

# Mecanismos de señalización celular mediados por fosfolípidos

PARTE I

“ Membranas biológicas: estudio de nivel estructural y funcional”

Ana Laura Villasuso  
Universidad Nacional de Río Cuarto



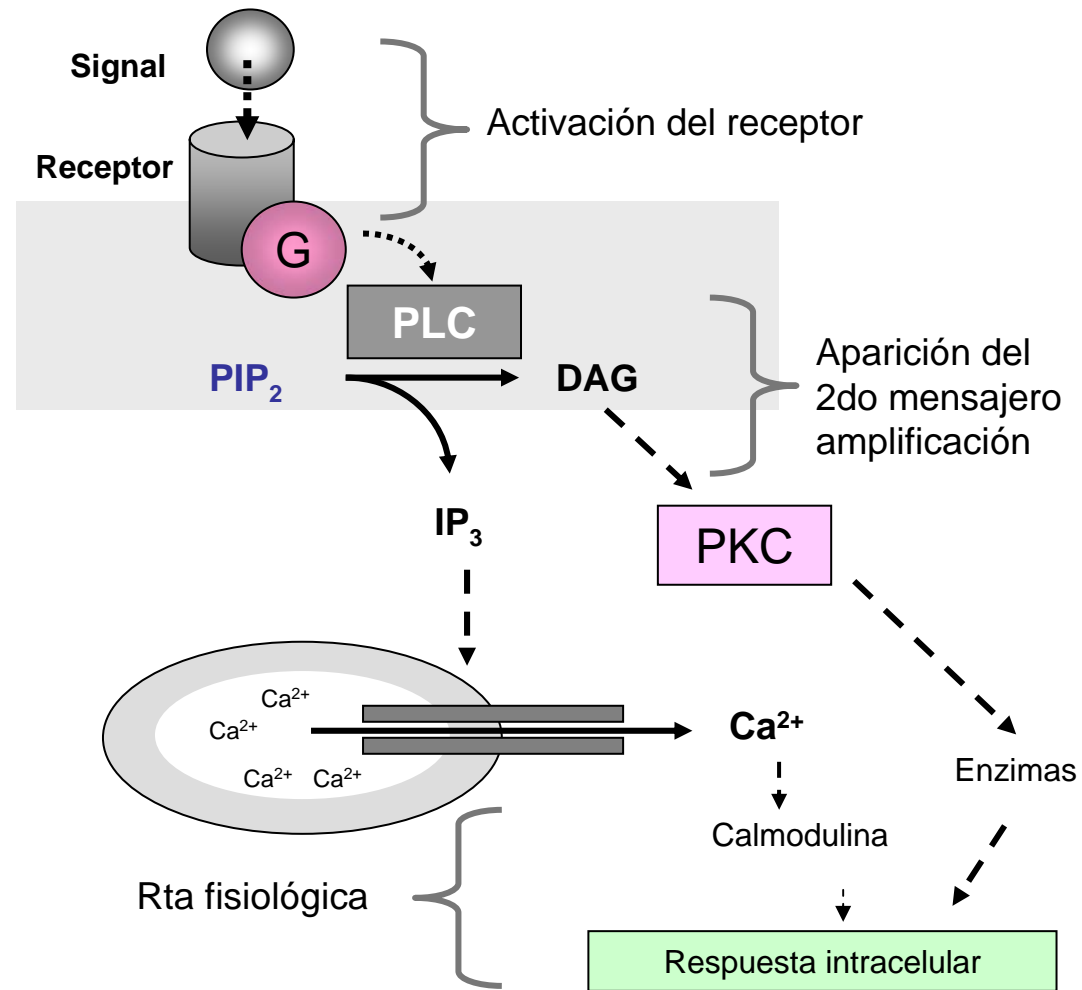
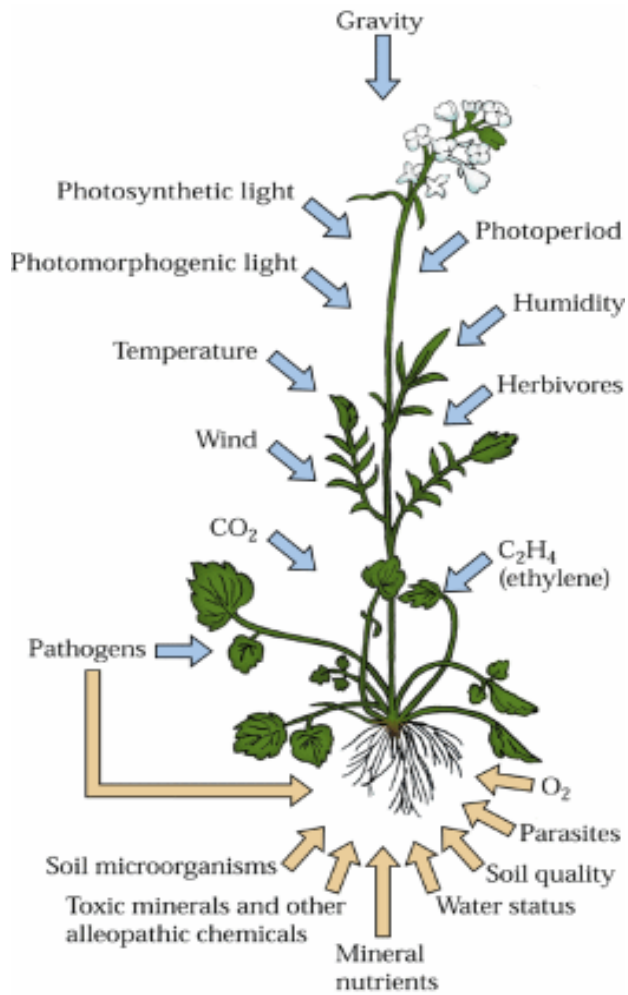
# ¿De qué se trata?

## SEÑAL CELULAR

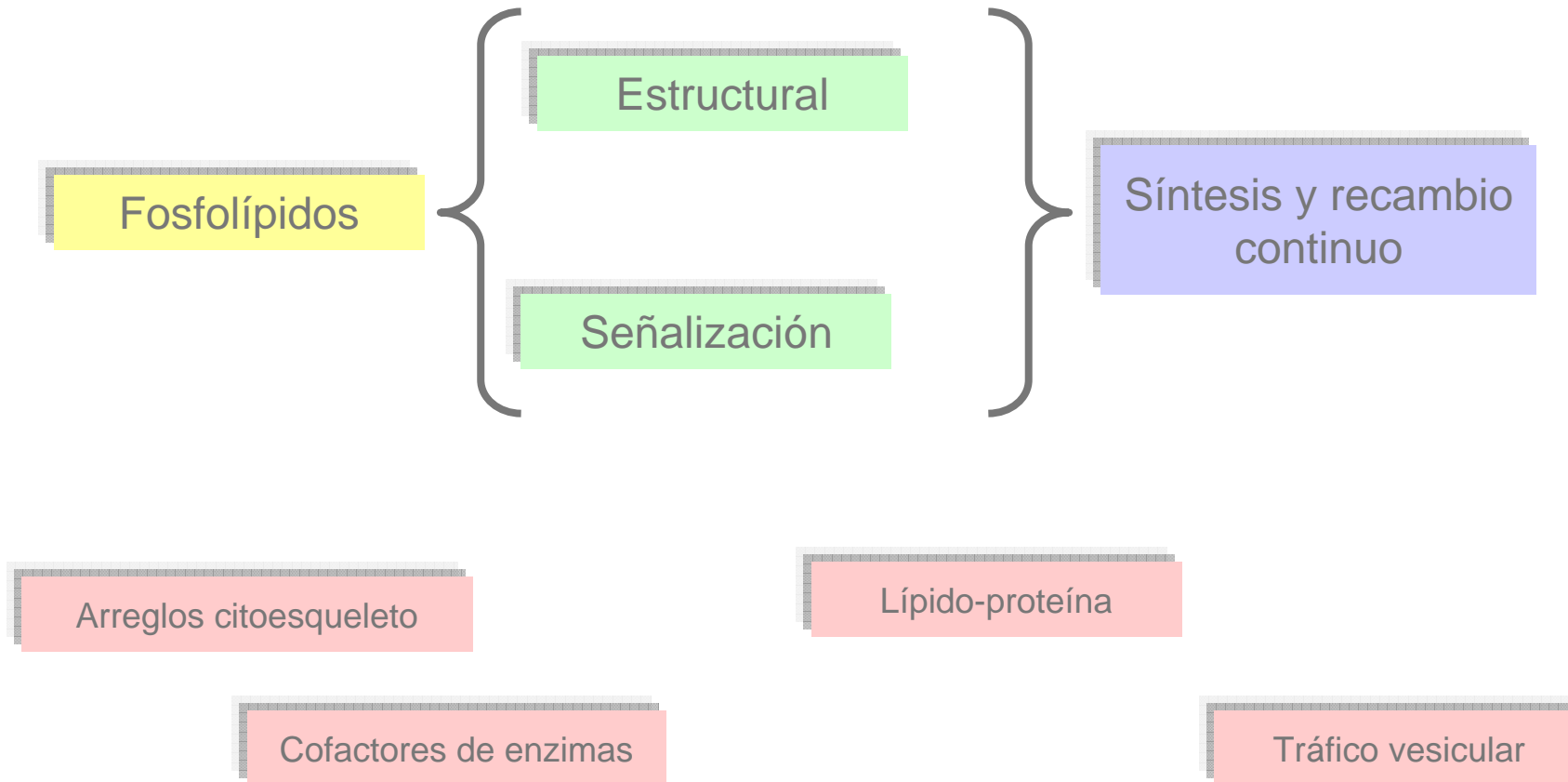
**Mecanismo complejo de comunicación que regula y coordina diferentes funciones celulares.**

**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.**

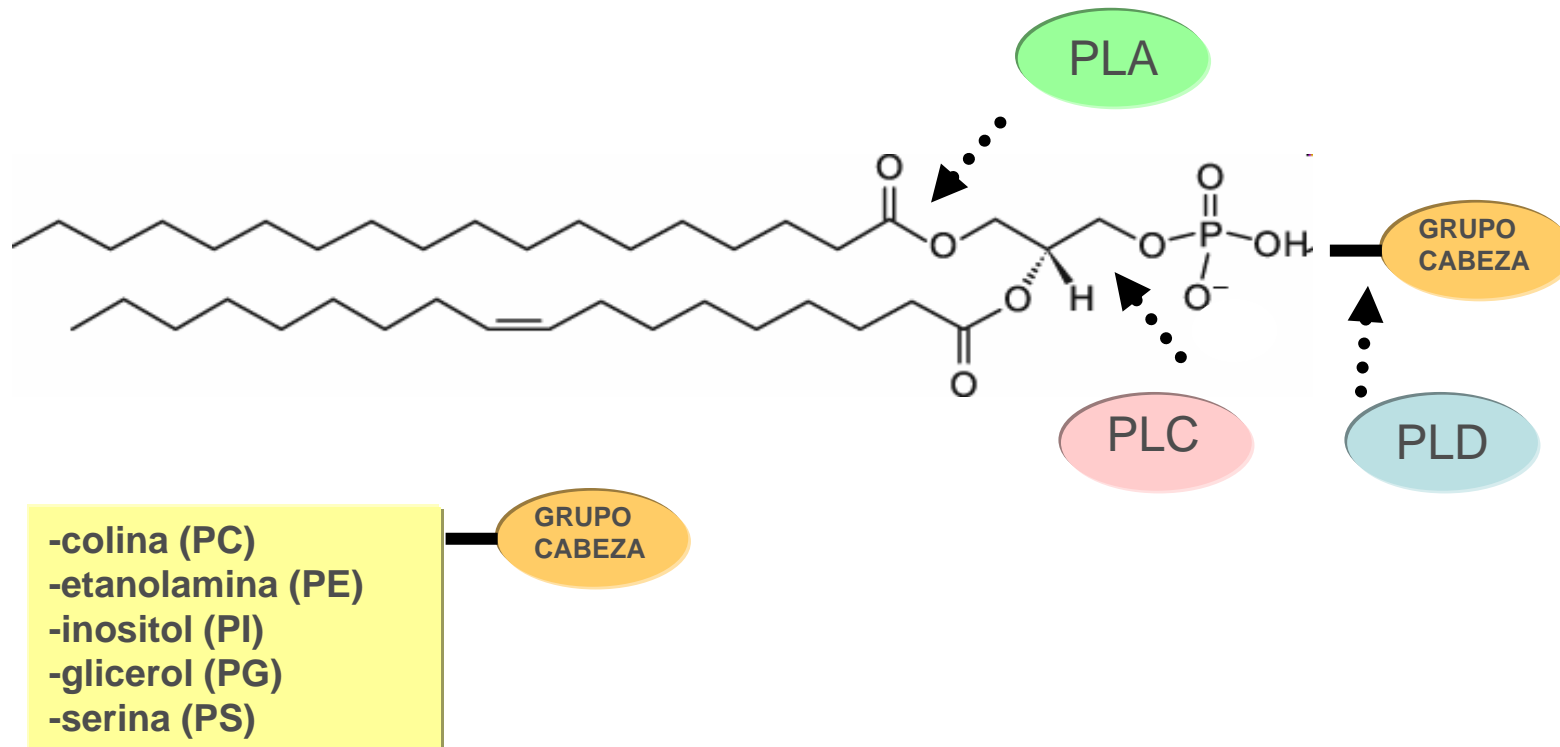
# ¿Cómo funciona?



