

UDC 577.125.53:52:57.044:017.3

Молекулярные составляющие метаболизма фосфо- и гликолипидов в мембранах растительных клеток в условиях дефицита фосфора

Н. Б. Светлова

Учебно-научный центр «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 64/13, Киев, Украина, 01601

svyetlova@rambler.ru

Обзор посвящен одной из составляющих молекулярной регуляции метаболизма фосфора в растительном организме – липидным компонентам мембранных структур. Изменение направленности метаболизма фосфо- и гликолипидов является показателем доступности фосфора растениям. Компенсаторные механизмы замещения фосфолипидов нефосфоросодержащими гликолипидами в мембранах позволяют растениям адаптироваться к условиям ограничения поступления фосфатов (P_i), а фосфолипиды служат резервным пулом клеточного фосфора при реутилизации ионов в донорно-акцепторной системе. Проанализированы механизмы транскрипционной регуляции генов, причастных к синтезу фосфо- и гликолипидов в условиях дефицита P_i .

Ключевые слова: дефицит фосфора, моногалактозилдиацилглицерол, дигалактозилдиацилглицерол, сульфохиновозилдиацилглицерол, фосфатидилглицерол, гены MGD, DGD, SQD, PLDz, NCP.

Поддержание гомеостаза и контроль метаболизма определяются клеточной сигнализацией в донорно-акцепторной системе растений. При ответе растительного организма на изменение условий окружающей среды определяющая роль в контроле клеточной сигнализации принадлежит фосфору. Как неотъемлемый структурный и функциональный компонент многих ключевых макромолекул – нуклеиновых кислот, высокоэнергетических соединений (AMP, ADP, ATP), фосфолипидов мембран – фосфор участвует в процессах обмена веществ в растениях: перенесении энергии, ассимиляции углерода, дыхании, биосинтезе липидов и регулировании активности ферментов [1–4].

В процессе эволюции у растений сформировались различные адаптационные механизмы в ответ на недостаток фосфатов (P_i). Снижение концентрации ионов фосфора в растительной клетке до критически минимального уровня является сигналом

для запуска ответных стрессовых реакций организма, приводящих к активации альтернативных метаболических путей, направленных на мобилизацию и уменьшение использования фосфора в растениях [3, 4]. Поддержание постоянных его концентраций в организме осуществляется поступлением P_i снаружи, сохранением, ремобилизацией и реутилизацией фосфора в донорно-акцепторной системе растений соответственно с приоритетностью в распределении ассимилятов в период их роста и развития [4, 5].

Один из регуляторных механизмов поддержания оптимальных концентраций ионов фосфора в растительной клетке связан с модификацией мембранных структур и изменением скорости и направленности метаболизма входящих в их состав липидных компонентов всех субклеточных компартментов.

Контроль метаболизма липидов в процессе биогенеза органелл заключается в координированном взаимодействии между митохондриями, ядром и хлоропластами в растениях. Фотосинтетические

мембраны организмов, начиная с цианобактерий и заканчивая семенными растениями, содержат два нейтральных галактолипида – моно- и дигалактозилдиацилглицерол (МГДГ и ДГДГ) и два анионных – фосфоросодержащий фосфатидилглицерол (ФГ) и сульфурсодержащий сульфохинозилдиацилглицерол (СХДГ). Основными мажорными нейтральными липидами плазматических мембран являются галактолипид ДГДГ, а также фосфолипид фосфатидилхолин (ФХ). Кроме ФХ, среди присутствующих в плазматических мембранах фосфолипидов содержатся также фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилинозитол (ФИ) и в незначительных количествах – ФГ [6–8].

В клетках растений СХДГ локализован исключительно в мембранах пластид, в то время как ФГ – как в пластидных, так и в небольших количествах в других мембранах. ФГ единственный из фосфолипидов содержится в тилакоидах и внутренней мембране хлоропластов. Треть органических фосфатов в растениях, в частности, у *Arabidopsis thaliana* входит в состав фосфолипидов [9].

Развитая система мембранных структур, а также разнообразие состава липидов мембран позволяют клеткам функционировать с минимальным потреблением фосфора, что имеет определяющее значение для растений, поскольку недостаток этого химического элемента чаще всего ограничивает их рост и развитие [3, 10].

