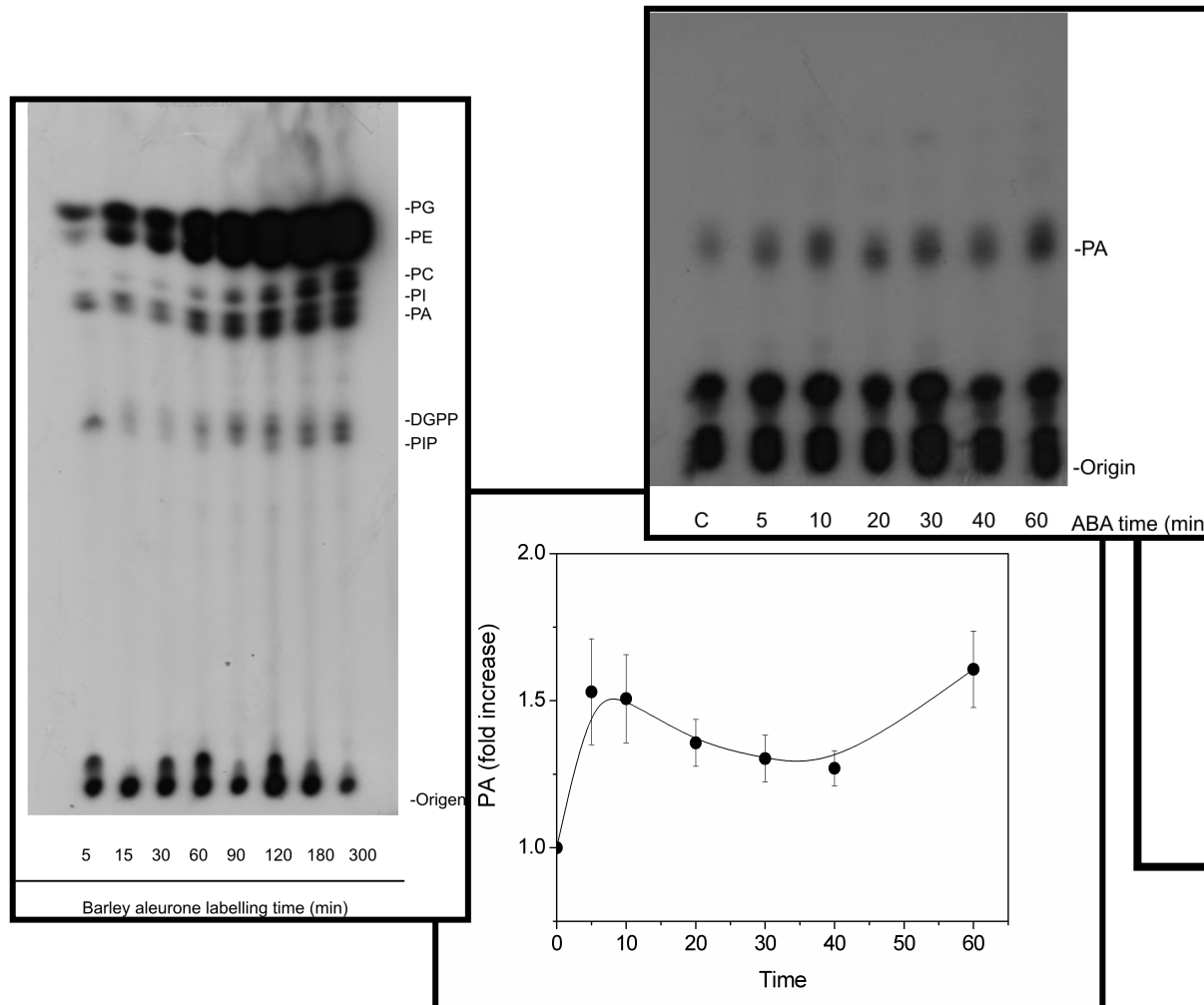






# ABA treatment induces the increase of PA in barley aleurone

To investigate “in vivo” phospholipid signaling responses in barley, we first studied the radiolabeling kinetics of  $^{32}\text{P}$ i in isolated barley layers.



To examine whether ABA induces PA signalling, aleurone layers were incubated O/N with  $^{32}\text{P}$ i and then treated with ABA for different times. Lipids were analyzed by ethyl acetate TLC

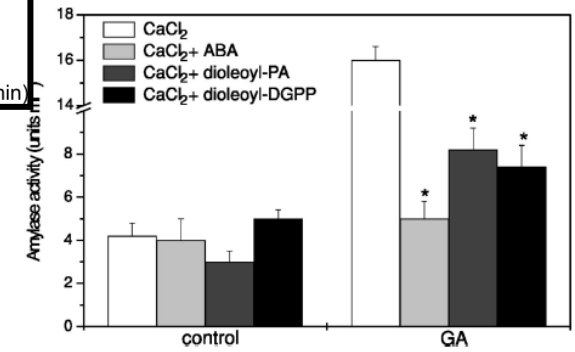
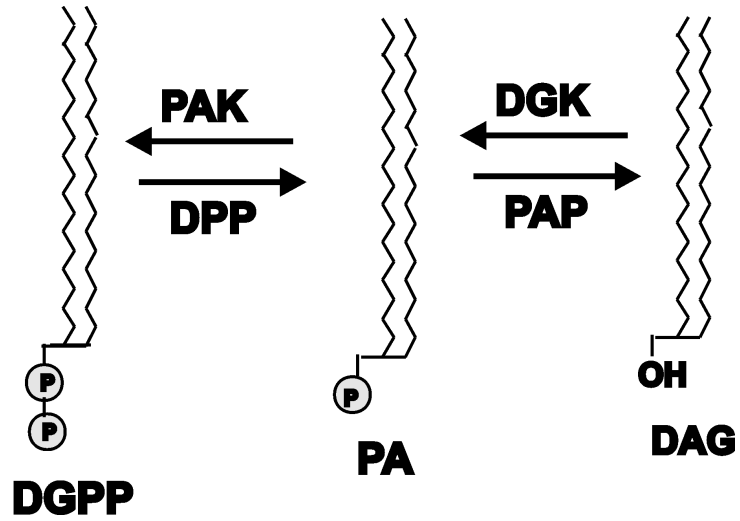
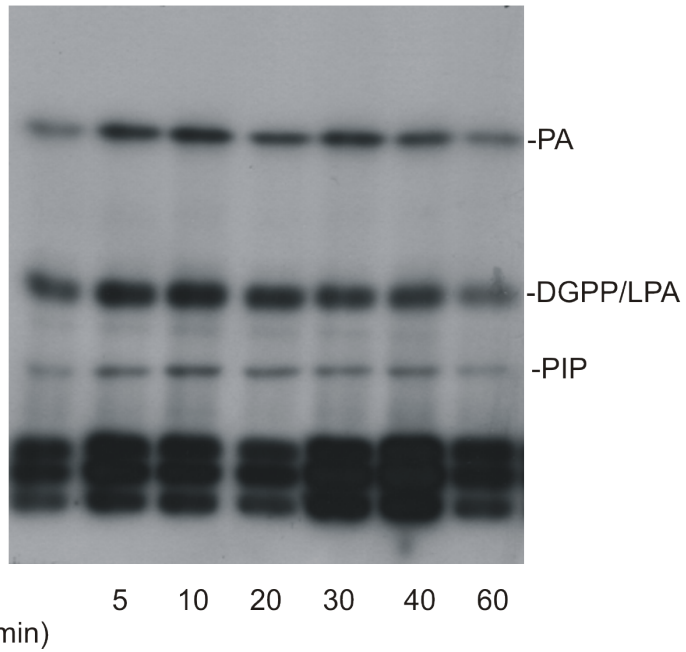