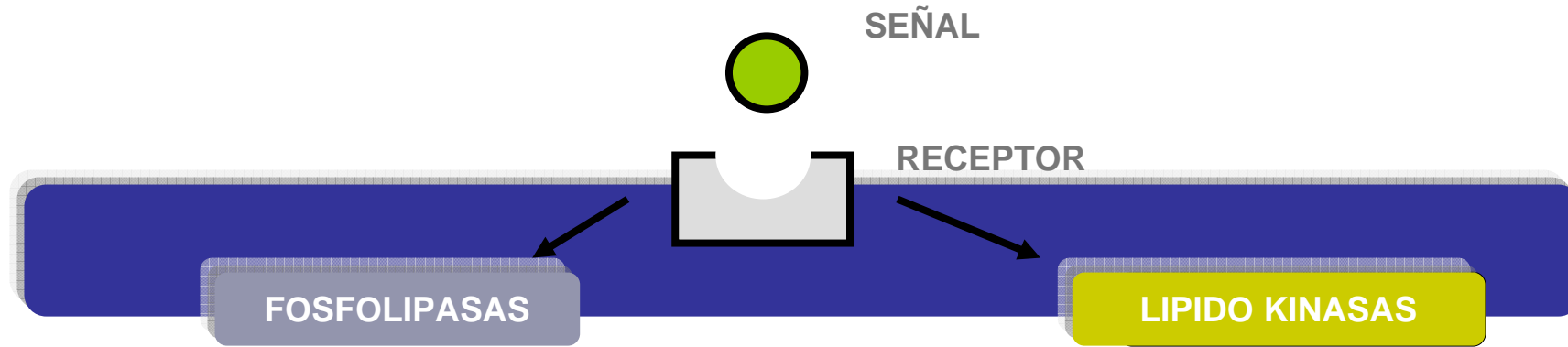
## Papel bi-funcional de los fosfolípidos



## 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>

## Señalización mediada por PI/ PLC



SEÑAL



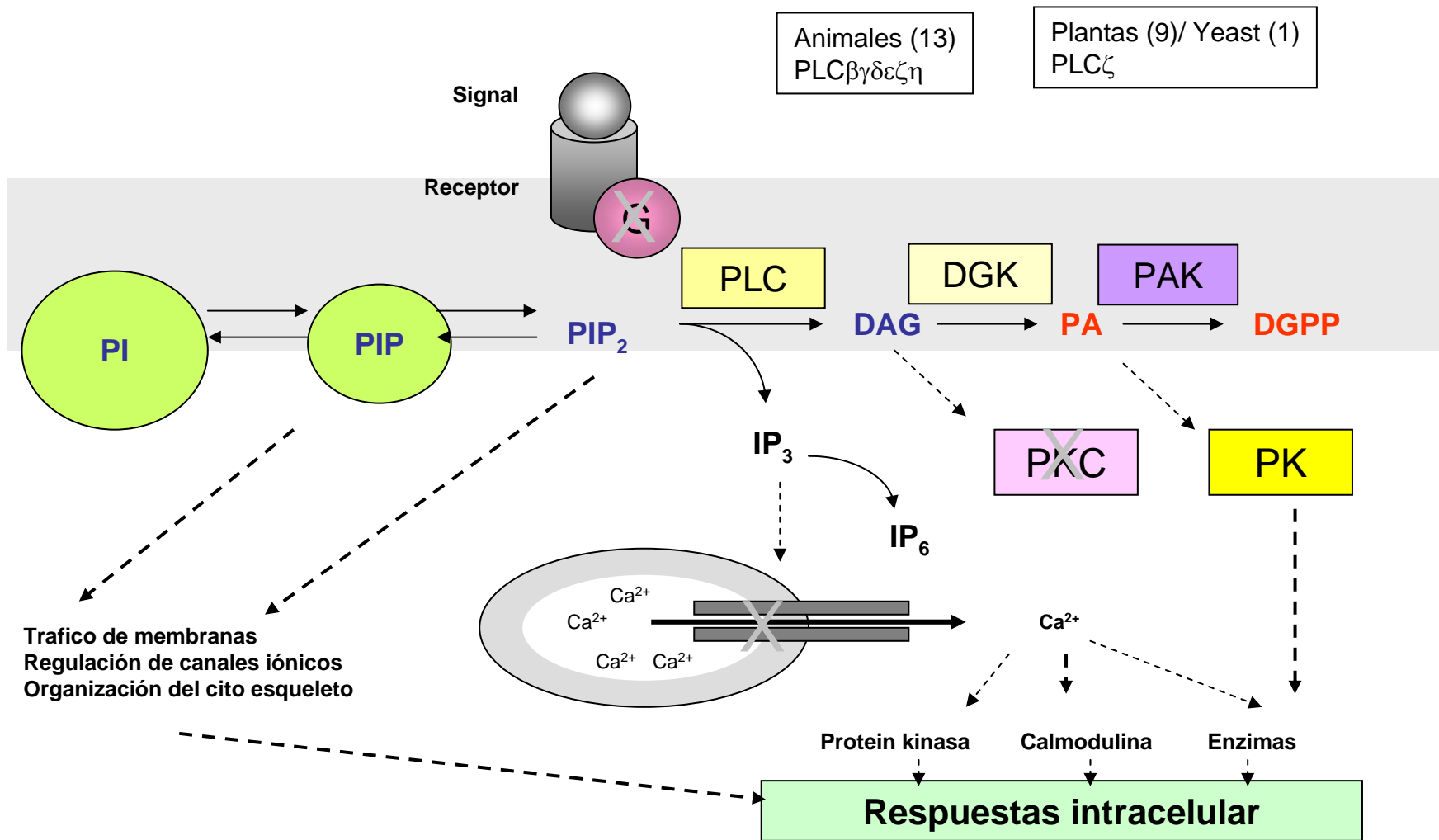
RECEPTOR



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>

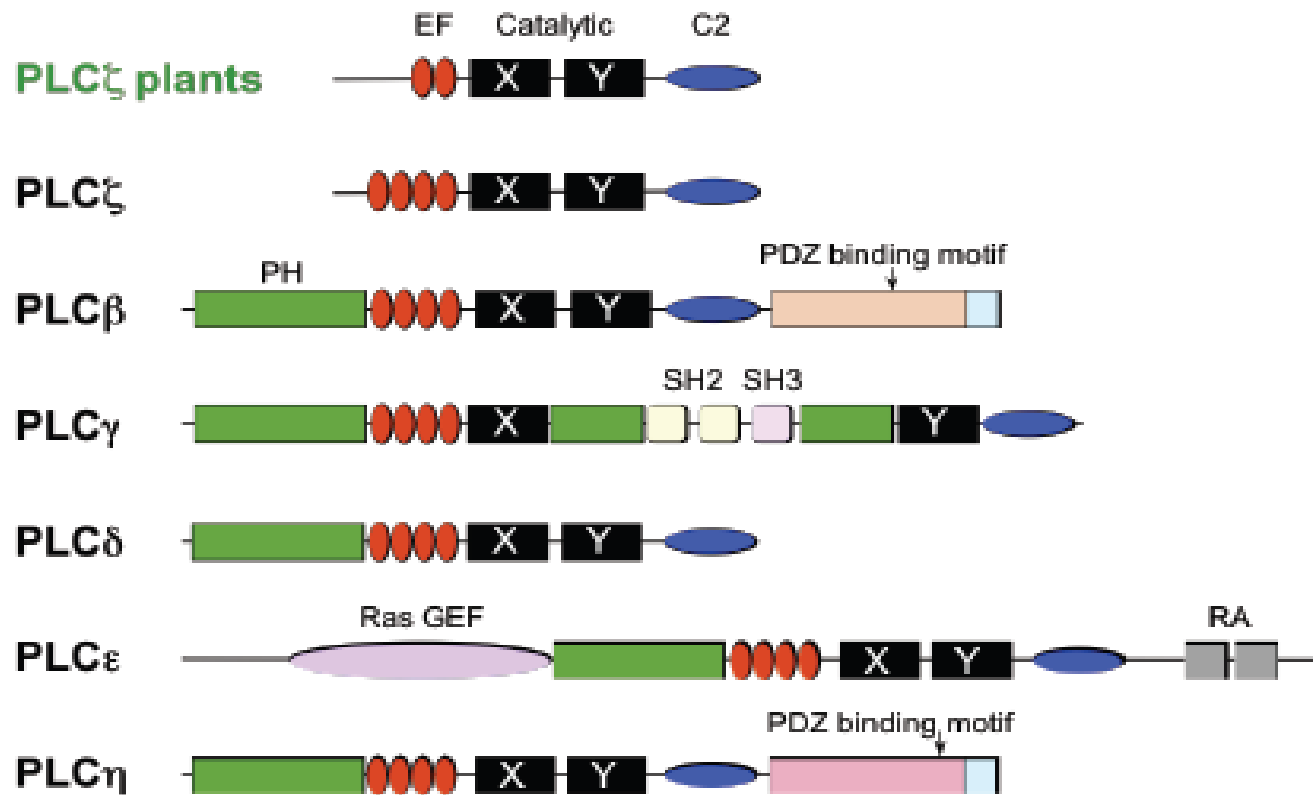
# Señalización PI/ PLC en plantas

## Diferencias con el modelo propuesto en mamíferos





## Estructura y dominios de las PLCs



## Estructura y dominios de las PLCs

PLC $\zeta$  plants



XY: histidina

Ausencia de PH domain

C2 alta % aa aromáticos

PLC $\zeta$



PLC $\beta$



PLC $\gamma$



PLC $\delta$



PLC $\epsilon$



PLC $\eta$



## Regulación de la actividad PLC

- PLC $\beta$   $\longrightarrow$  proteína G
- PLC $\gamma$   $\longrightarrow$  tirosina quinasa
- PLC $\varepsilon$   $\longrightarrow$  proteína G y ras

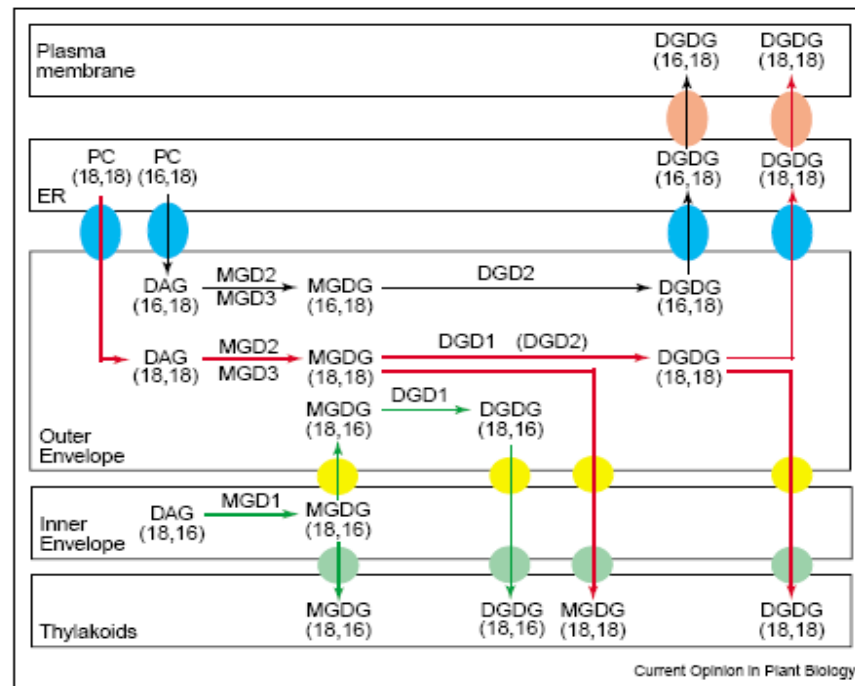
Ca<sup>2+</sup> {  
[ $\mu$ M] sustrato PIP y PIP<sub>2</sub>  
[mM] sustrato es PI

## Señalización vía PLC

- **Estrés abiótico:** todas las PLC de plantas son inducibles por estrés excepto AtPLCx. Sobre-expresión de ZmPLC y NtPLC mejora la tolerancia a la sequía y al estrés osmótico, respectivamente.
- **Estrés biótico:** ABA-apertura del estoma, ABA inhibición de la germinación.
- **Desarrollo:** esta implicada una fosfolipasa C no convencional (NPC). Esta enzima usa como sustrato a PC y el producto es DAG.

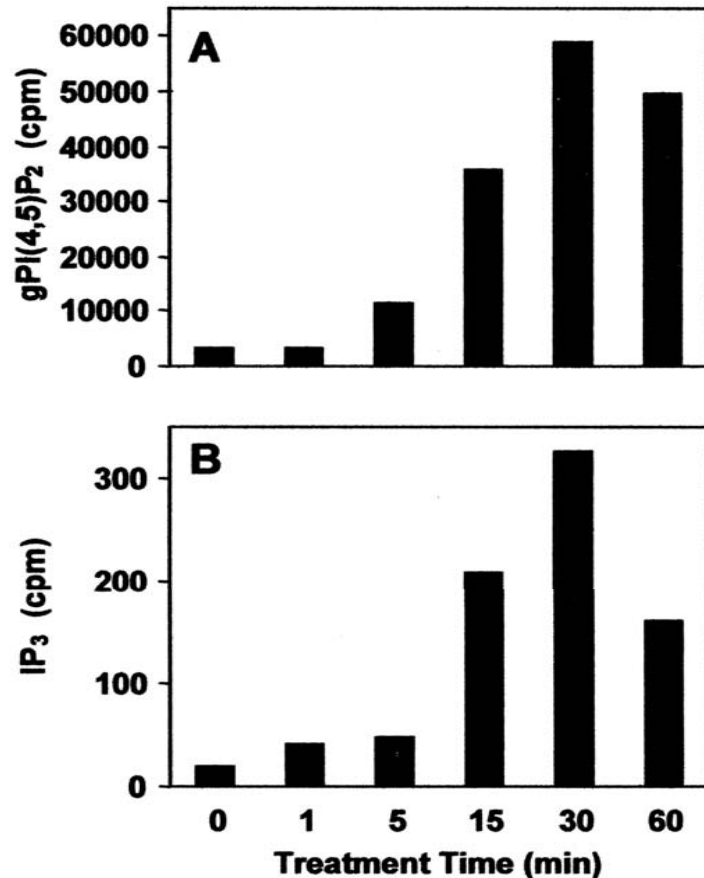
## PLC no convencionales

- Aumenta la transcripción de NPC en la respuesta a la privación de fosfato y IAA.
- Disminuyen los PL y aumentan la síntesis de galactolipidos.



Schematic pathway of MGDG and DGDG synthesis in *Arabidopsis*. MGDG synthesis is localised to the outer and inner chloroplast envelopes and requires lipid precursors that are derived from both the prokaryotic and eukaryotic pathways. DGDG synthesis occurs exclusively in the outer envelope and employs mainly ER-derived substrates. Lipid synthesis by the prokaryotic and eukaryotic pathways is highlighted by green and red arrows, respectively. Black arrows indicate the synthesis of DGDG, which is transported to extraplasmidial membranes. Numbers in parentheses refer to the carbon atoms of fatty acids that are esterified to the sn1 and sn2 positions of the glycerol backbone. DAG, diacylglycerol.