Транскрипционный контроль метаболизма фосфо- и гликолипидов в условиях дефицита P_i . Важной составляющей регуляторной системы растений, причастной к контролю ответа организма на условия недостатка фосфора, являются гены, контролирующие синтез, деградацию и трансформацию липидных компонентов, в частности, фосфо- и гликолипидов. Количественные изменения последних являются важным показателем недостатка P_i у растений (таблица).

На сегодня известны три гена, участвующих в биосинтезе МГДГ: *MGD1*, *MGD2* и *MGD3*, составляющих мультигенное семейство синтаз МГДГ (КФ 2.4.1.46). Различают два типа МГДГ-синтаз: тип А (*MGD1*) и тип В (*MGD2* и *MGD3*) [11–14].

МГДГ-синтаза типа А экспрессируется в фотосинтетических тканях на протяжении роста и раз-

вития растений в присутствии P_i . Она отвечает за массовый синтез МГДГ, необходимый для биогенеза внутренних мембран хлоропластов и наращивания сети тилакоидов.

Синтаза МГДГ типа В не участвует в синтезе галактолипидов при оптимальных условиях насыщения P_i и экспрессируется лишь при его дефиците у растений. МГДГ-синтаза, синтезируемая при участии генов *MGD* типа В, преимущественно локализуется в нефотосинтетических тканях: в соцветиях (*MGD2*) и корнях (*MGD3*). Экспрессия генов *MGD* этого типа является важной для запуска альтернативного пути биосинтеза галактолипидов при дефиците P_i .

Функциональное распределение между внутренней (*MGD1*) и внешней мембранами (*MGD2/3*) хлоропластов, отвечающее степени обеспеченности растений фосфором, преимущественно контролируется уровнем фитогормонов и интенсивностью освещения. В частности, экспрессия гена *MGD1* регулируется интенсивностью освещения и содержанием цитокининов. P_i -зависимая экспрессия *MGD2/3* угнетается цитокининами и индуцируется ауксинзависимыми сигнальными путями [15, 16].

Биосинтез ДГДГ регулируется транскрипцией генов ДГДГ-синтаз (КФ 2.4.1.241): *DGD1* и *DGD2* [17]. Исследование растений *dgd1/pho1* показало, что наличие мутации *PHO1*, блокирующей поступление P_i в ксилему, в комбинации с мутацией *DGD1* приводит к восстановлению биосинтеза ДГДГ [18]. Поскольку мутация *DGD1* характеризуется наличием стоп-кодона на участке кодирования *DGD1*, что ведет к сокращению на 90 % биосинтеза ДГДГ [12], восстановление его содержания свидетельствует о существовании *DGD1*-независимого пути биосинтеза галактолипидов. Создание генетически трансформированных растений *dgd1* и *dgd1/pho1* *A. thaliana* привело к идентификации второго гена, отвечающего за синтез ДГДГ – *DGD2*, активируемого при дефиците P_i [17].

Конструирование модельной системы в условиях *in vitro* с использованием МГДГ и уридин-5-дифосфат (UDP)-галактозы в качестве субстрата позволило изучить активность синтазы ДГДГ. При этом определено, что непосредственно UDP-галактоза (КФ 2.4.1.46), а не МГДГ является донором га-

Транскрипционная регуляция генов *A. thaliana*, участвующих в синтезе и трансформациях глико- и фосфолипидов в условиях дефицита P_i