Figure 1

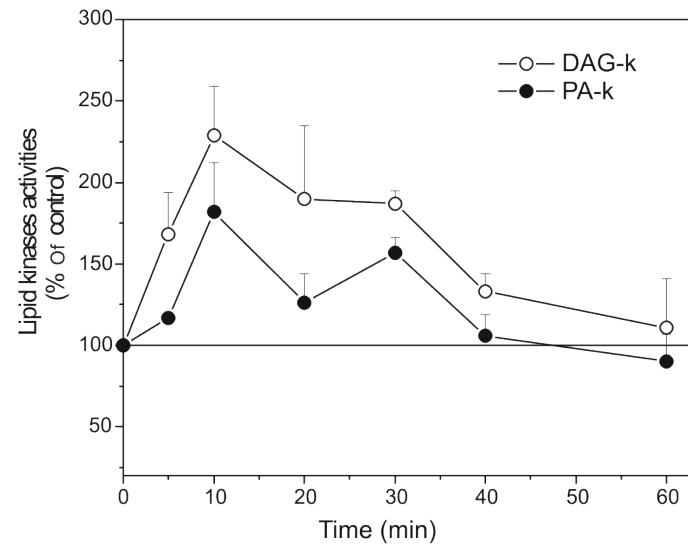




A



B



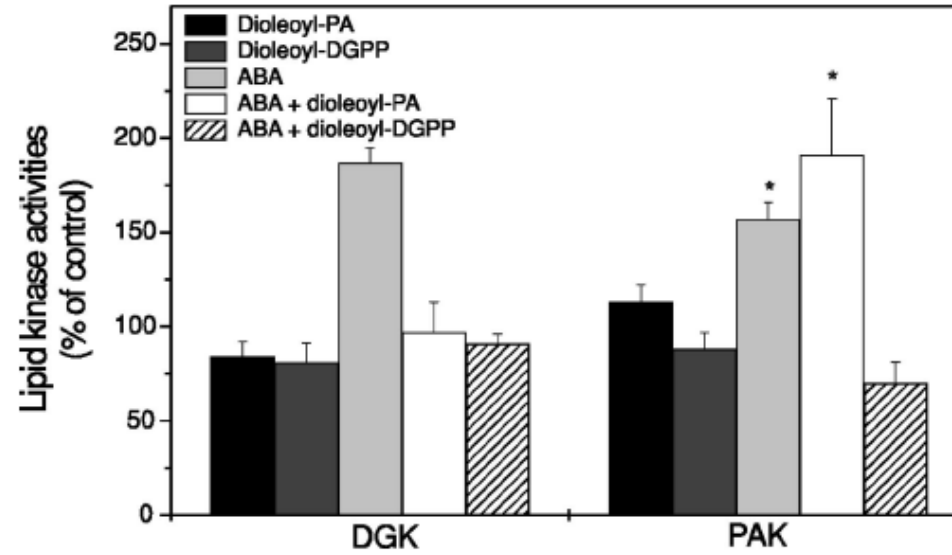
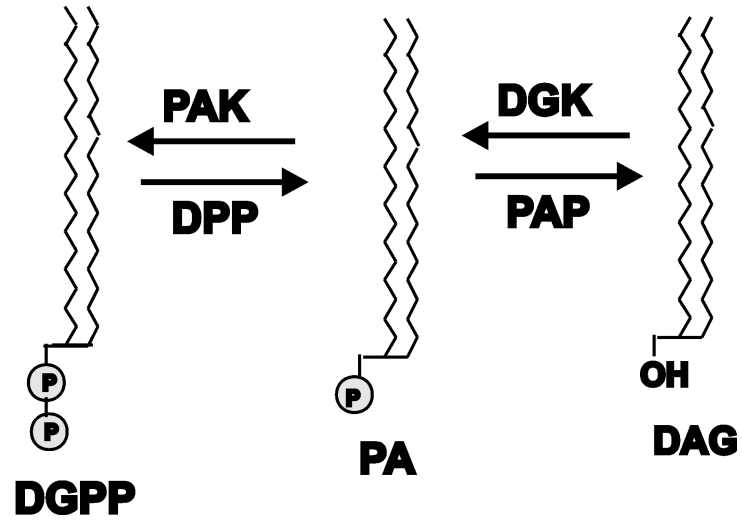


Figure 4

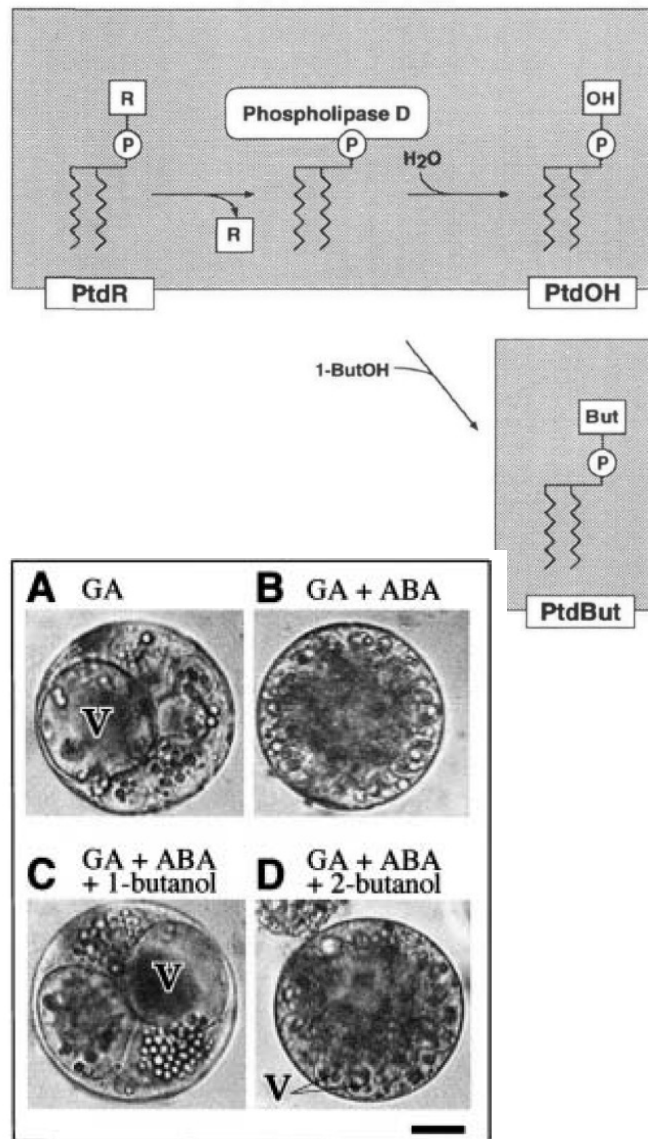


Fig.3. Morphology of aleurone protoplasts treated with (A) GA (B) GA + ABA (C) GA + ABA + 1-butanol (D) GA + ABA + 2-butanol. The 1-butanol blocks the antagonistic effect of ABA on GA-stimulated vacuole development whereas 2-butanol is ineffective. GA 5  $\mu$ M, ABA 50  $\mu$ M, 1 and 2-butanol, 0.1% (v/v). v, vacuole. Scale bar = 10  $\mu$ m.

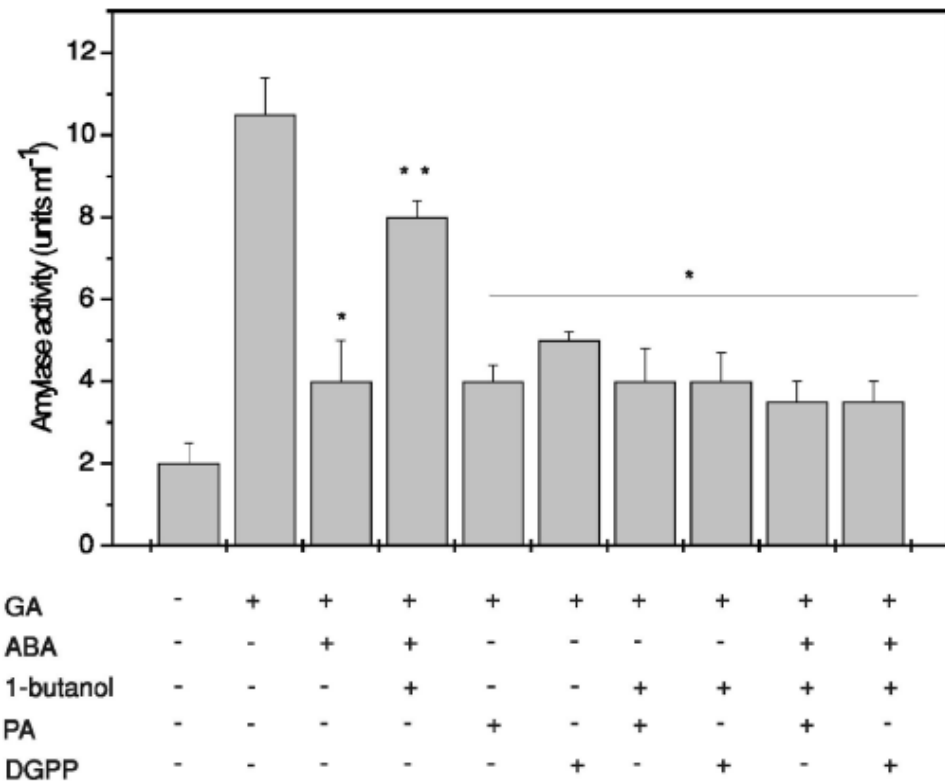
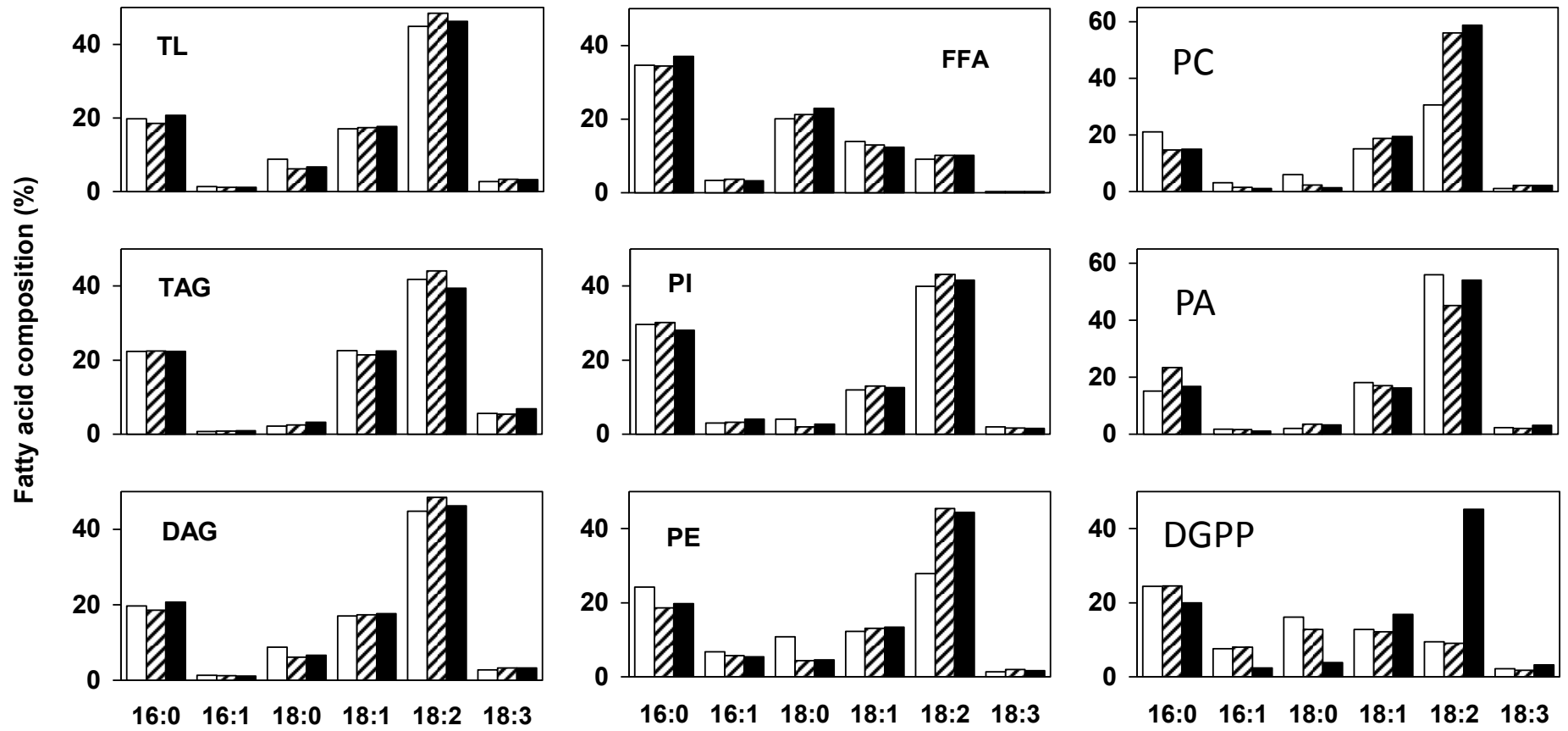