## Curso del tiempo de la generación de $\text{PIP}_2$ e $\text{IP}_3$ en rta al estrés salino



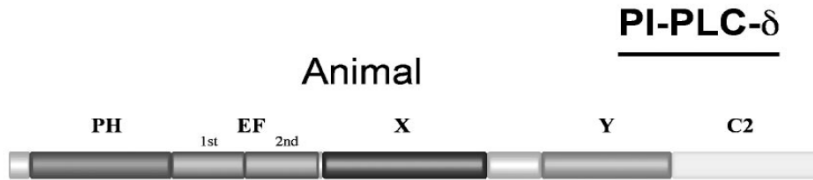
La determinación de los niveles de  $\text{PIP}_2$  por métodos convencionales como la marcación con  $^{32}\text{P}$  provee una información limitada del fenómeno.

Se mide una rta promedio

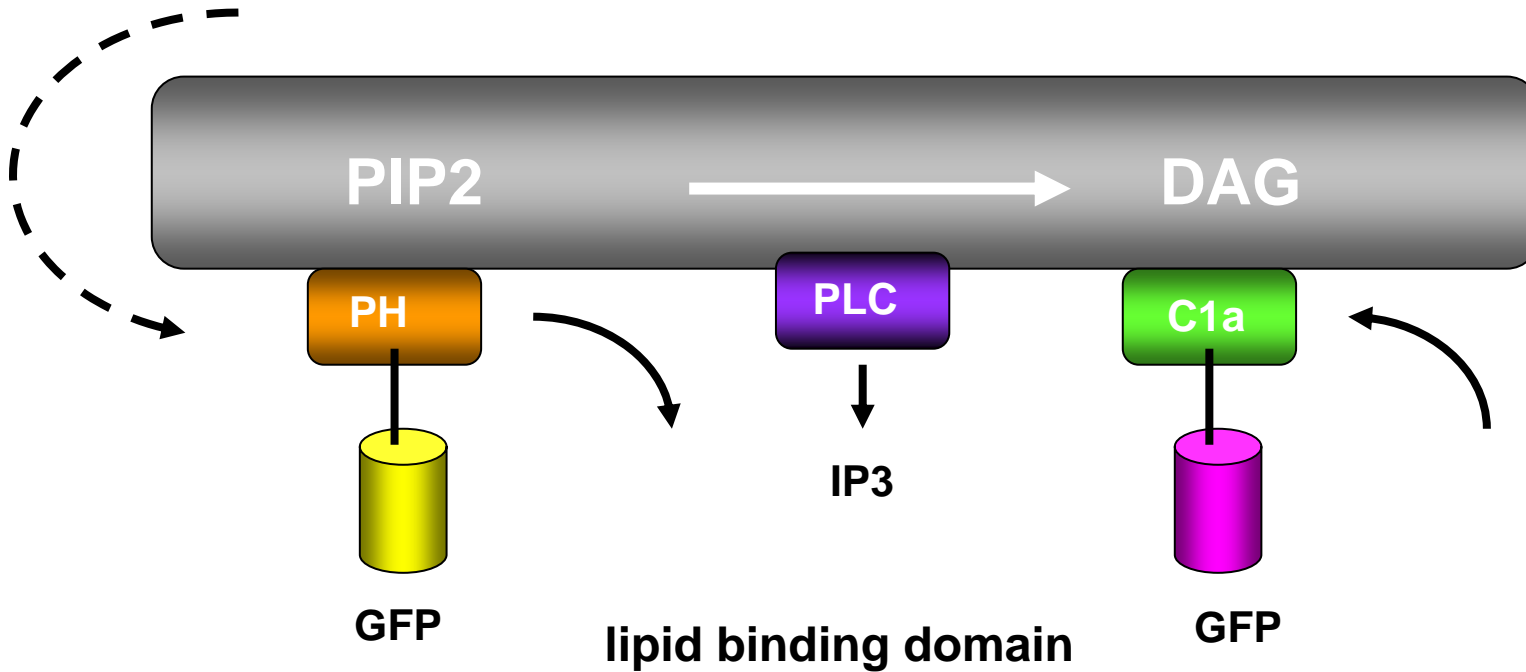
DeWald D et al. Plantphysiol 2001;126:759-769



# Biosensores lipídicos



PH domain (homologo a plecktrina):  
Plectrina: sustrato de PKC en neutrófilos  
120 aa, puede unir PIP2 y subunidades  
de prot G. recluta prot a la membrana  
modulando su actividad



*The Plant Journal* (2007) 52, 1014–1026

doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03292.x

## Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings

Wessel van Leeuwen<sup>1,†,‡</sup>, Joop E.M. Vermeer<sup>1,2,3,†</sup>, Theodorus W.J. Gadella Jr<sup>2,3</sup> and Teun Munnik<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Section Plant Physiology, University of Amsterdam, Swammerdam Institute for Life Sciences, Kruislaan 318, NL-1098 SM, Amsterdam, The Netherlands,*

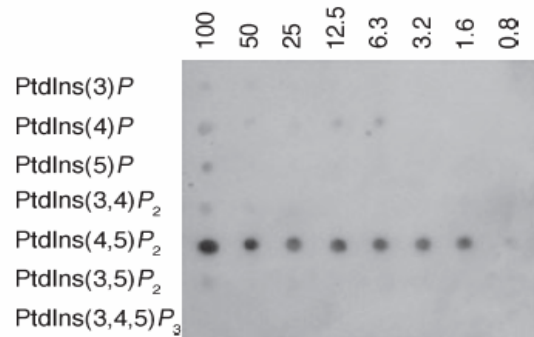
<sup>2</sup>*Section Molecular Cytology, University of Amsterdam, Swammerdam Institute for Life Sciences, Kruislaan 318, NL-1098 SM, Amsterdam, The Netherlands, and*

<sup>3</sup>*Centre for Advanced Microscopy, University of Amsterdam, Swammerdam Institute for Life Sciences, Kruislaan 318, NL-1098 SM, Amsterdam, The Netherlands*

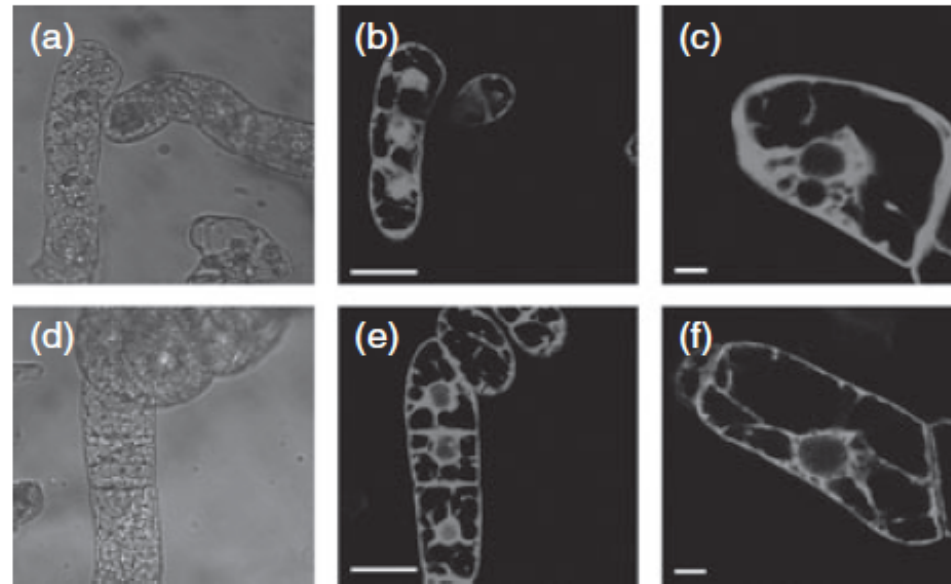


# Biosensores lipídicos

## protein-lipid overlay assay

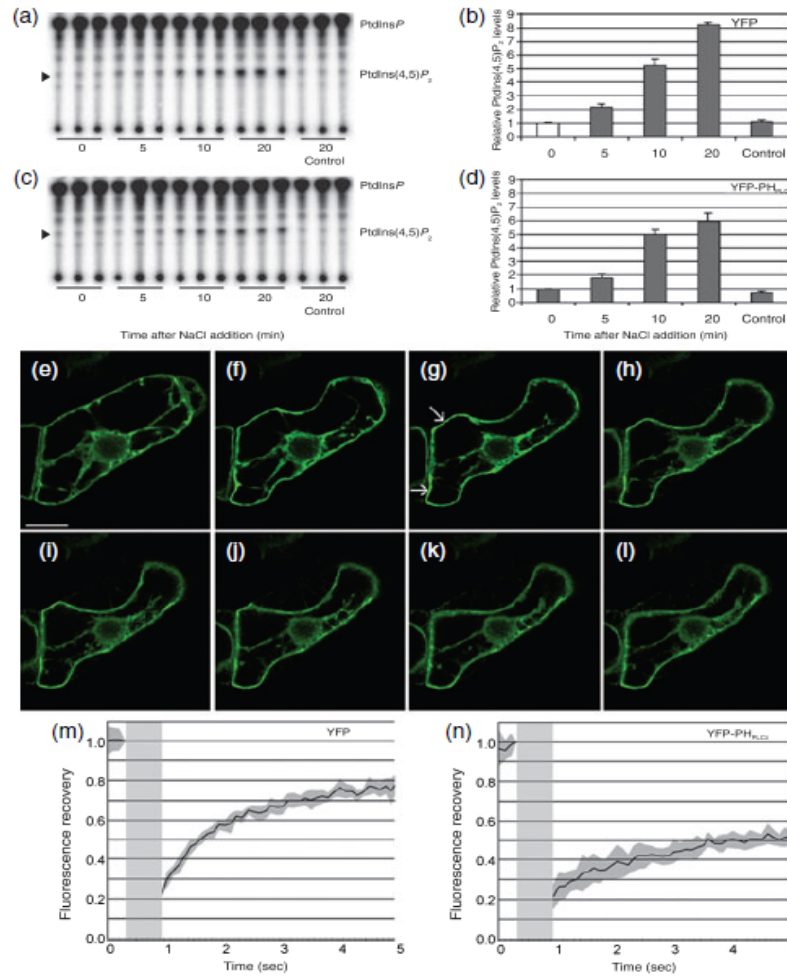


**Figure 1.** Lipid-binding specificity of PH<sub>PLCδ1</sub>. A protein-lipid overlay assay was conducted by spotting all naturally occurring polyphosphoinositide (PPI) isomers (indicated on the left) on a Hybond-C extra membrane, ranging from 100 to 0.8 pmol (indicated on the top). The blot was incubated overnight with purified GST-PH<sub>PLCδ1</sub> protein (0.5 μg ml<sup>-1</sup>), and subsequent binding was detected by an anti-GST antibody and enhanced chemiluminescence.



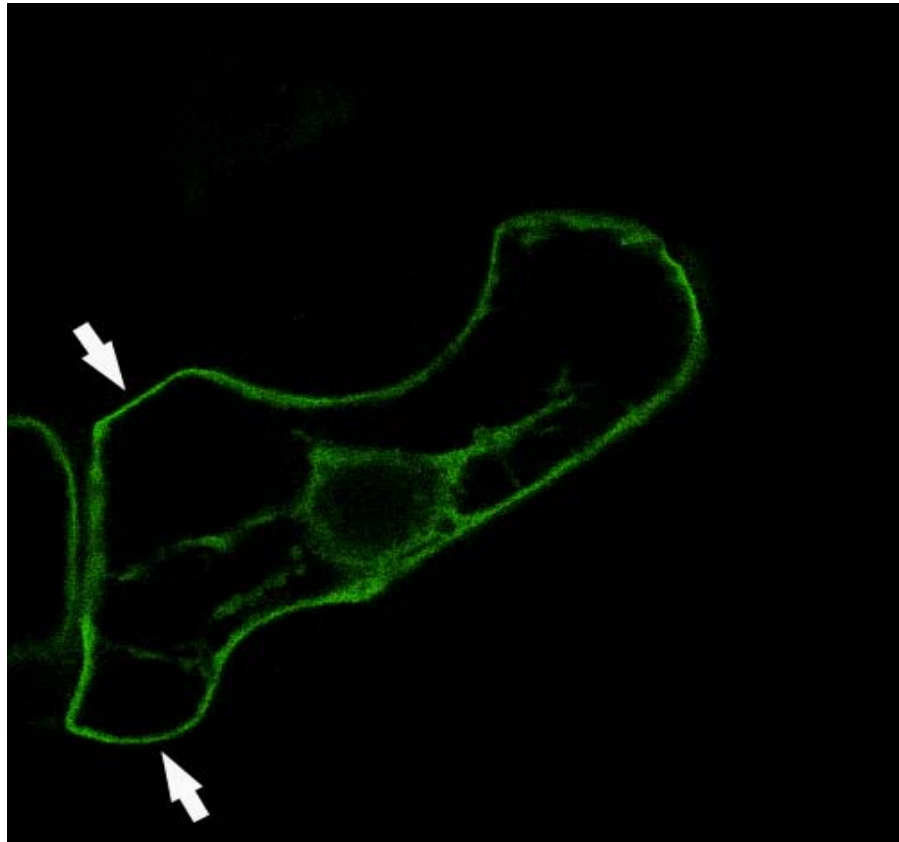
**Figure 2.** Fluorescence patterns of tobacco BY-2 cells stably expressing YFP or YFP-PH<sub>PLCδ1</sub>. (a–c) Control 'yfp' cells, expressing YFP; (d–f) 'yfp-ph' cells expressing YFP-PH<sub>PLCδ1</sub>. Panels (a) and (d) show the differential interference contrast (DIC) image of panels (b) and (e), respectively. The scale bar in panels (b) and (e) is 50 μm; the scale bar in panels (c) and (f) is 10 μm.