| Ген-мутант (локус №) | Особенности функционирования | Трансгенная линия генетических моделей растений | Характеристика |
|-----------------------------|---|---|--|
| <i>SQD1</i> (At4g33030) | Биосинтез сульфолипида; локализован в мембранах хлоропластов; кодирует UDP-сульфохиновозосинтазу | <i>sqd1</i> (At4g33030.1) | Уменьшение синтеза СХДГ; не имеют фенотипических особенностей при оптимальных условиях выращивания [24, 25] |
| <i>SQD2</i> (At5g01220) | Биосинтез сульфолипида; локализован на внутренней мембране хлоропластов; кодирует UDP-сульфохиновозо-ДАГ-сульфохиновозилтрансферазу (КФ 2.4.1.8); передает сульфохиновозиловые группы с UDP-сульфохиновозы на ДАГ | <i>sqd2</i> (At5g01220.1) | Уменьшение синтеза СХДГ; угнетение роста в условиях дефицита P_i [28, 29] |
| <i>MGD1</i> (At4g31780) | Биосинтез МГДГ при наличии P_i ; локализован на внутренней мембране хлоропластов; кодирует синтазу МГДГ типа А (UDP-галактозо-1,2-ДАГ-галактозилтрансферазу) | <i>mgd1</i> (At4g31780.1; At4g31780.2) | Сокращение синтеза МГДГ в листьях до 75 %; имеют желто-зеленые листья в связи с нарушением биогенеза хлоропластов [11, 15, 39, 50] |
| <i>MGD2</i> (At5g20410) | Биосинтез МГДГ в отсутствие P_i ; не вовлечен в синтез МГДГ при наличии P_i ; локализован на внешней мембране хлоропластов; кодирует синтазу МГДГ типа В (UDP-галактозо-1,2-ДАГ-галактозилтрансферазу); индуцируется в нефотосинтетических тканях | <i>mgd2</i> (At5g20410.1) | Уменьшение содержания ДГДГ и изменение состава жирных кислот галактолипидов в листьях и корнях в условиях недостатка P_i ; не отмечены биохимические и фенотипические изменения при оптимальных условиях обеспечения P_i [11, 15, 39, 50] |
| <i>MGD3</i> (At2g11810) | Биосинтез МГДГ в отсутствие P_i ; не способствует синтезу галактолипидов при наличии P_i ; локализован на внешней мембране хлоропластов; участвует в метаболических процессах жирных кислот; кодирует МГДГ-синтазу типа В (UDP-галактозо-1,2-ДАГ-галактозилтрансферазу) | <i>mgd3</i> (At2g11810.1; At2g11810.2) | Сокращение содержания ДГДГ и изменение состава жирных кислот галактолипидов побегов и корней в условиях недостатка P_i ; не зафиксированы биохимические и фенотипические изменения при оптимальных условиях обеспечения P_i [11, 15, 39, 50] |
| <i>DGD1</i> (At3g11670) | Биосинтез ДГДГ; локализован на внешней мембране хлоропластов, в митохондриях; обеспечивает окончательную сборку галактолипидов в фотосинтетических мембранах; стабилизирует субъединицы <i>PsaD</i> , <i>PsaE</i> основного комплекса ФСII; кодирует синтазу ДГДГ (UDP-галактозо-МГДГ-галактозилтрансферазу); катализирует перенесение галактозы с UDP-галактозы на молекулу-акцептор | <i>dgd1</i> (At3g11670.1; At3g11670.2) | Сокращение синтеза ДГДГ до 90 %; замедление роста, дефекты в окраске семян, бледные листья, уменьшение фотосинтетического потенциала и изменение тилакоидной структуры (формирование «свернутых» тилакоидов) [12, 39, 51] |
| <i>DGD2</i> (At4g00550) | Биосинтез ДГДГ; локализован на внешней мембране хлоропластов; кодирует синтазу ДГДГ (UDP-галактозо-МГДГ-галактозилтрансферазу); катализирует перенесение галактозы с UDP-галактозы на молекулу-акцептор | <i>dgd2</i> (At4g00550.1) | Не имеют никаких фенотипических особенностей при нормальных условиях выращивания [12, 17, 39] |
| <i>PLDz1</i> (At3g16785) | Деградация фосфолипидов и синтез галактолипидов в корнях; кодирует подсемейство белков РХРН-PLD фосфолипазы D; регулирует архитектуру корней в условиях P_i -дефицита | <i>pldz1</i> (At3g16785.1) | Угнетение роста главного корня и элонгация боковых корней в условиях дефицита P_i [34–36] |
| <i>PLDz2</i> (At3g05630) | Продуцирование фосфатидной кислоты при P_i -дефиците; индуцируется в корнях и побегах при недостатке P_i ; кодирует подсемейство белков РХРН-PLD фосфолипазы D; способствует гидролизу ФХ и ФЭ с образованием ДАГ; не регулирует архитектуры корневых волосков при P_i -дефиците | <i>pldz2</i> (At3g05630.1) | Нарушение гидролиза фосфолипидов, снижение способности к накоплению галактолипидов; изменения в морфологии корней при дефиците P_i [34–36] |