Figure 5





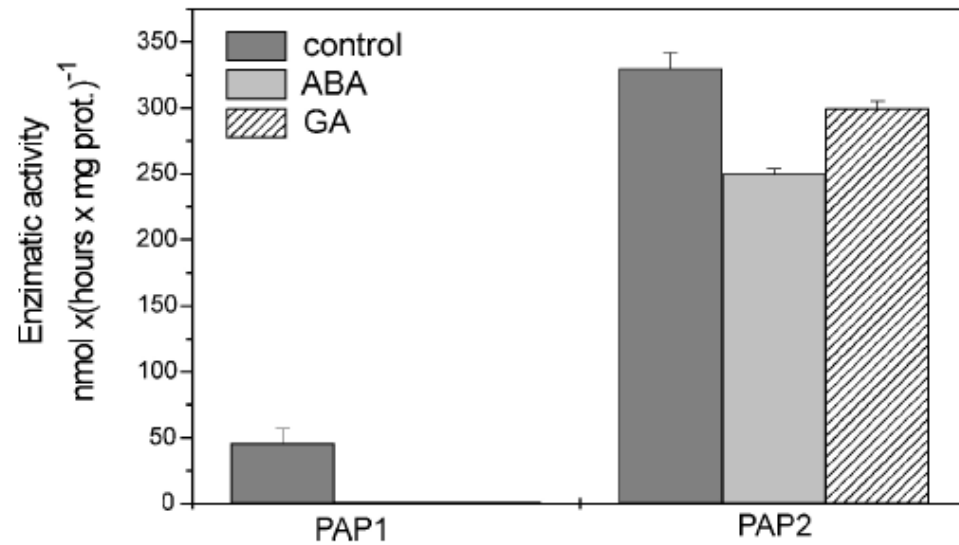
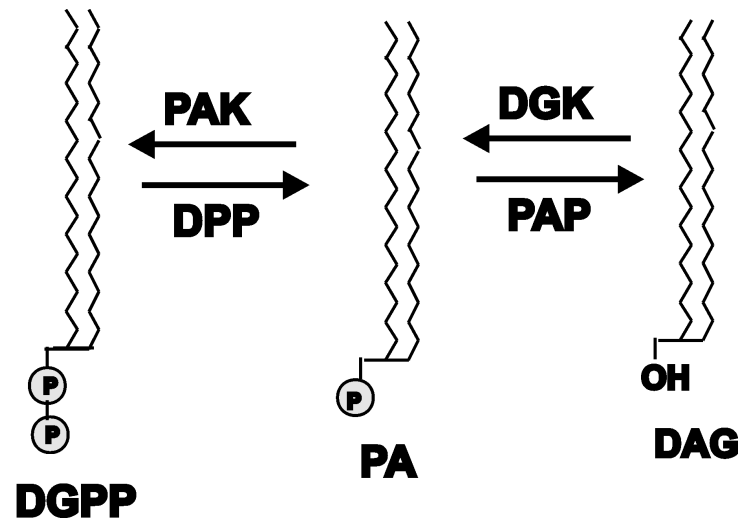
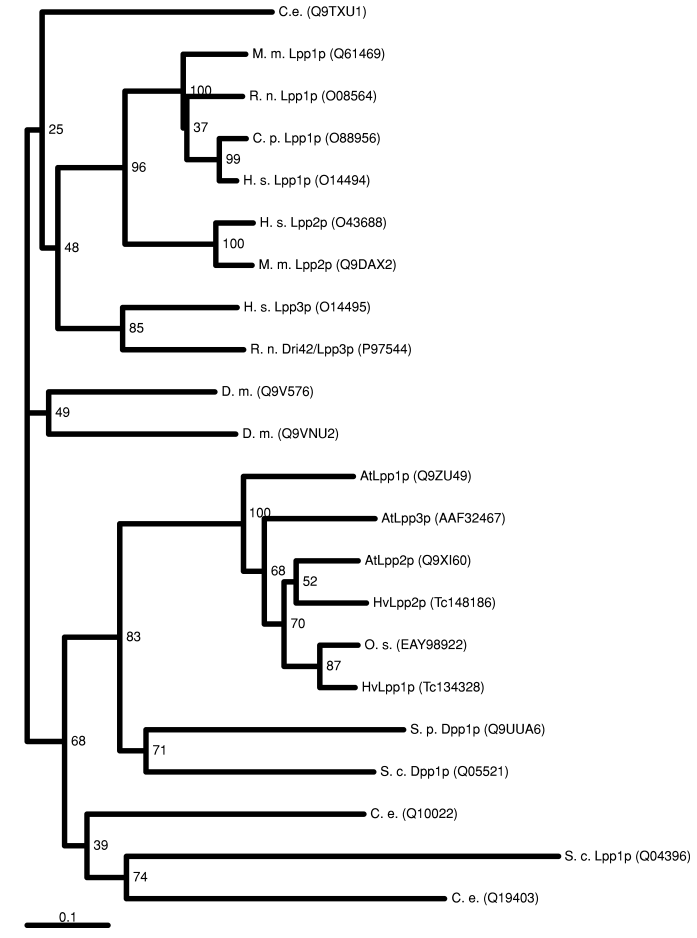
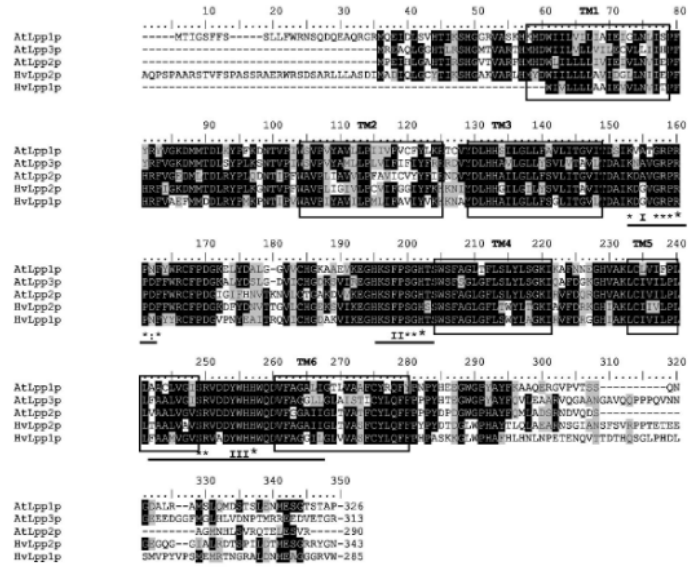


Figure 6



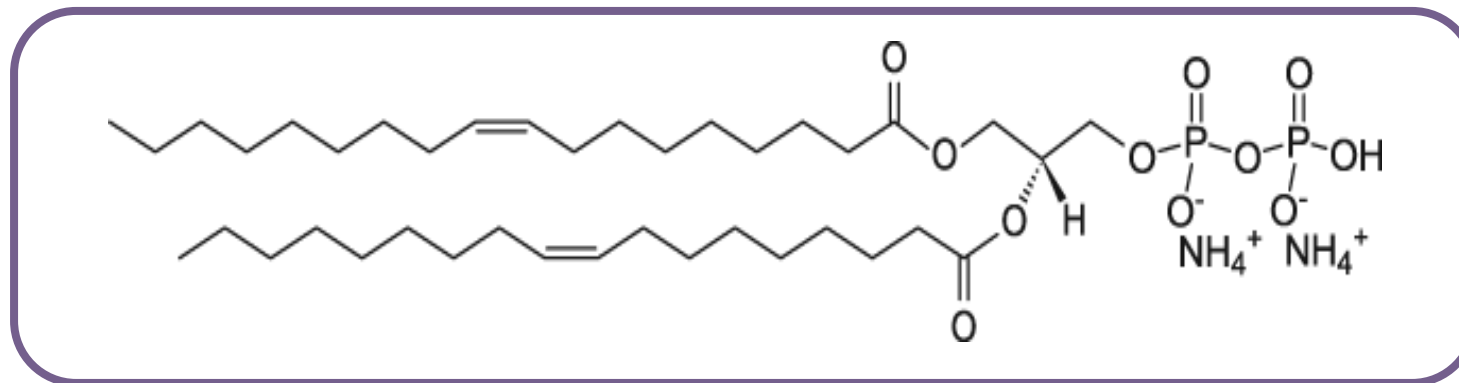
Table I. Amino acid similarity and identity of barley and Arabidopsis  
 For each pairwise comparison, similarity values are followed by identity values in parentheses.