# Biosensores lipídicos



**Figure 4.** Effect of salt stress on the formation and localization of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in tobacco BY-2 cells. The change in <sup>32</sup>P-labelled PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on an alkaline TLC is shown in response to 125 mM NaCl after 0, 5, 10 and 20 min, and for 20 min of vehicle without salt (control). The response of *yfp* (a) and *yfp-ph* cells (c) is shown. Arrowheads indicate PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Panels (b) and (d) show the quantification of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in the *yfp* and *yfp-ph* cells, respectively, plotted relative to the control PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> levels at *t* = 0 and *t* = 20 min (control). Panels (e-l) show the *in vivo* pattern of YFP-PHLC3 fluorescence in BY-2 cells imaged with a confocal scanning laser microscope (CLSM) after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 min of treatment, respectively, with 125 mM NaCl. The arrows in panel (g) indicate membranes of which the fluorescence levels are increased (see also Video Clip S1). The scale bar in panel (e) is 20 μm. Panels (m-n) show a FRAP analysis of *yfp* (m) or *yfp-ph* (n) cells, respectively, 5 min after treatment with 125 mM NaCl. Fluorescence in a 6.6-μm-wide area (containing plasma membrane and cytosol) was bleached and subsequently analysed for fluorescence recovery. The average fluorescence is shown for 5 s, measured in five independent cells, plotted relative to the level of fluorescence prior to bleaching. The grey area surrounding the curve indicates the average level ± the standard deviation. The grey rectangle between 0.3 and 0.9 s indicates the time that the area was bleached. Bar = 10 μm.

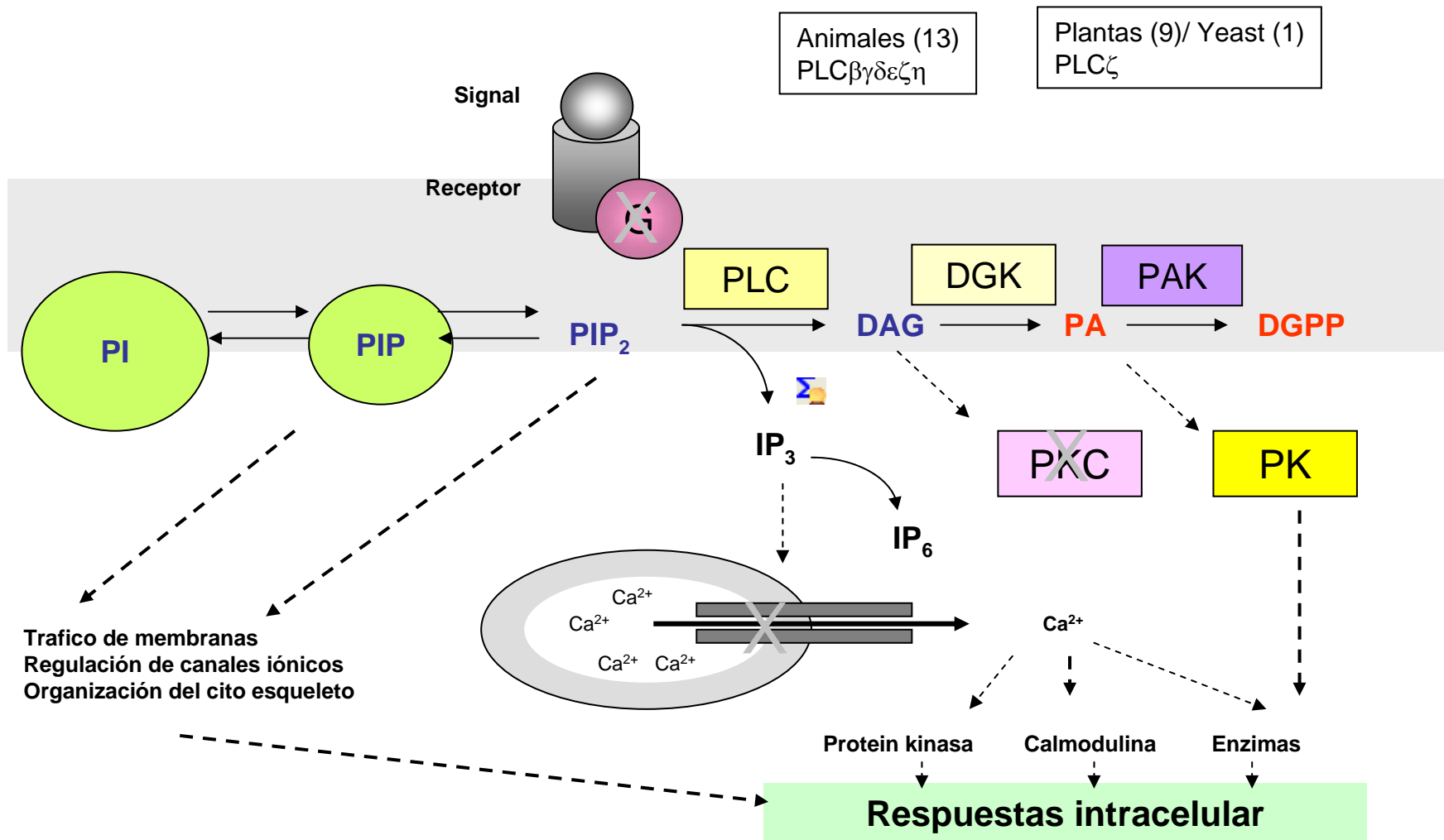
## In vivo patrón de fluorescencia de YFP-PH<sub>PLC81</sub>



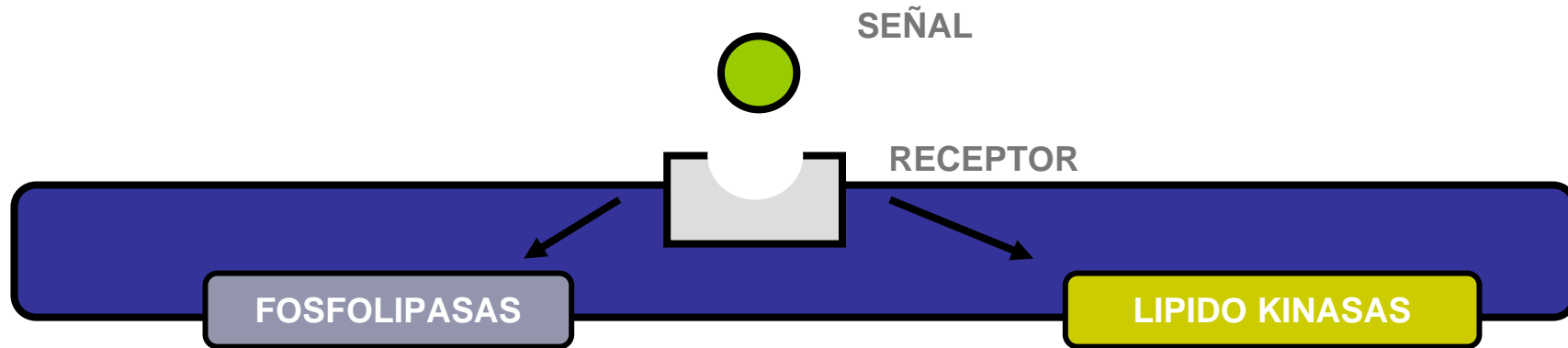
Imágenes registradas con confocal scanning laser microscope

# Señalización PI/ PLC en plantas

## Diferencias con el modelo propuesto en mamíferos

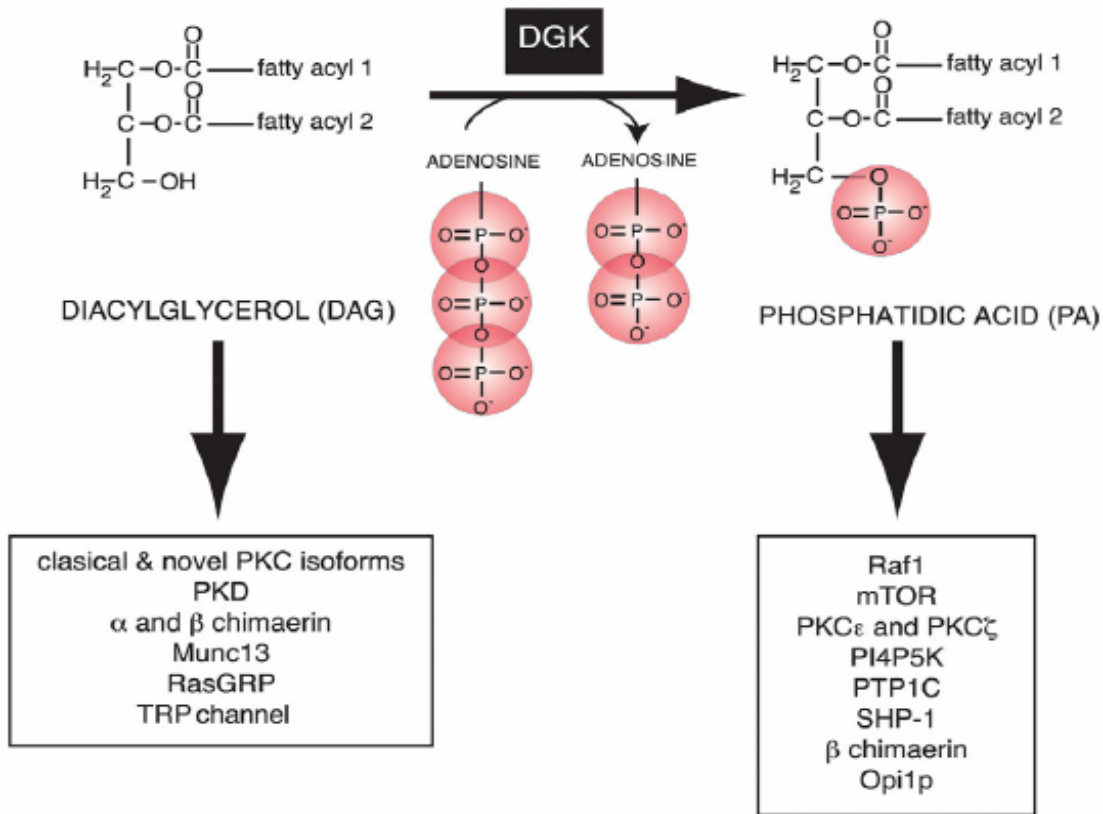


# Cascadas de señalización



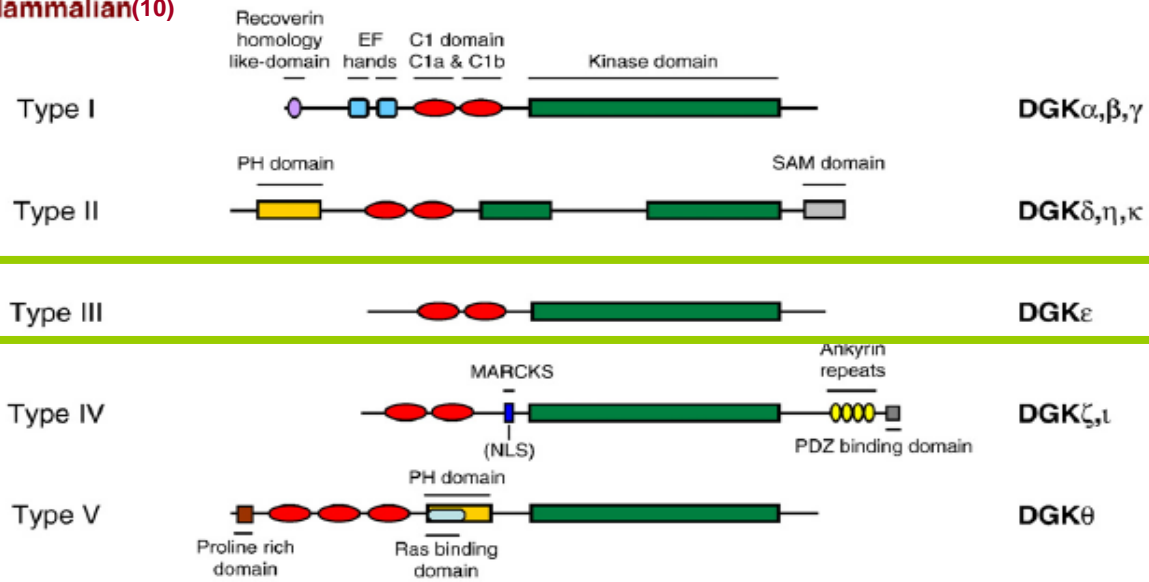
ENZIMA	PLA <sub>2</sub>	PLC	PLD	DGK	PAK	PI3K	PI4K	PI3P5K	PI4P5K
PRECURSOR	PC	PIP <sub>2</sub>	PC	DG	PA	PI	PI	PI3P	PI4P
PRODUCTOS	LPC + FA	IP <sub>3</sub> + DG	PA + Colina	PA	DGPP	PI3P	PI4P	PI(3,5)P <sub>2</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub>

# Diacilglicerol kinasa

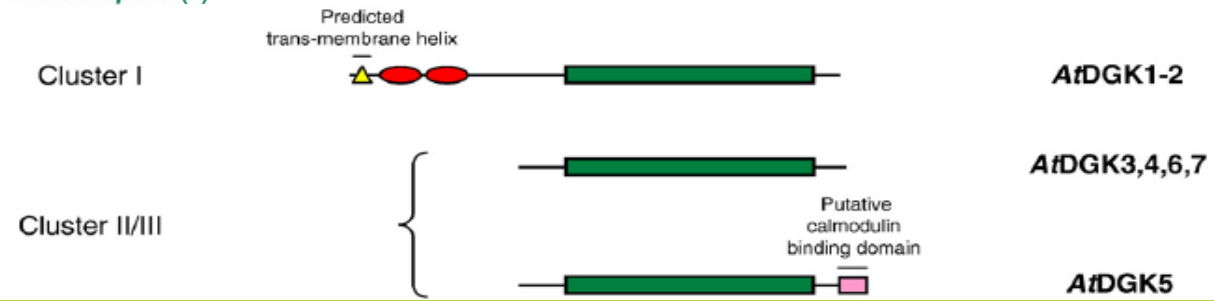


# Diacilglicerol kinasa: estructura y clasificación

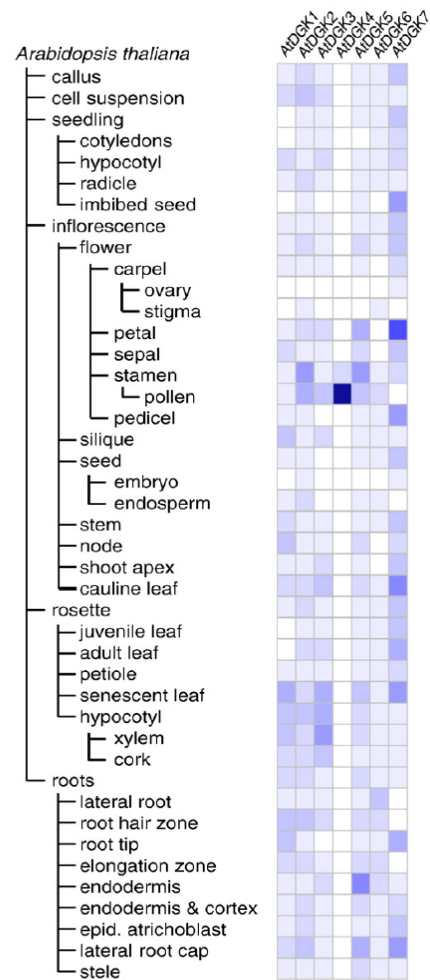
## Mammalian(10)



## Arabidopsis (7)



## Diacilglicerol kinasa: localización



-m. plasmática, citosol, núcleo, cloroplastos

-PL como PI y PG conjuntamente con cationes divalentes estimulan su actividad.