	HvLpp1p (TC134328)		HvLpp2p (TC148186)	
	I/P	Expect values	I/P	Expect values
AtLpp1p (Q9ZU49)	55(73)	2 <sup>e-80</sup>	55(73)	1 <sup>e-97</sup>
AtLpp2p (Q9XI60)	70(80)	5 <sup>e-76</sup>	69(81)	2 <sup>e-102</sup>
AtLpp3p (AAF32467)	67(85)	5 <sup>e-75</sup>	63(80)	1 <sup>e-99</sup>



# Diacilglicerol pirofosfato: estructura

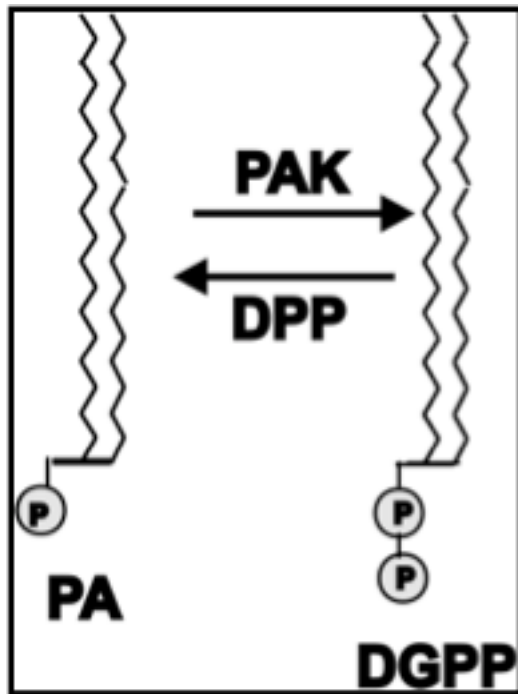
DGPP es un nuevo fosfolípido encontrado en las membranas biológicas con una estructura química relativamente simple dentro de la familia de los glicerofosfolípidos.



1993- Wissing and Behrbohm : espectrometria de masa y NMR <sup>32</sup>P  
1996- Munnik et al. : formación in vivo en células marcadas con <sup>32</sup>P  
1996-2011: aprox. 60 paper, 90 % son realizados en plantas

# Diacilglicerol pirofosfato: metabolismo

DGPP es sintetizado a partir de ácido fosfatídico y ATP por la PA-k y desfosforilado a PA + Pi por una DGPP fosfatasa

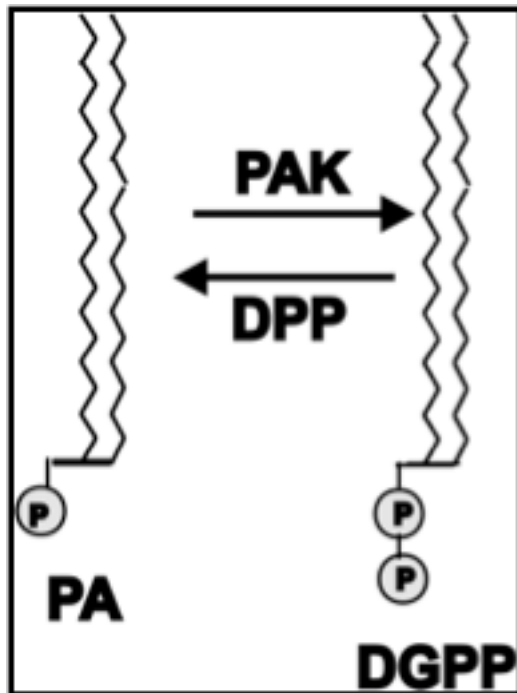


## PAK

- fracción de membrana enriquecida en m.p.
- membrana insoluble a detergente
- WM 39 kDa- EA 10  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{prot}^{-1}$
- ATP y GTP, pH óptimo 6,1
- estimulada por  $\text{Mg}^{2+}$  e inhibida por  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$
- No se ha identificado el gen

# Diacilglicerol pirofosfato: metabolismo

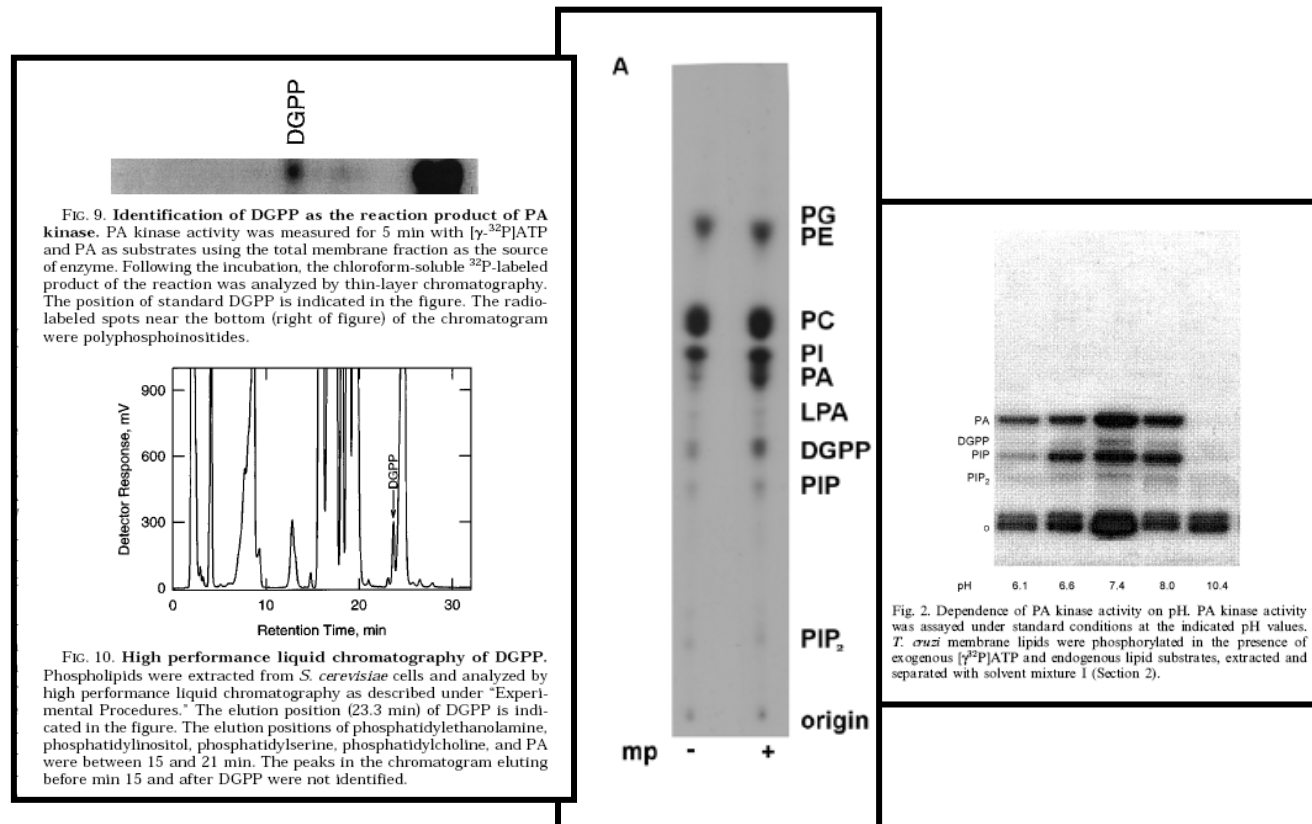
DGPP es sintetizado a partir de ácido fosfatídico y ATP por la PA-k y desfosforilado a PA + Pi por una DGPP fosfatasa



<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [12,31] [42]	<i>DPP1</i>	34 kDa	(Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , CDP-DAG)	Growth phase, inositol, zinc	Tonoplast
	<i>LPP1</i>		PA > DGPP > LPA (Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )		
<i>Escherichia coli</i> [43]	<i>pgpB</i>	28 kDa			
<b>Mammals</b>					
[44]	<i>PAP2</i>		DGPP > PA (LPA, SIP, CIP)		
[45]	<i>DPPL1</i>	± 29 kDa			Al
	<i>DPPL2</i>	± 31 kDa	DGPP > LPA, PA (NEM-sensitive)		Endo
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtLPP1</i>		DGPP > PA	UV, harpin, Mastoparan	Lc

# Diacilglicerol pirofosfato: identificación

DGPP fue identificado en plantas, levaduras y microorganismos, pero nunca en células de mamífero



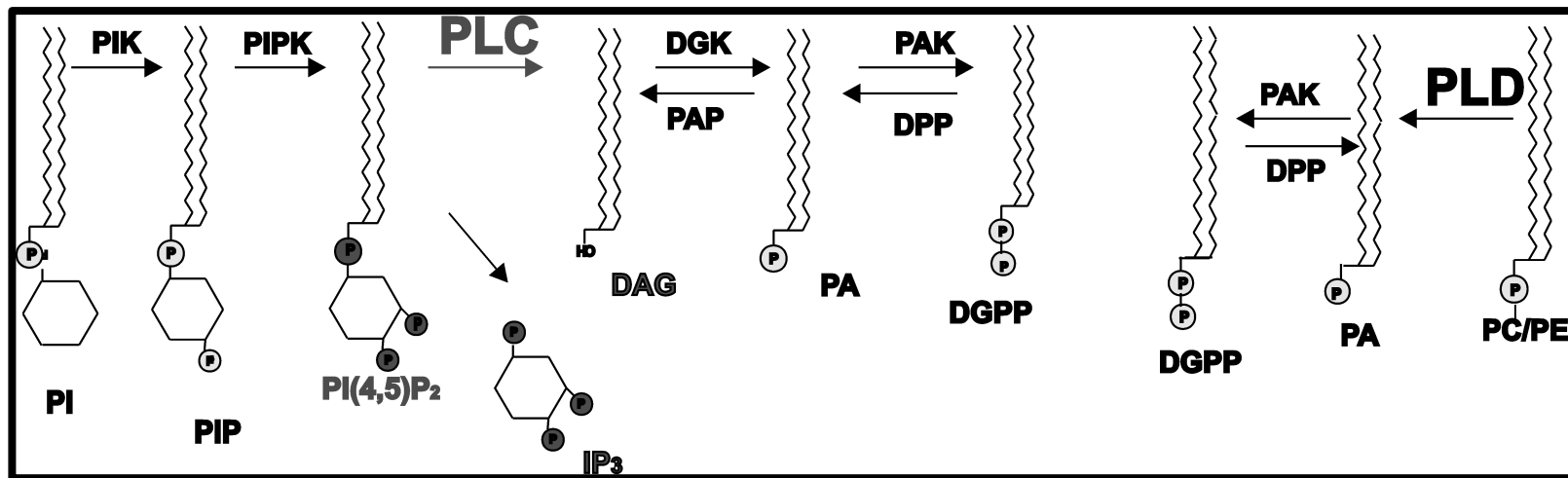
# Diacilglicerol pirofosfato: estrés

Su concentración es relativamente pequeña, alrededor del 0.1 % del total de fosfolípidos, 10 veces menos que PA y 200 veces menos que PC.

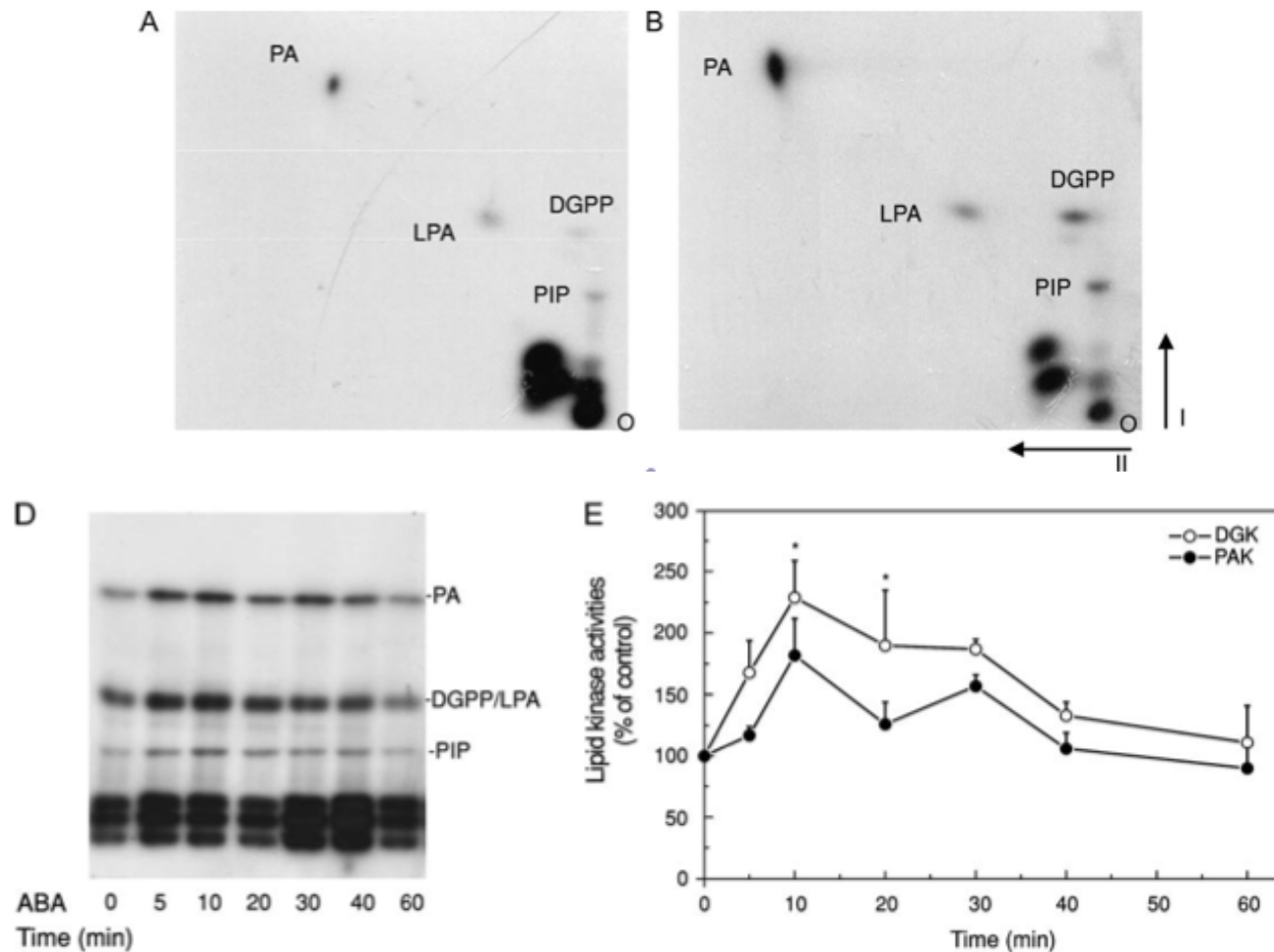
Table 2. DGPP formation in response to different stresses

Stress	Species	Reference
Hyperosmotic	<i>Chlamydomonas moewusii</i>	[30] [19]
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	[19]
	<i>Lycopersicon esculentum</i> suspension cells	[19]
	<i>Medicago sativa</i> suspension cells	[19]
	<i>Arabidopsis thaliana</i> suspension cells	[16]
Elicitors	<i>Lycopersicon esculentum</i> suspension cells	[21]
	<i>Nicotiana tabacum</i> suspension cells expressing the <i>Cladosporium fulvum</i> Cf-4 <sup>+</sup> resistance gene	[32]
Nod factors	<i>Vicia sativa</i> seedlings	[23]
	<i>Medicago sativa</i> suspension cells	[22]
Drought	<i>Craterostigma plantagineum</i>	[19]
ABA	<i>Arabidopsis thaliana</i> suspension cells	[17]
	<i>Arabidopsis thaliana</i> seeds	[18]
	<i>Hordeum vulgare</i> aleurone cells	[20]

Diacilglicerol pirofosfato: una forma de apagar la señal de PA o un lípido señal?



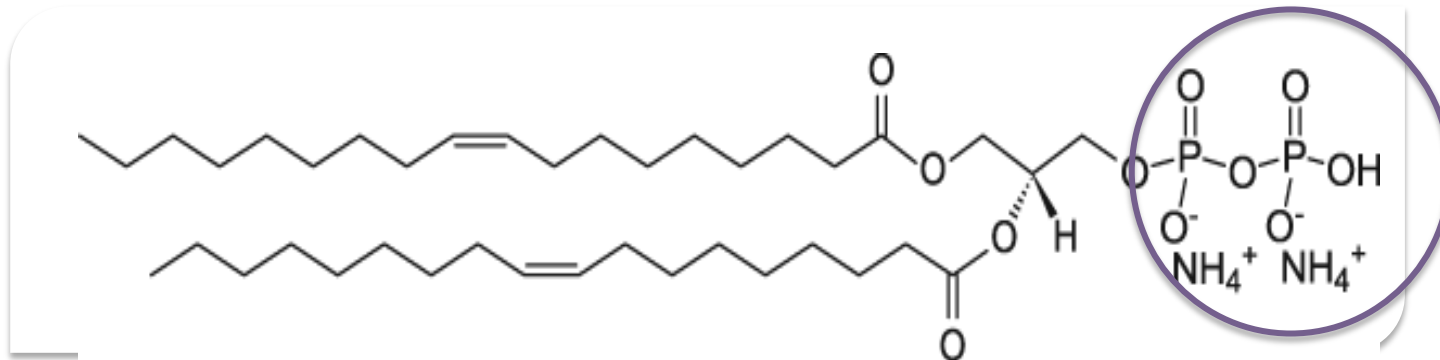
# Diacilglicerol pirofosfato: una forma de apagar la señal de PA o un lípido señal?