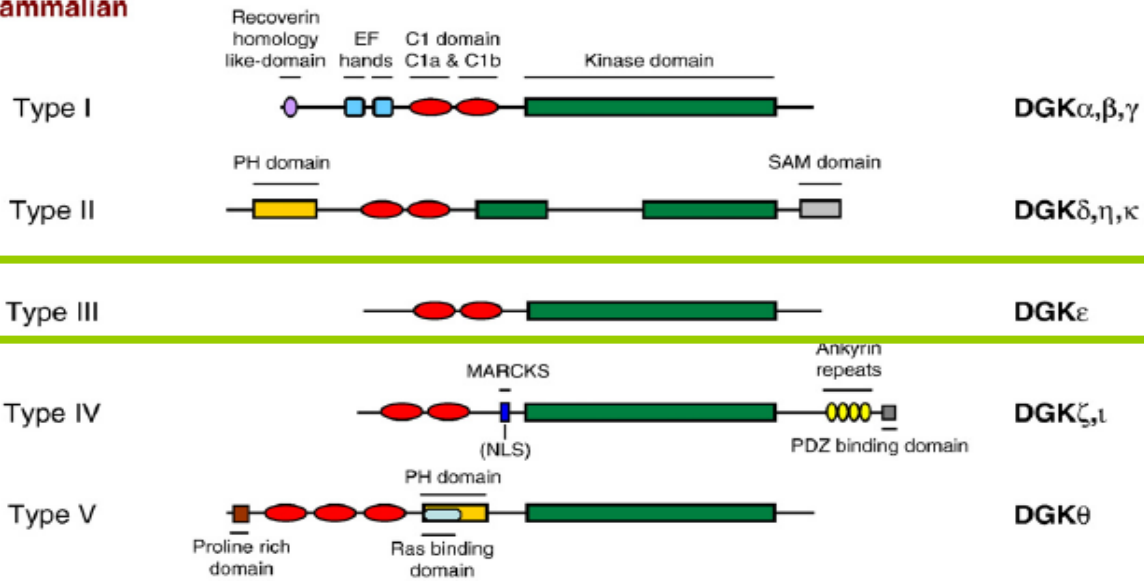
-Mamíferos la regulación de actividad es mediada por el reclutamiento a la membrana a través de dominios conservados.

-Vegetales la ausencia de ciertos dominios volvió poco certero un mecanismo regulatorio semejante al de mamífero.



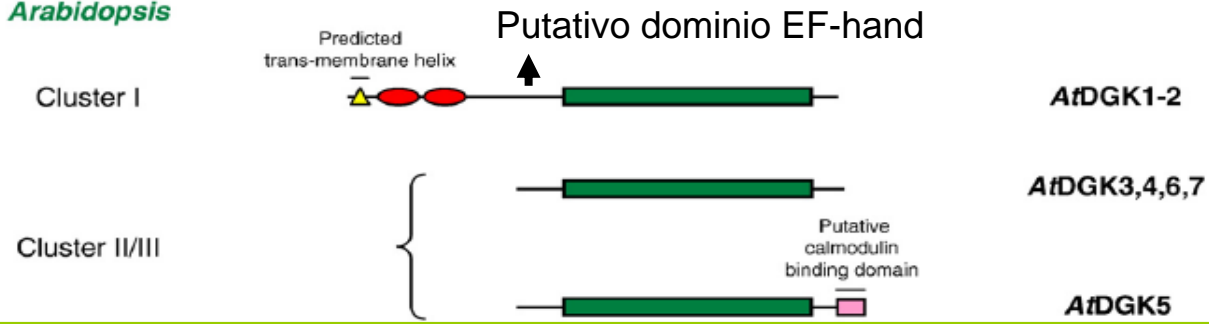
# Diacilglicerol kinasa: regulación

## Mammalian

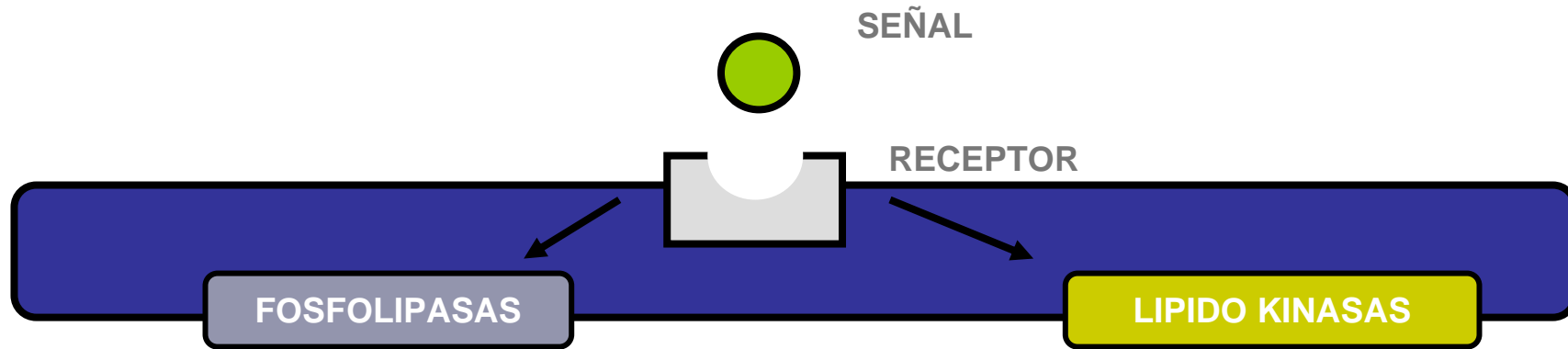


Son reguladas por binding con Ca<sup>2+</sup> en el dominio EF-hand

## Arabidopsis

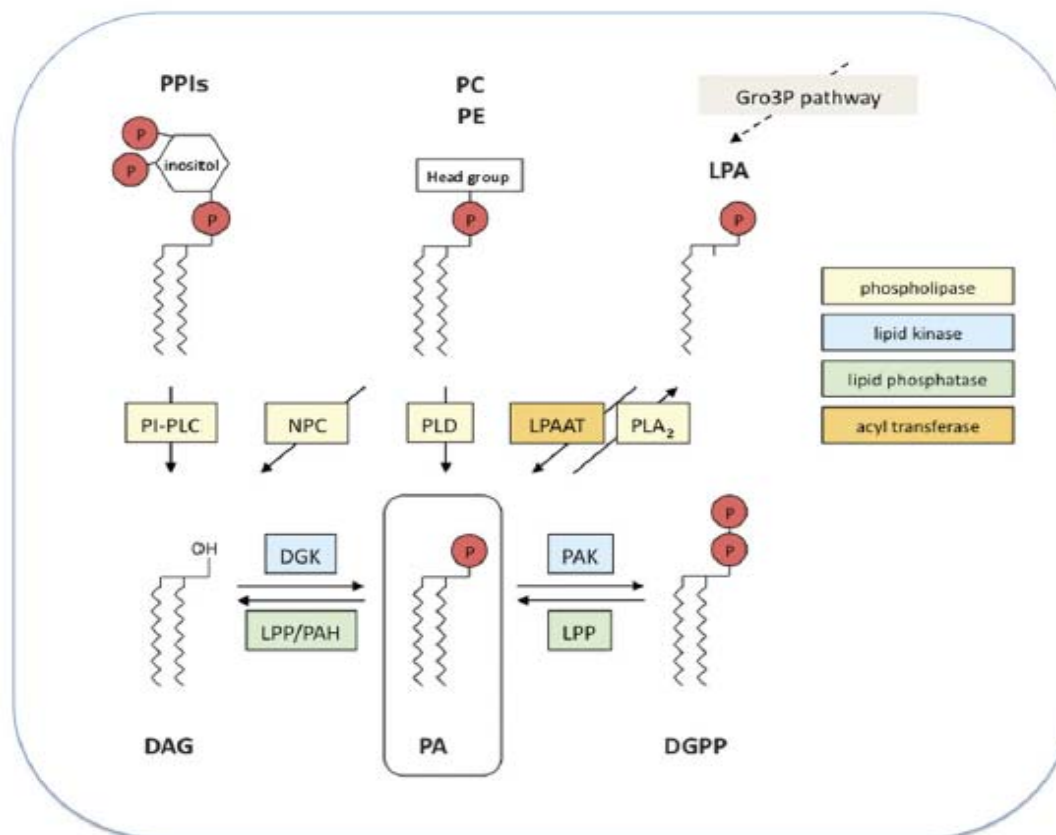


# Cascadas de señalización



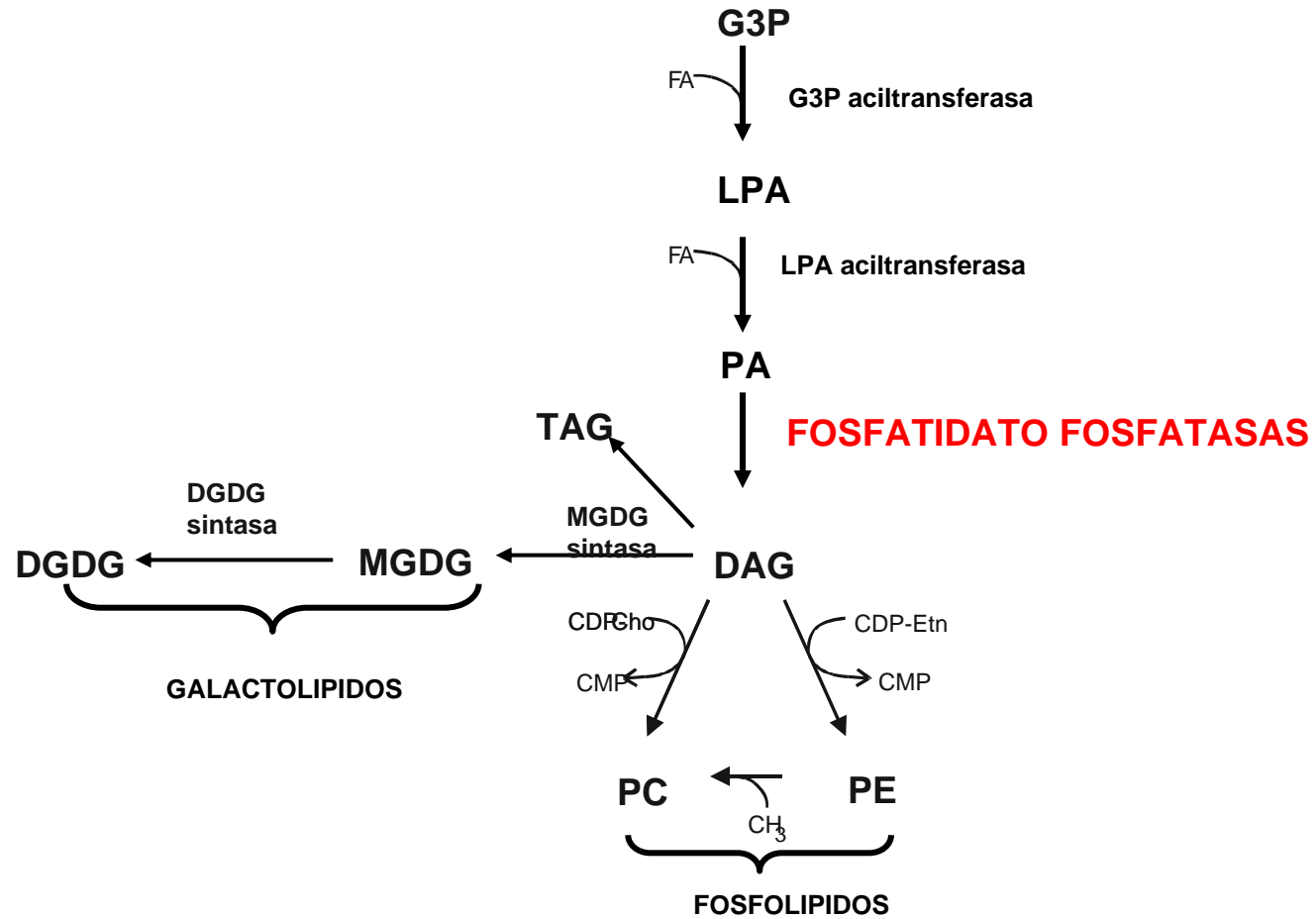
ENZIMA	PLA <sub>2</sub>	PLC	PLD	DGK	PAK	PI3K	PI4K	PI3P5K	PI4P5K
PRECURSOR	PC	PIP <sub>2</sub>	PC	DG	PA	PI	PI	PI3P	PI4P
PRODUCTOS	LPC + FA	IP <sub>3</sub> + DG	PA + Colina	PA	DGPP	PI3P	PI4P	PI(3,5)P <sub>2</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub>