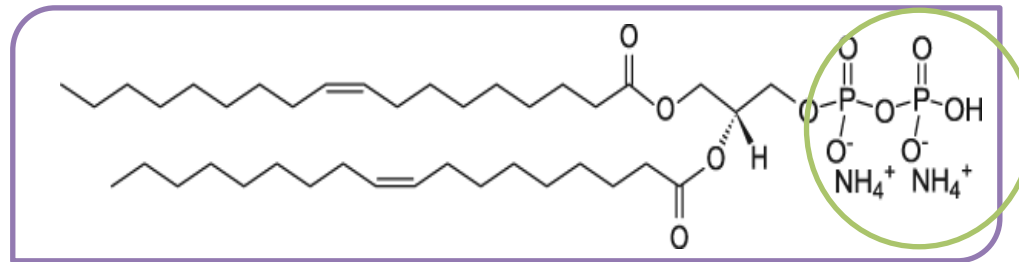


# Diacilglicerol pirofosfato: mecanismo de acción

DGPP es un fosfolípido aniónico con un grupo pirofosfato unido al esqueleto del diacilglicerol. Dependiendo del pH el grupo pirofosfato puede portar -2 a -3 cargas negativas, volviéndose una molécula altamente polar



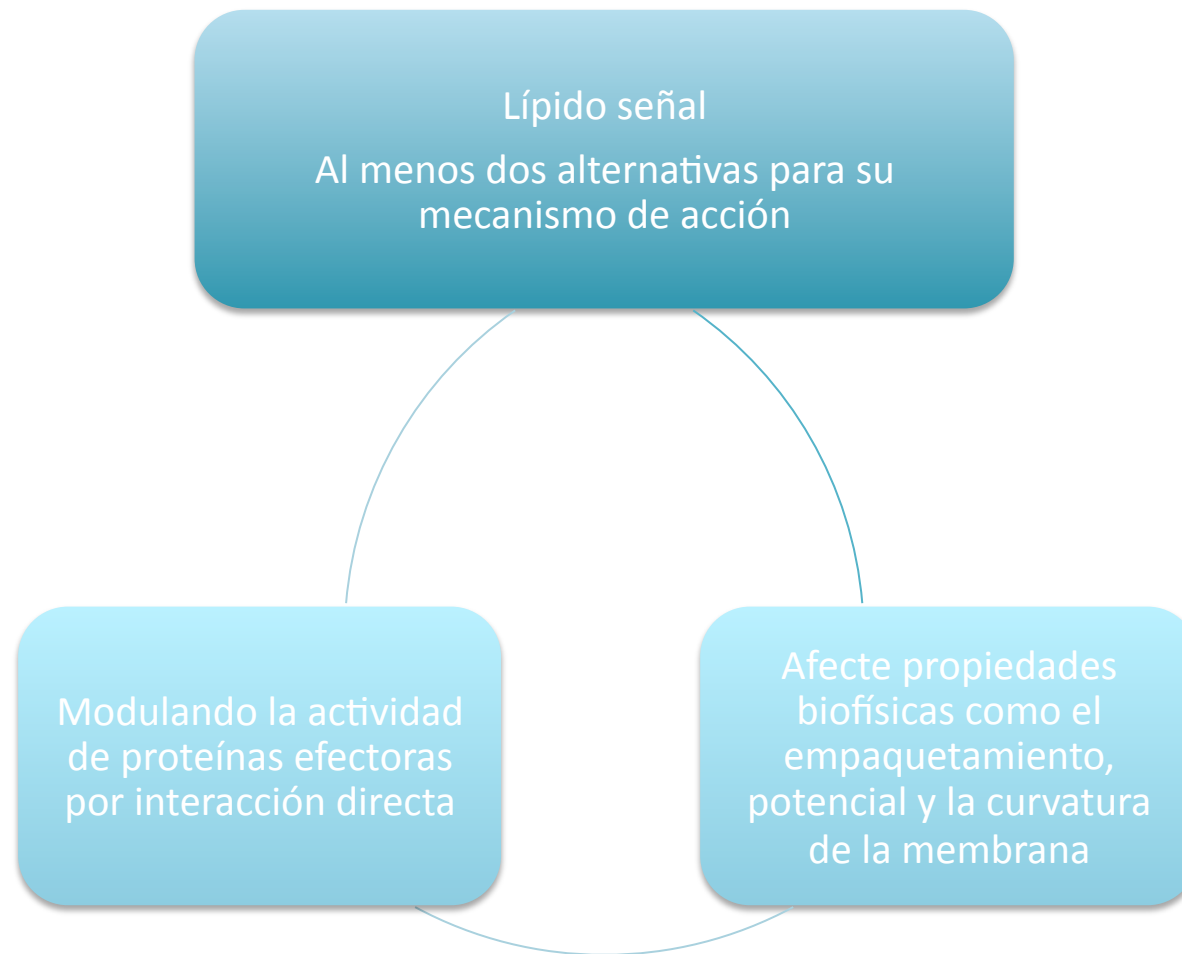
# Diacilglicerol pirofosfato: mecanismo de acción



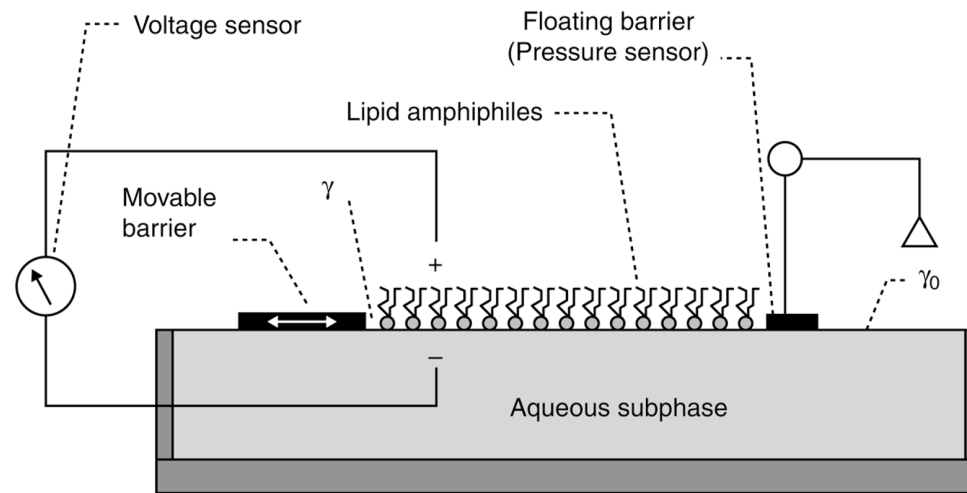
Interacción electrostática  
con proteínas

Interacción con cationes  
divalentes

# Diacilglicerol pirofosfato: mecanismo de acción

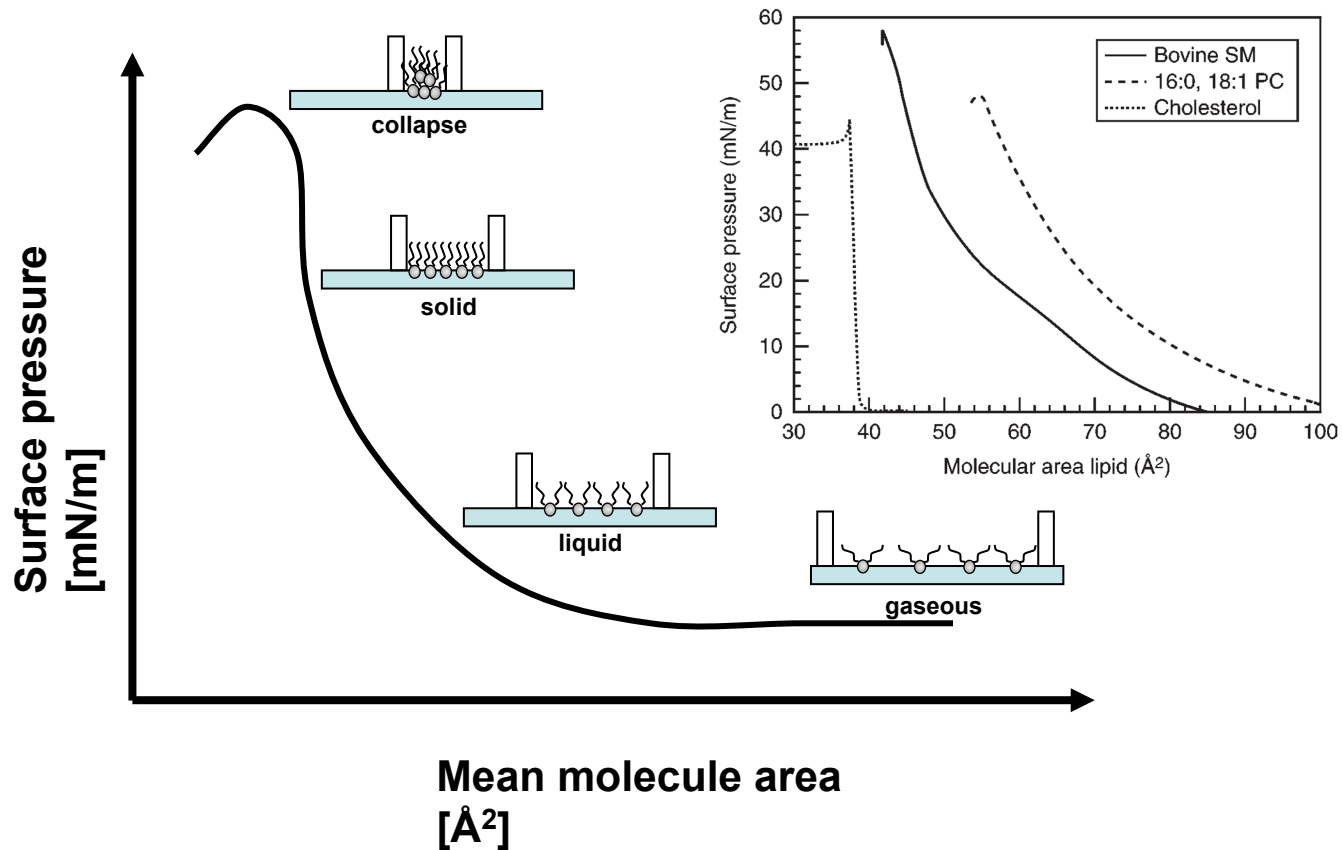


# Diacilglicerol pirofosfato: Langmuir film



Langmuir-type surface balance for determining the surface pressure and surface potential as a function of average cross-sectional molecular area.  $\gamma$  is the surface tension of surface occupied by lipid amphiphile and  $\gamma_0$  is the surface tension of clean aqueous subphase.