## Metabolismo de ácido fosfatídico

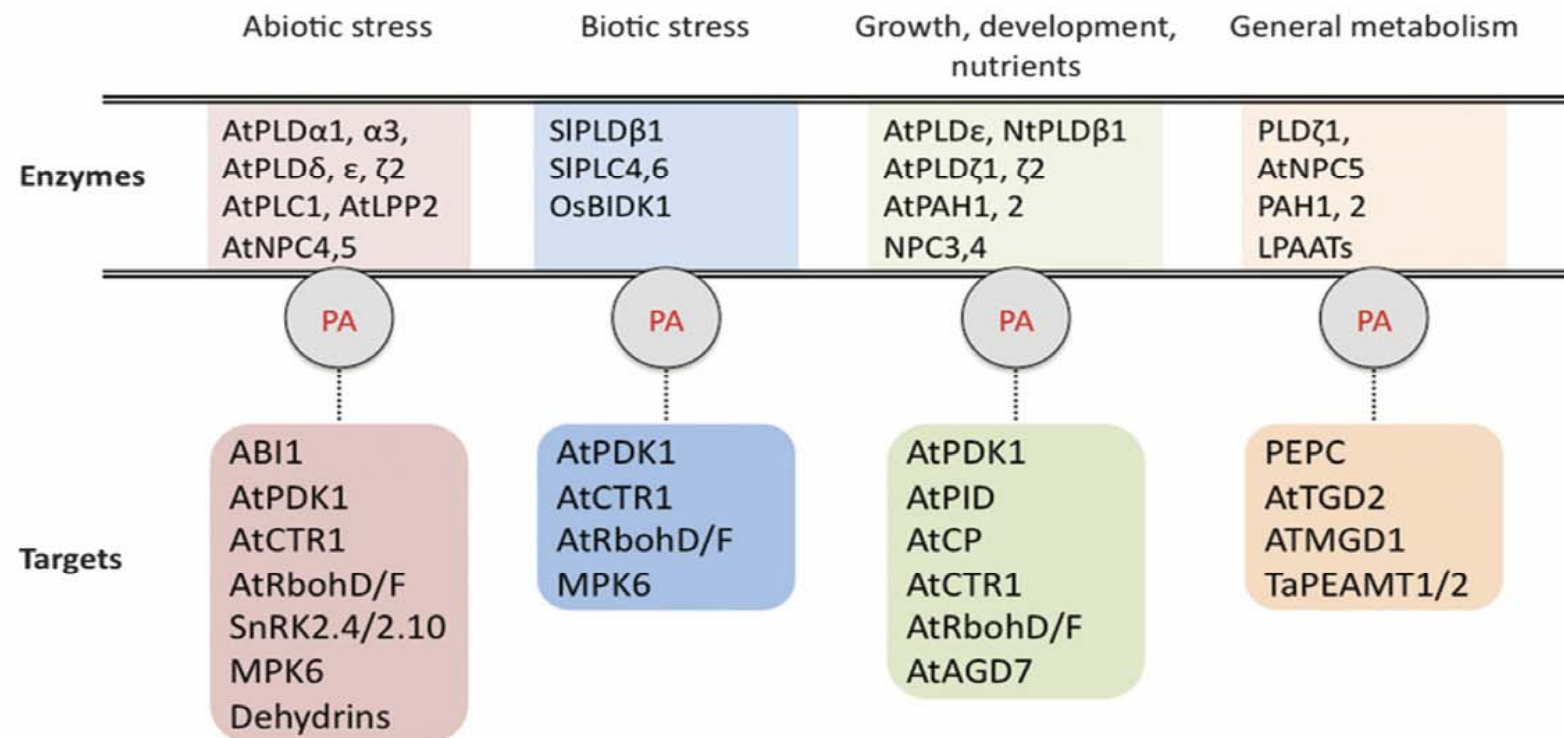


**Fig. 1.** Overview of PA formation and degradation pathways in plants, showing both 'signalling' and 'lipid metabolism' routes. Adapt from general eukaryotic pathways presented in Kooijman and Testerink (2010). Abbreviations: PE, phosphatidylethanolamine; LPA, ly PA; Gro3P, glycerol 3-phosphate; PI-PLC, PPI-hydrolysing phospholipase C; LPAAT, LPA acyltransferase; PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>; DGPP, DAG pyrophosphate. Other abbreviations are given in the Abbreviations section.

# Kennedy pathway

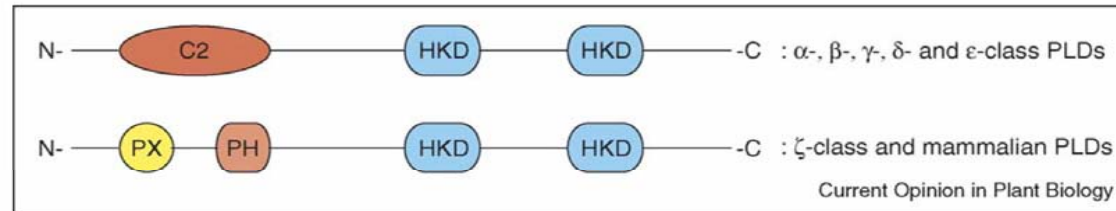


## Participación de PLD y PA en diferentes respuestas



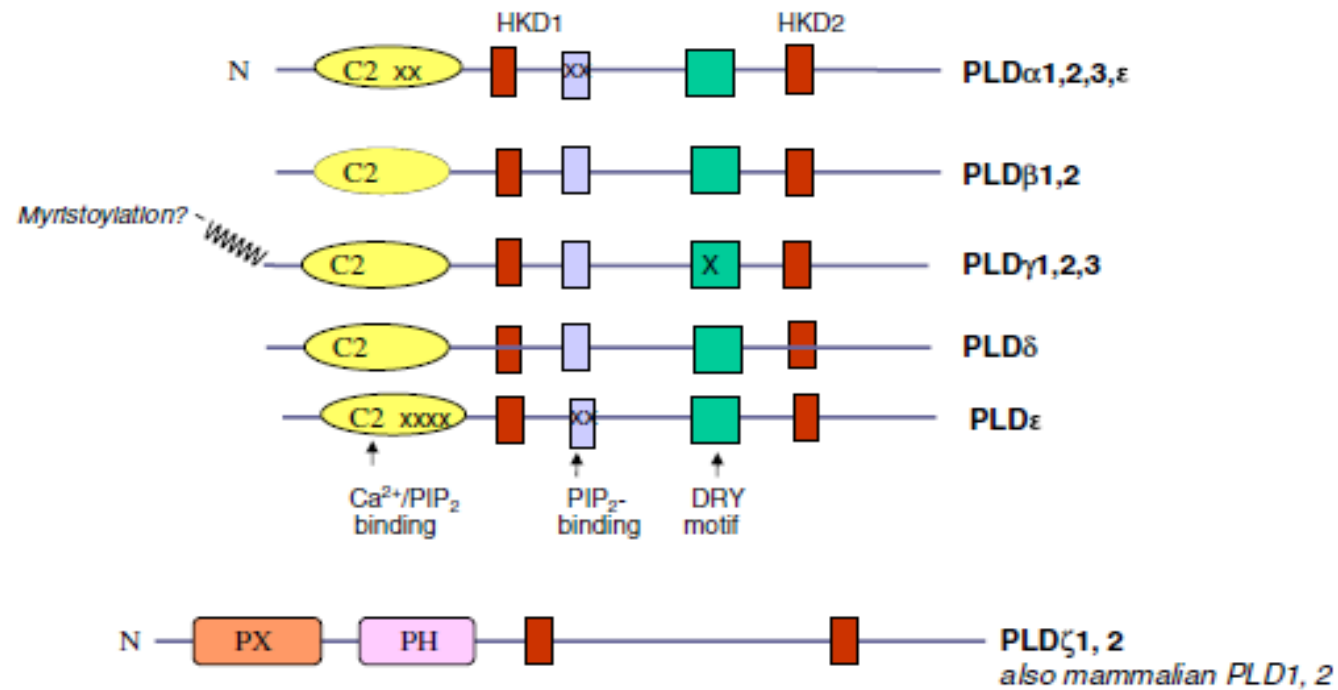
## Isoformas de PLD

- Arabidopsis thaliana posee 12 genes que codifican para PLD
- Se clasifican en 6 tipos PLD $\alpha$  (3)  $\beta$ (2),  $\gamma$  (3),  $\delta$   $\epsilon$   $\zeta$  (2).
- De acuerdo a la estructura de sus dominios se dividen en 2 subflias
  - a) C2-PLDs (10)
  - b) PX/PH-PLDs (2)



Schematic representation of two PLD sub-families. Plant and mammalian PLD isoforms contain two C-terminal catalytic domains (HKD) and an N-terminal lipid-binding region. Most plant PLD classes harbor an N-terminal calcium-dependent lipid-binding domain (C2), whereas mammalian and plant  $\zeta$ -class PLDs possess N-terminal Phox homology (PX) and pleckstrin homology (PH) lipid-binding domains.

# Estructura de los dominios conservados en las isoformas de PLD



## PLD: propiedades bioquímicas

**Table 1. Distinguishable catalytic and regulatory properties of Arabidopsis PLDs.**

PC=phosphatidylcholine; PE=phosphatidylethanolamine; PG=phosphatidylglycerol; PM=plasma membrane; IM=intracellular membrane. #Blanks mean information undetermined. References are cited in the text.

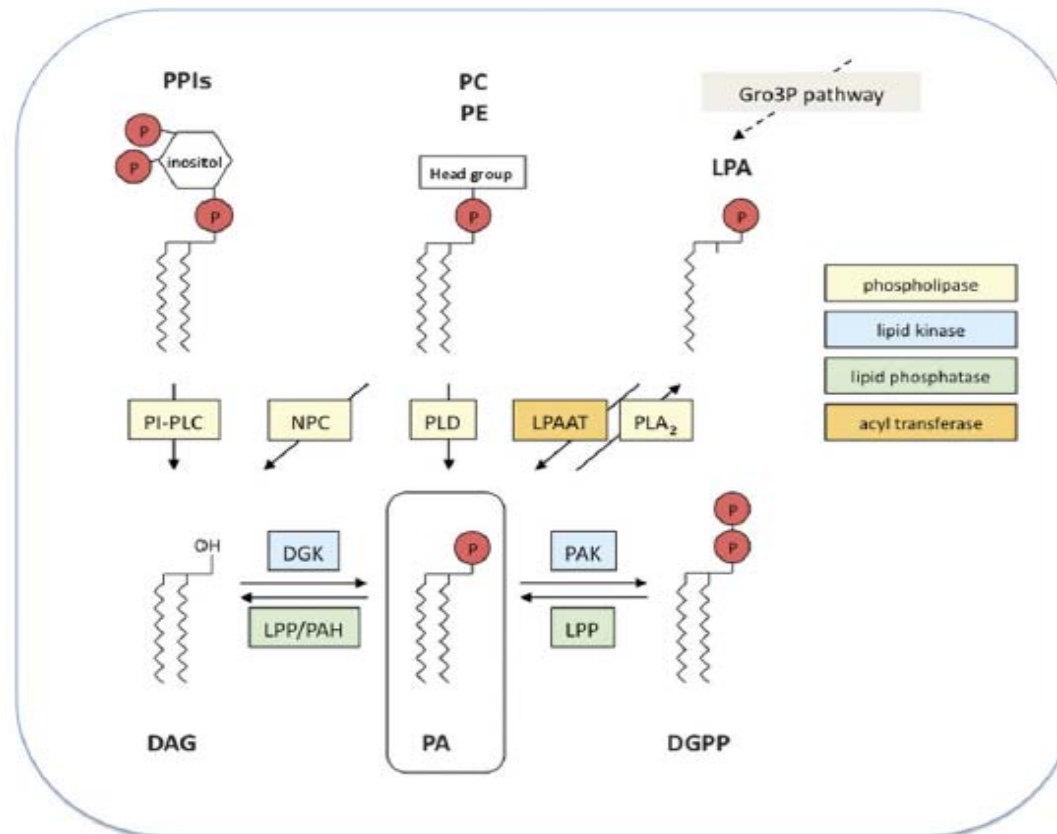
PLD Type	Signature Property				
	Ca <sup>2+</sup>	PI(4,5)P <sub>2</sub>	Oleate	Substrate preference	Subcellular location & others
PLDα1	mM/μM	-/+	-	PC > PE	Translocation between cytosol & IM, PM, most PM
α3	mM	-/?	-	PC>PE, PG	Mostly PM
ε	mM/μM	-/?	-/+	PC=PE>PG	PM; Lost Ca <sup>2+</sup> -binding residues in C2
PLDβ1	μM	+	-	PC = PE	Ca <sup>2+</sup> -binding at C2 and catalytic region, actin binding
PLDγ1	μM	+	-	PE > PC	Mostly IM; Differ from γ2 in PIP2 & Triton effect
γ2	μM	+	-		AA changes in DRY motif
PLDδ	μM-mM	+	+	PE> PC	PM, tubulin binding
PLDζ1	No	+	-	PC	PM
ζ2	#				tonoplast



## PLD: sustratos, localización y patrón de expresión

- **Sustratos: PC, PE, PG, no PI**
- **Selectividad sustrato**
- **Presentes en la fracción soluble y particulada, sufren traslocación desde el citosol hacia la membrana en rta a estrés.**
- **Patrón de expresión diferencial en diferentes órganos y en estrés**
- **Poco se conoce sobre regulación de la expresión**

## Metabolismo de ácido fosfatídico

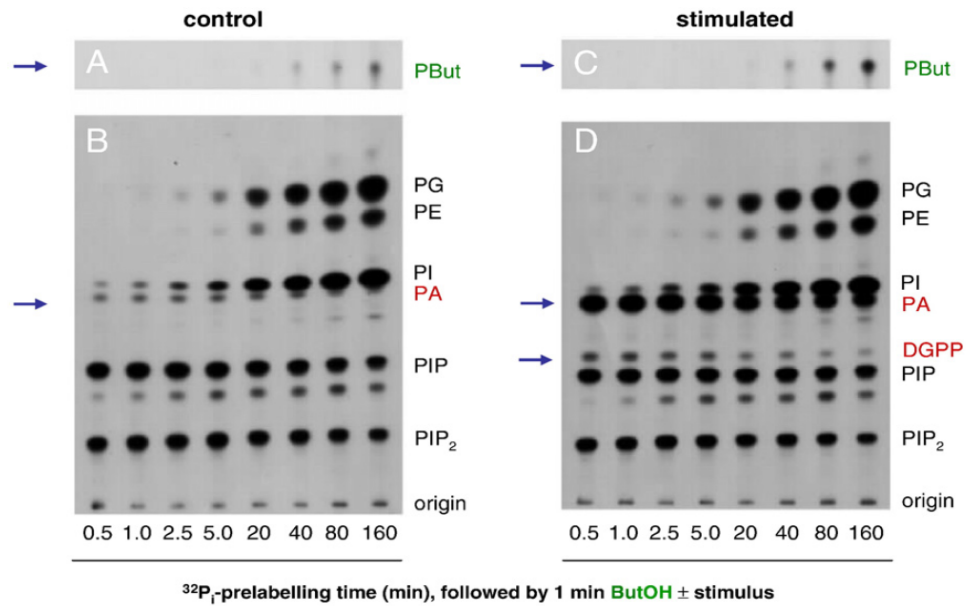
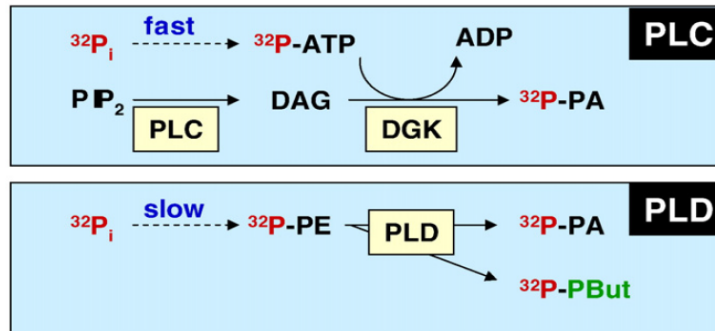


**Fig. 1.** Overview of PA formation and degradation pathways in plants, showing both 'signalling' and 'lipid metabolism' routes. Adapted from general eukaryotic pathways presented in Kooijman and Testerink (2010). Abbreviations: PE, phosphatidylethanolamine; LPA, lyso-phosphatidic acid; PA, phosphatidic acid; Gro3P, glycerol 3-phosphate; PI-PLC, PPI-hydrolysing phospholipase C; LPAAT, LPA acyltransferase; PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>; DGPP, DAG pyrophosphate. Other abbreviations are given in the Abbreviations section.