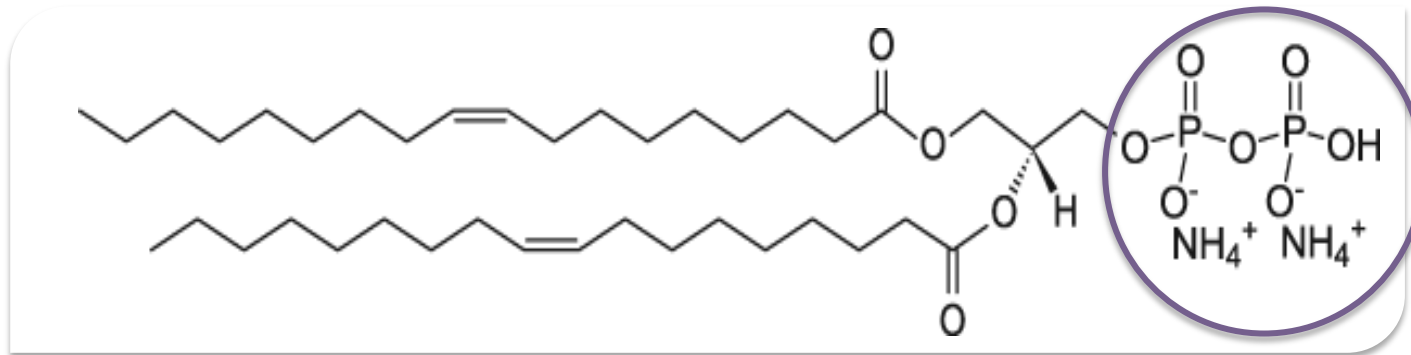
# Diacilglicerol pirofosfato: Langmuir film



# Diacilglicerol pirofosfato: mecanismo de acción

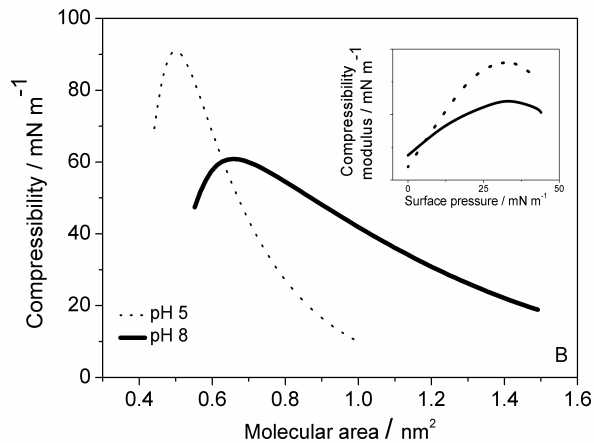
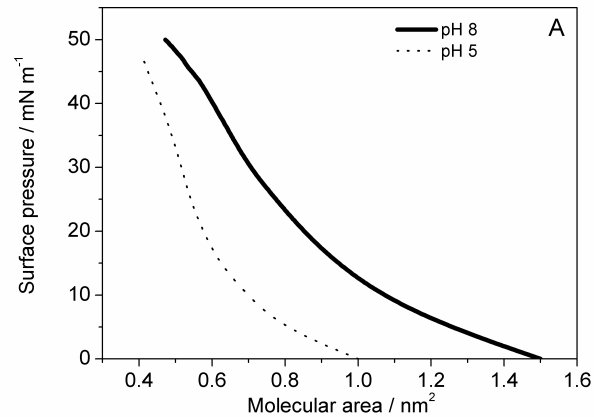
DGPP es un fosfolípido aniónico con un grupo pirofosfato unido al esqueleto del diacilglicerol. Dependiendo del pH el grupo pirofosfato puede portar -2 a -3 cargas negativas, volviéndose una molécula altamente polar.

pKas del pirofosfato: pKa1= 0.91 pKa2= 2.10, pKa3= 6.70, pKa4= 9.32



Objetivo: analizar el efecto de la carga sobre el empaquetamiento molecular

# Compression isotherms for monolayers of diacylglycerol pyrophosphate on subphases at the indicated pHs.



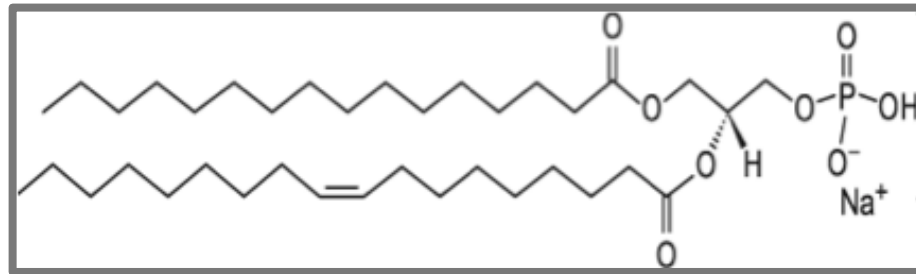
- DGPP forms liquid-expanded monolayers with no detectable pressure-area reorganization during the compression.

- The lateral pressure increases monotonically with compressibility values from 20  $\text{mN m}^{-1}$  to 60  $\text{mN m}^{-1}$  (Fig. B). The monolayer collapses at 43  $\text{mN m}^{-1}$  and 0.57  $\text{nm}^2$  and the lift off area is 1.5  $\text{nm}^2$ .

- Lowering the subphase pH causes a diminution in the average molecular area (Fig. A) and an increase of the compressibility modulus (Fig. B) at lateral pressures higher than 5-10  $\text{mN m}^{-1}$  (see inset in Fig. 2 B), with a slightly reduced collapse pressure (collapse point: 40  $\text{mN m}^{-1}$  at 0.46  $\text{nm}^2$ ). The lift off area at this pH is 1  $\text{nm}^2$ .

- The compressibility modulus ranges from 10  $\text{mN m}^{-1}$  to 90  $\text{mN m}^{-1}$ , also indicating a liquid-expanded behavior (Davies and Rideal, 1963) that becomes more condensed under compression above 5-10  $\text{mN m}^{-1}$ , compared to the behavior at pH 8.

# Diacilglicerol pirofosfato y ácido fosfatídico: una buena dupla?



**PA es el más simple de los acilglicerofosfolípidos. Intermediario para la síntesis de Fosfolípidos y triglicéridos**

**Esta presente en pequeñas cantidades. 0,5 -1,5 nmol/gr de peso seco hojas.  
Su concentración es de 50-150  $\mu$ M.**

**Constituye menos del 1% del total de fosfolípidos, 20 veces que PC**

**Los niveles de PA incrementan rápidamente en respuesta a diferentes estímulos**



# Diacilglicerol pirofosfato y ácido fosfatídico: una buena dupla?

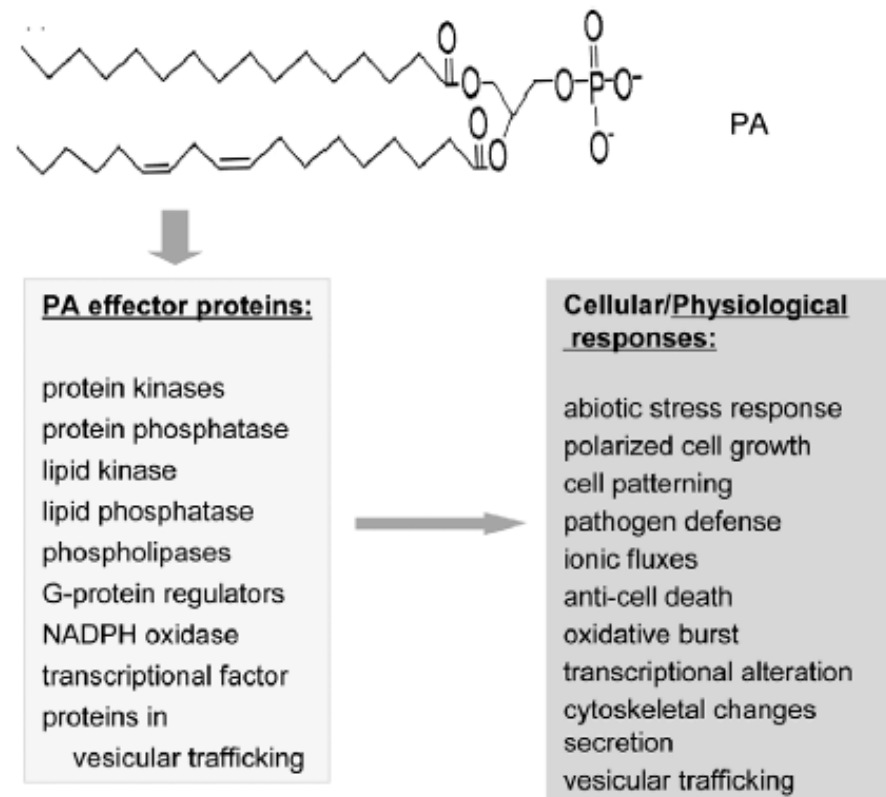


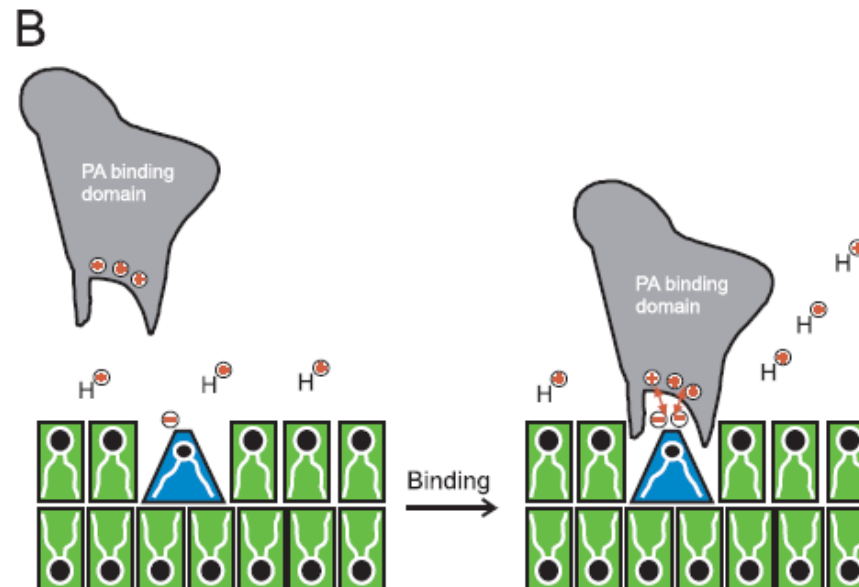
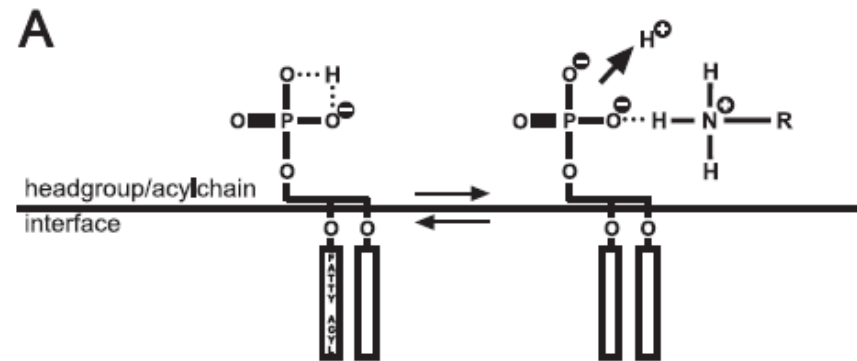
Fig. 1. PA structure, its targets, and cellular effects. Two fatty acid tails vary and give rise to different PA molecular species. PA has been reported to bind to different types of proteins and the specific examples are discussed in text. Multiple cellular effects of PA have been documented or implied.

# Mecanismo de acción: interacción PA-proteína

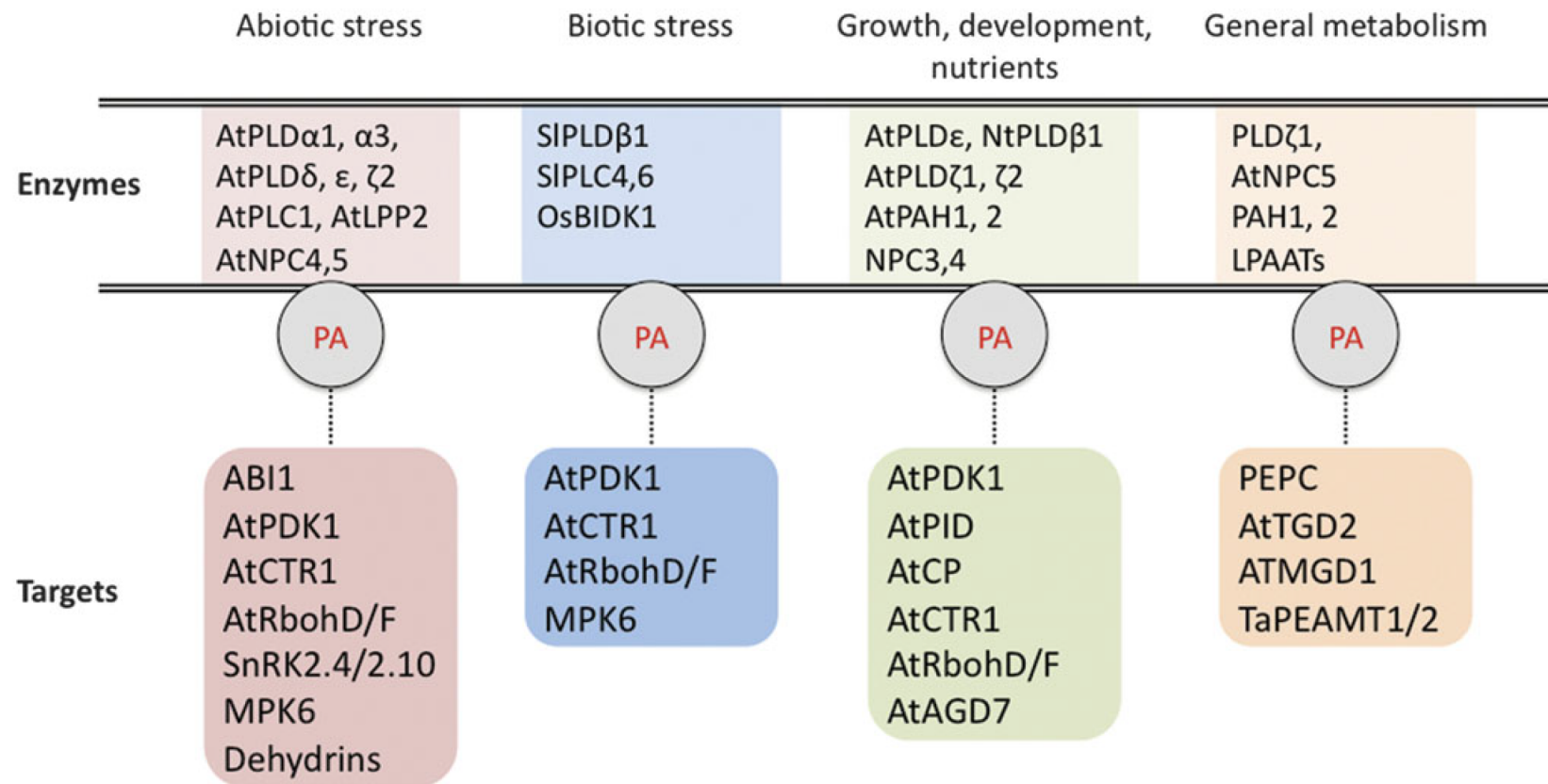
A diferencia de otros fosfolípidos no se conoce un dominio conservado que participe en la unión a PA con cierta especificidad.

Es imprescindible para el binding la presencia de aminoácidos cargados positivamente (lisina-arginina) que van a interaccionar con el grupo fosfato a través de un enlace puente hidrógeno. (ABI1-arginina 73).

# Electrostatic/hydrogen bond switch



# Participación de PLD y PA en diferentes respuestas



## PLD-PA: funciones celulares en plantas

- **Manipulación genética: ablación o sobre-expresión de PLD.**

**PLD están implicadas en:**

**Estrés abiótico: chilling, freezing, deshidratación, sequía, sal, wounding, ROS, nutrient starvation**

**Estrés biótico: ataques por bacterias y hongos, en rta a elicitores, inducción de los nódulos en FBN.**

**Crecimiento y desarrollo: durante las germinación de las semillas, en la senescencia de las hojas, expansión del tubo polínico, etc**

## PLD: modos de acción en la respuesta celular

- **Regulación celular: señal celular, tráfico vesicular, re-arreglos del citoesqueleto.**
- **Remodeling de membrana: su participación en la biosíntesis de lípidos y cambios en la composición de los lípidos de membrana.**
- **Degradación de la membrana: son todos aquellos procesos catabólicos que llevan a la pérdida de la integridad de la membrana.**

## PLD: propiedades únicas de una enzima particular

- i. Su modo de activación y regulación
- iii. Preferencia del sustrato, llevando a la formación de especies moleculares y particulares de PA y del grupo cabeza.
- iii. Su capacidad para asociarse con proteínas en regiones subcelulares particulares modulando la disponibilidad de sustrato.
- iv. Patrón de expresión espacial (tejido o tipo celular específico) y temporal.