## ¿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 $^{32}\text{P}$



# Reacción de trans-fosfatidilación

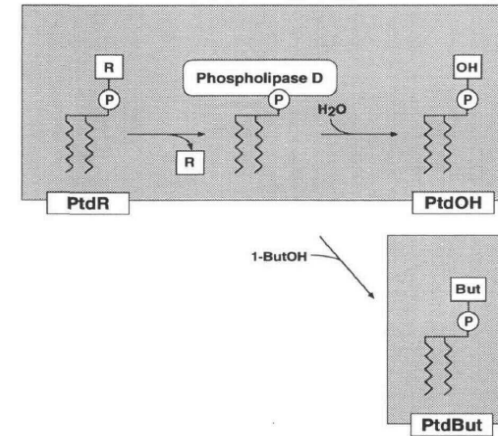
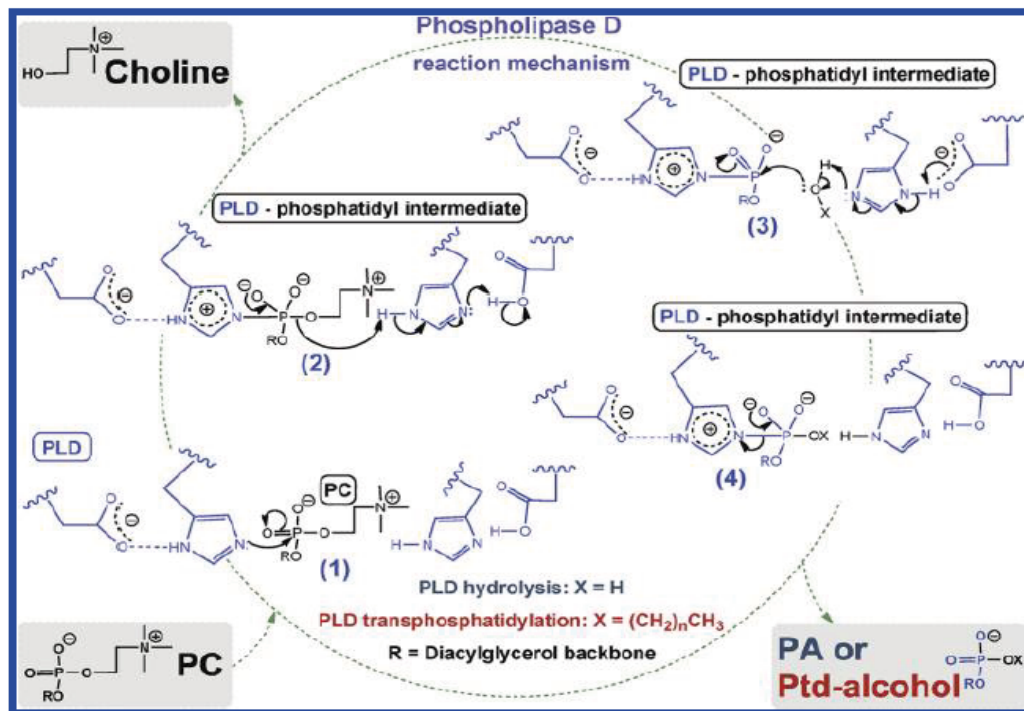


Figure 5. Proposed PLD superfamily reaction mechanism based on biochemical studies of bacterial PLD enzymes. The histidine of the conserved HKD motif mediates a nucleophilic attack on the phosphate group of the lipid substrate, yielding a covalent intermediate. A water molecule or a primary alcohol completes the hydrolysis or transphosphatidylation, respectively.

## 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: efectos fisiológicos de la manipulación genética

PLD	Manipulation	Physiological Effect
PLD $\alpha$ 1	$\alpha$ -AS	Increased water loss; decreased drought tolerance Decreased wounding-induced jasmonic acid production Increased seed longevity/aging tolerance Retarded ABA- and ethylene-promoted senescence of post-harvest leaves Enhanced freezing tolerance
	$\alpha$ 1-KO	Delayed closing of opened stomata, delayed opening inhibition on closed stomata, Decreased root growth under salt stress
$\alpha$ 3	$\alpha$ 3-KO	Increased sensitivities to salinity and water deficiency; flower later under drought
	$\alpha$ 3-OE	Decreased sensitivities to salinity and water deficiency; flower earlier under drought
$\epsilon$	$\epsilon$ -KO	Decreased biomass, decreased lateral root growth
	$\epsilon$ -OE	Increased biomass accumulation, lateral root growth and root hair length under severe nitrogen deprivation
PLD $\delta$	$\delta$ -KO	Increased programmed cell death by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Decreased freezing tolerance Decreased root growth under salt stress
	$\delta$ -OE	Enhanced freezing tolerance
	$\alpha$ 1 $\delta$ -KO	Decreased root growth under salt stress

AS: anti-sense suppression

KO: knockout null mutant

OE: overexpression

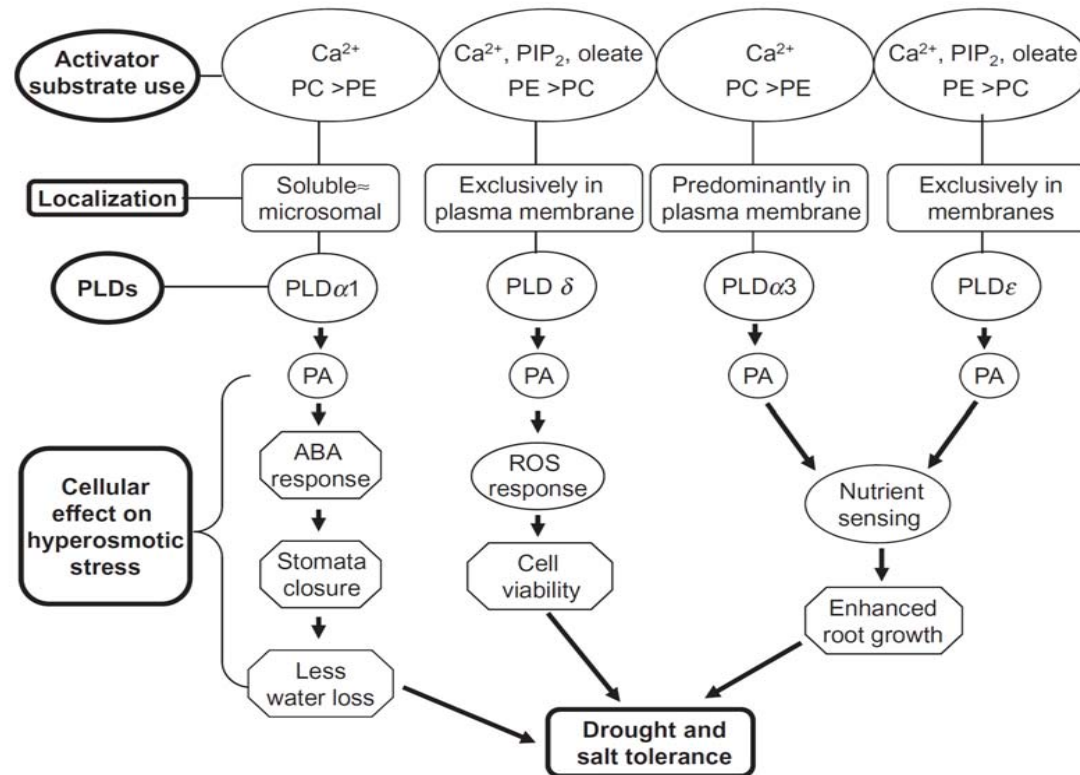
## PLD: modos de acción en la respuesta celular

- **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.



# Señalización vía PLD en plantas

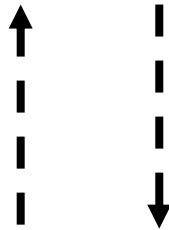
## Participación en la respuesta al estrés abiótico



**Figure 2.** PLD family involved in salt and drought stresses in different pathways. Different PLDs exhibit distinguishable reaction conditions, substrate preferences and subcellular localization. Four members of PLD family are found to be involved in drought and salt responses through different pathways.

## PLD: modos de acción en la respuesta celular

Funciones únicas de diferentes PLDs



Diferentes funciones para la misma PLD

Varias isoformas son expresadas en respuesta al estrés salino indicando redundancia de funciones. Sin embargo, la manipulación genética de las mismas demostró fenotipos específicos inducidos por estrés.

## PLD: efectos fisiológicos de la manipulación genética

PLD	Manipulation	Physiological Effect
PLD $\alpha$ 1	$\alpha$ -AS	Increased water loss; decreased drought tolerance Decreased wounding-induced jasmonic acid production Increased seed longevity/aging tolerance Retarded ABA- and ethylene-promoted senescence of post-harvest leaves Enhanced freezing tolerance
	$\alpha$ 1-KO	Delayed closing of opened stomata, delayed opening inhibition on closed stomata, Decreased root growth under salt stress
$\alpha$ 3	$\alpha$ 3-KO	Increased sensitivities to salinity and water deficiency; flower later under drought
	$\alpha$ 3-OE	Decreased sensitivities to salinity and water deficiency; flower earlier under drought
$\epsilon$	$\epsilon$ -KO	Decreased biomass, decreased lateral root growth
	$\epsilon$ -OE	Increased biomass accumulation, lateral root growth and root hair length under severe nitrogen deprivation
PLD $\delta$	$\delta$ -KO	Increased programmed cell death by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Decreased freezing tolerance Decreased root growth under salt stress
	$\delta$ -OE	Enhanced freezing tolerance
	$\alpha$ 1 $\delta$ -KO	Decreased root growth under salt stress

AS: anti-sense suppression

KO: knockout null mutant

OE: overexpression

## PLD: propiedades únicas de una enzima particular

- i. Su modo de activación y regulación
- ii. 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.

## PLD $\alpha$ 1: propiedades únicas de una enzima particular

PLD $\alpha$ 1: es la isoforma mas abundante en plantas

Señal de estrés hídrico



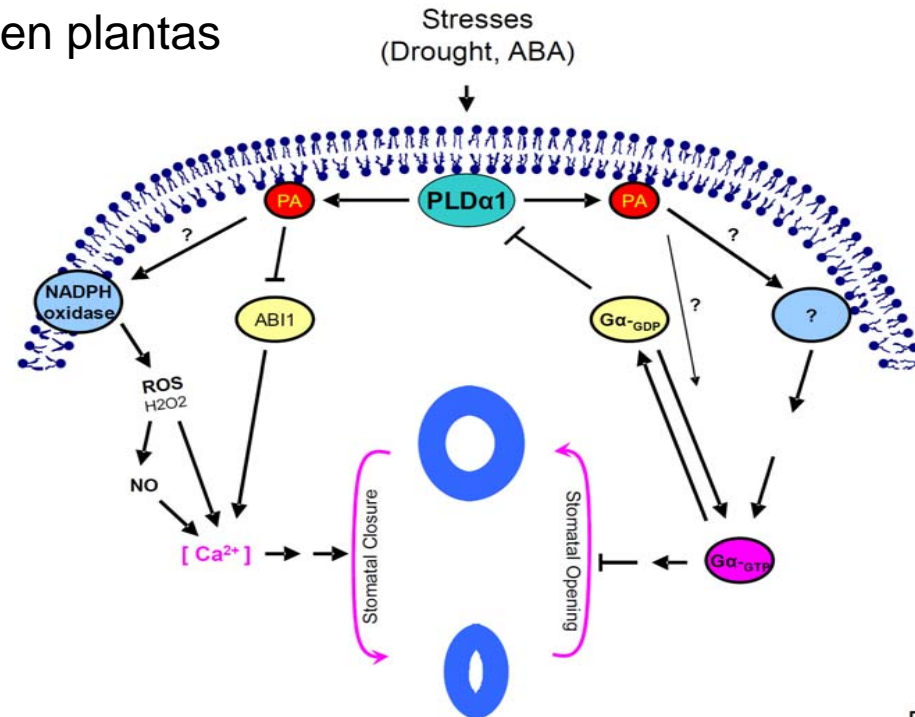
Aumenta el nivel de ABA



Las hojas cierran los estomas

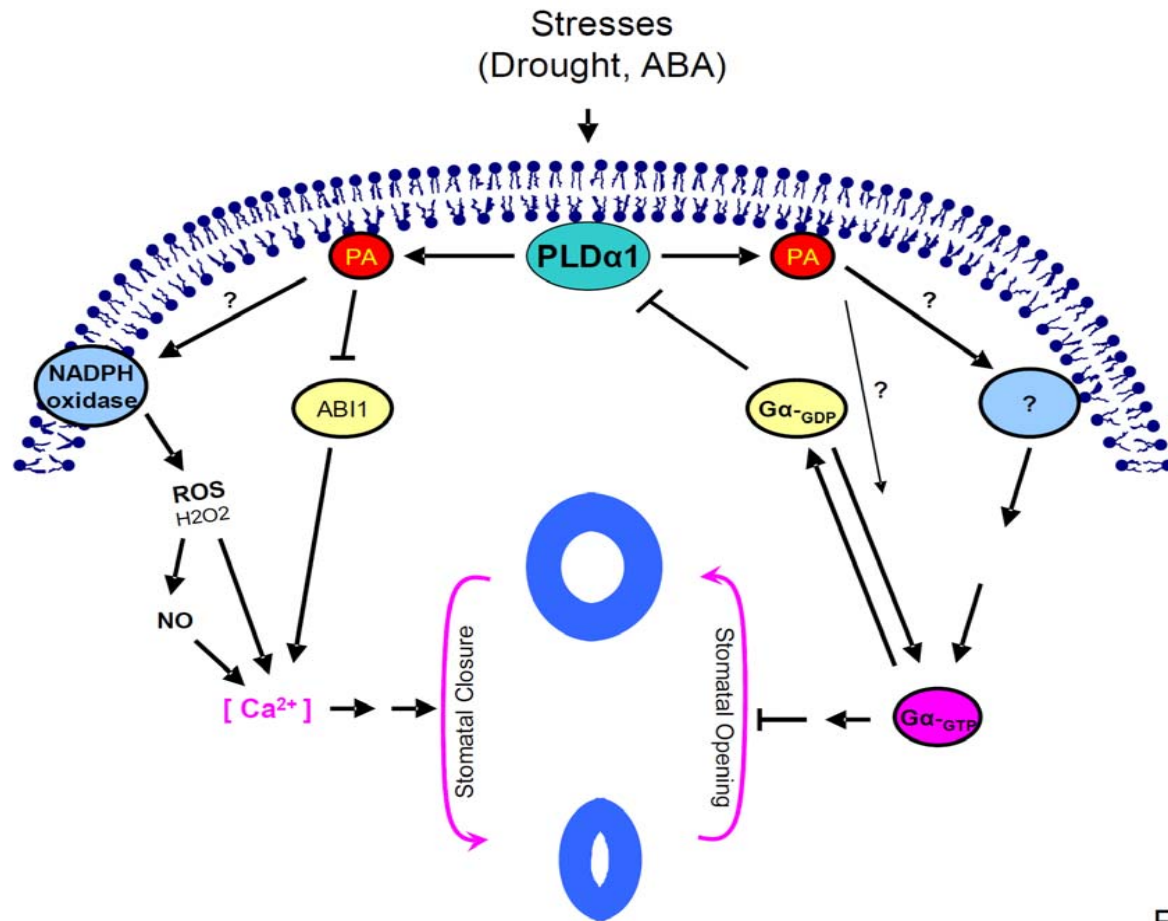


Disminuye la perdida de agua por transpiración

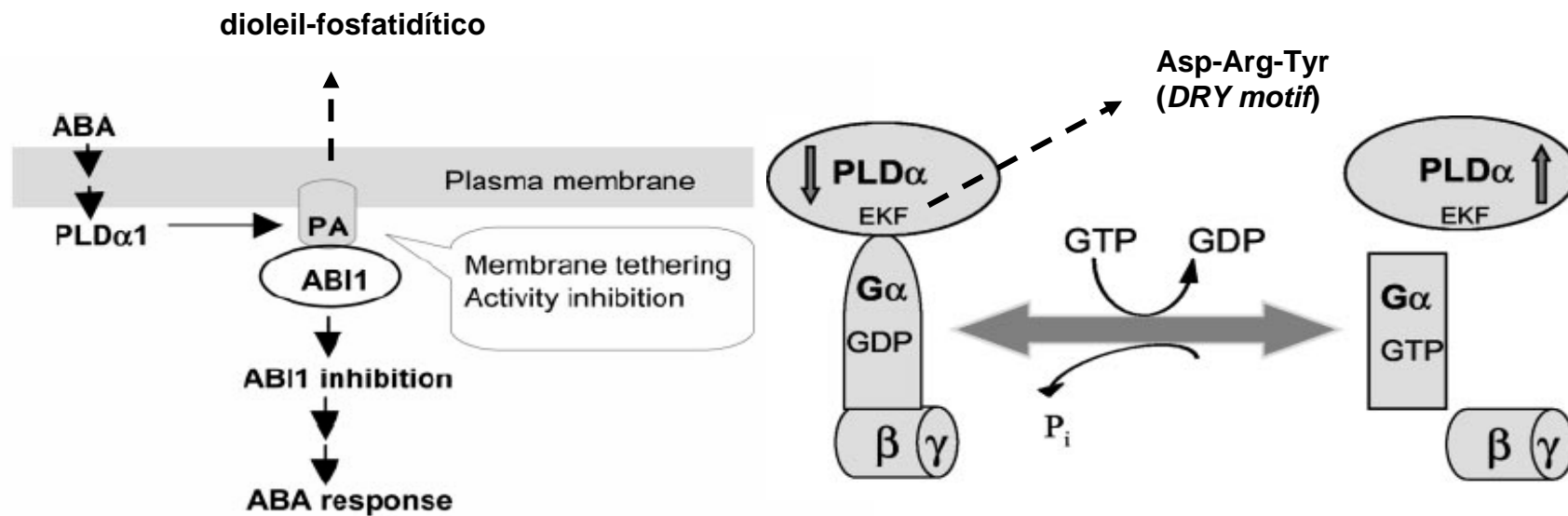


Fi

# PLD $\alpha$ 1: propiedades únicas de una enzima particular



## PLD $\alpha$ 1: propiedades únicas de una enzima particular



**Fig. 7.** Model of the interaction between PLD $\alpha$ 1/PA and ABI1 involved in ABA signaling. ABA stimulates PLD $\alpha$ 1 activity, resulting in the increase of PA production. PA binds to ABI1, which tethers it to the plasma membrane, reduces its translocation to nuclei, and also decreases PP2C activity. Thus, PLD $\alpha$ 1/PA promotes ABA signaling.

## PLD: modo de activación y regulación. Papel dual

PLD $\alpha$ 1: participa en la respuesta a ABA regulando el movimiento del estoma, Si el estrés se vuelve persistente favore la degradación de la membrana

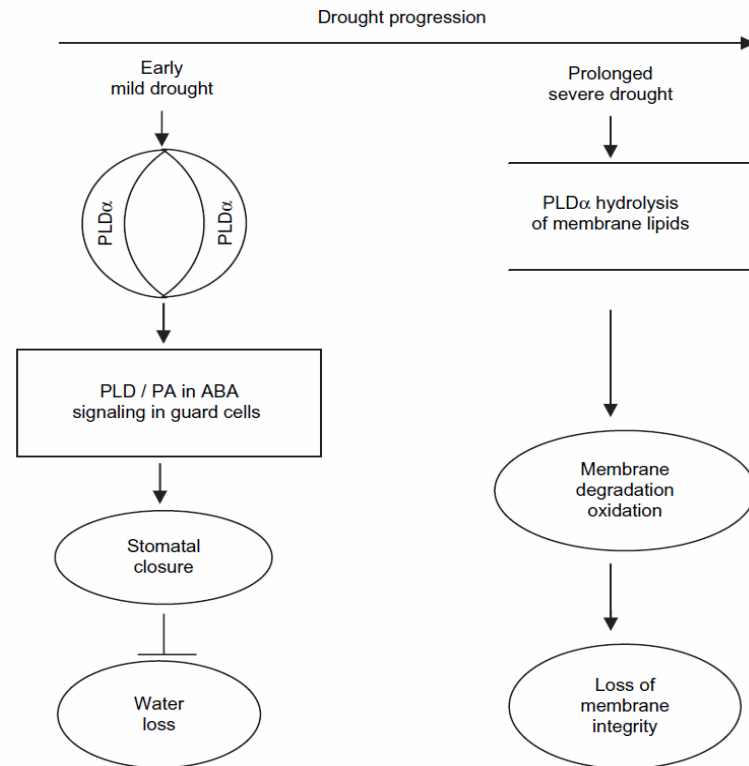


Figure 6. A Model Depicting the Dual Function of PLD $\alpha$ 1 at Different Stages of Water Deficits.

Increased PLD  $\alpha$ 1 activity promotes stomatal closure via signal transduction and decreases water loss at early phases of water deficits. However, under severe, prolonged drought, a high PLD $\alpha$  activity increases lipid hydrolysis and membrane degradation. This promotes membrane oxidation and loss of membrane integrity, rendering plants susceptible to drought damage.

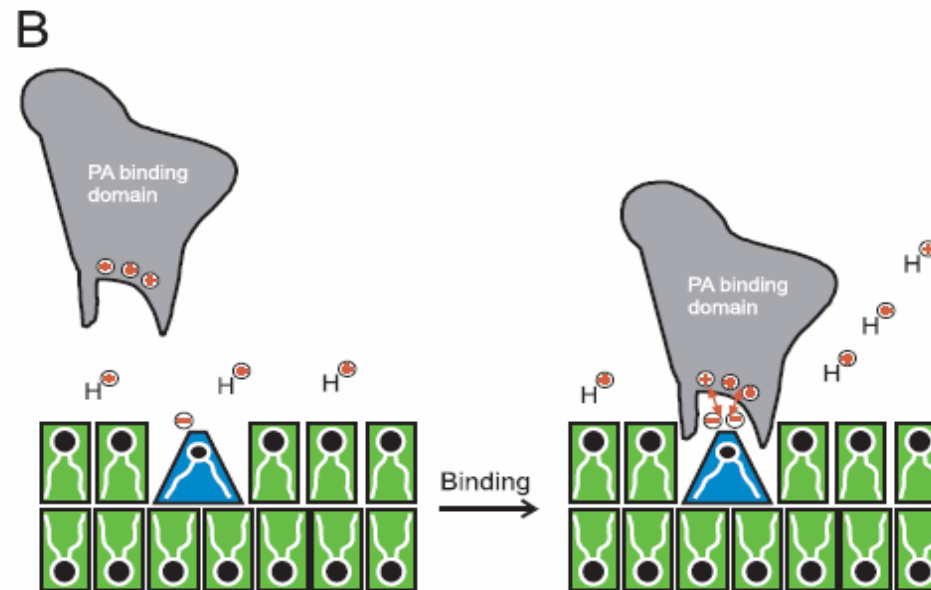
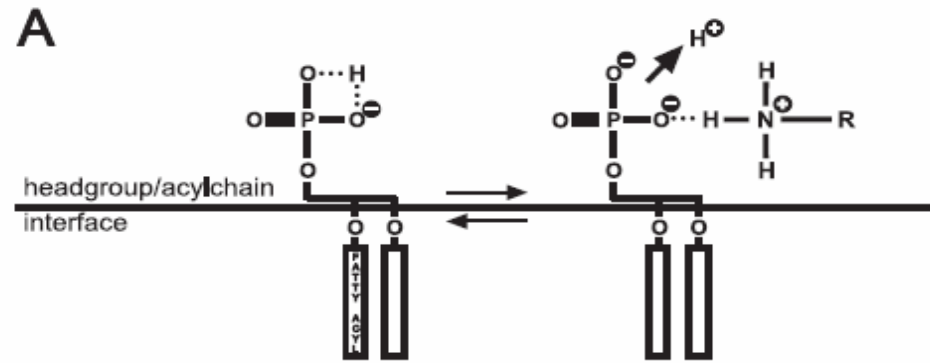


## Mecanismo de acción: interacción PA-proteína

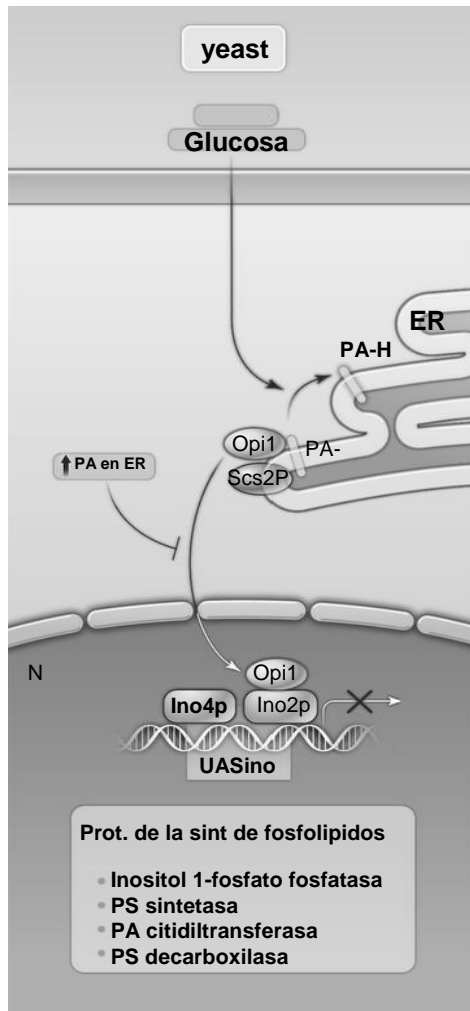
A diferencia de otros fosfolípidos no se conoce un dominio conservado que participe en la unión a PA con cierta especificidad.

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

# Electrostatic/hydrogen bond switch



## Lipid signaling and homeostasis: PA-is better than PA-H?



Ausencia de inositol - Opi-PA en el RE

Presencia de inositol- PA es consumido para formar PI  
Opi migra al núcleo y reprime genes involucrados  
en la síntesis de inositol.

Acidificación del citosol esta acoplada al metabolismo  
de los fosfolípidos porque libera a Opi de RE y migra  
al N.

Modelo: ausencia de glucosa, disminuye el pH i, Opi  
queda liberado del RE y migra al N.

## PLD/ PA: perspectivas futuras

-PA es el más simple de los fosfolípidos, esta presente en pequeñas cantidades, (0,5 -1,5 nmol/gr de peso seco), constituye menos del 1% del total de fosfolípidos, 20 veces que PC.

-PA es sin duda un lípido señal, sería interesante disponer de biosensores lipídicos que nos den información espacio- temporal durante le mecanismo de señalizacion.

-Limitante: encontrar el dominio de unión de una proteína que una PA

-Foco esta puesta en develar la estructura cristal de una proteína con el PA unido para tener idea de la región de binding.

-PLD, el conocimiento de sus propiedades bioquímicas, la estructura de sus dominios y la organización genómica determinó la diversidad respecto de otros organismos.

-PLD, falta conocer aspectos de su regulacion. Cuales son los blancos celulares de PA, como PLD-PA interaccionan con el efector afectando la señal. Cuales son las funciones del grupo polar liberado por PLD. Develar como el cambio en la composición de lípidos y estructura de la membrana se relacionan con la respuesta fisiológica.