Окончание таблицы

| Ген-мутант (локус №) | Особенности функционирования | Трансгенная линия генетических моделей растений | Характеристика |
|----------------------------|---|---|---|
| <i>NPC4</i> (At3g03530) | Деградация фосфолипидов и синтез галактолипидов в условиях дефицита P _i ; локализован в плазматической мембране; кодирует неспецифическую фосфолипазу C4 | <i>npc4</i> (At3g03530.1) | Фенотипические и физиологические особенности не описаны [31, 52] |
| <i>NPC5</i> (At3g03540) | Деградация фосфолипидов и синтез галактолипидов в листьях в условиях дефицита P _i ; локализован в цитозоле; кодирует неспецифическую фосфолипазу C | <i>npc5</i> (At3g03540.1) | Фенотипические и физиологические особенности не описаны [37] |
| <i>PGP1</i> (At2g39290) | Биосинтез ФИ; локализуется в пластидах и митохондриях; кодирует фосфатсинтазу ФГ | <i>pgp1</i> (At2g39290.1) | Изменение структуры хлоропластов, но при этом наблюдаются нормальные митохондрии; бледно-зеленая окраска [20, 21] |

лактозы для ДГДГ, синтез которого обусловлен уровнем экспрессии *DGD2*. Создание такой модельной системы подтвердило зависимость синтеза ДГДГ от наличия UDP-галактозы у высших растений [19].

Наличие дополнительного пути синтеза галактолипидов, независимого от транскрипции генов *DGD1* и *DGD2*, обнаружено у модифицированных растений *dgd1/dgd2*. Поскольку растения *dgd1* и *dgd2* несут ноль-мутации, у них существует альтернативный третий путь синтеза ДГДГ, связанный с галактолипидгалактозилтрансферазой (КФ 2.4.1.184), локализованной в мембранах хлоропластов и синтезирующей ДГДГ из МГДГ в отсутствие UDP-галактозы. Этот альтернативный путь не причастен к синтезу галактолипидов в растениях в оптимальных условиях питания [17].

Синтазы МГДГ (тип В) и ДГДГ, синтезируемые в результате экспрессии генов *MGD2*, *MGD3* и *DGD2* в условиях недостатка P_i, содержатся во внешней мембране хлоропластов [13, 17]. Все предшественники, участвующие в синтезе МГДГ, транспортируются из эндоплазматического ретикулума (ЭР) из-за отсутствия активного пути синтеза галактолипидов в растениях, характерного для прокариотов [18].

Следует отметить, что ДГДГ, синтезируемая в условиях дефицита P_i, преимущественно локализуется в нефотосинтетических мембранах; ферменты, вовлеченные в биосинтез этого галактолипида, содержатся как в пластидных, так и в других мембранах. Поэтому гены *MGD2*, *MGD3* и *DGD2*, вероят-

но, также привлечены к биосинтезу галактолипидов нефотосинтетических мембран, в частности ЭР, хотя на сегодня непосредственные доказательства, подтверждающие этот факт, отсутствуют.

Гены семейства *PGP* контролируют биосинтез фосфолипидов. Изоферменты фосфатсинтазы ФГ (КФ 2.7.8.5) у растений *A. thaliana* кодируются двумя генами: *PGP1* и *PGP2* [20]. *PGP1* кодирует предшественник фермента, локализованного как в пластидах, так и в митохондриях. Синтез микросомных изоферментов контролирует *PGP2* [20, 21]. Важность этого гена для биосинтеза ФГ в пластидах показана на модифицированных растениях *A. thaliana*, у которых *PGP1* частично или полностью инактивирован [21–23]. Недосток ФГ в митохондриях, в отличие от пластид, компенсируется, очевидно, за счет его доставки из ЭР, где ФГ синтезируется при участии гена *PGP2* [21].

Семейство *SQD* представлено двумя генами: *SQD1* и *SQD2*. В клетках растений биосинтез СХДГ происходит исключительно в пластидах [24]. На первом этапе UDP-сульфохинозосинтаза (КФ 3.13.1.1), контролируемая *SQD1*, формирует активированную углеводную производную от сульфита и UDP-глюкозы [25–28]. На следующем этапе синтаза СХДГ, кодируемая в растениях *SQD2* и содержащаяся во внутренней мембране хлоропластов растений, передает сульфохинозил-группы с UDP-сульфохинозосы на диацилглицерол (ДАГ) [27–29].

Для фосфатсинтазы ФГ фотосинтетических мембран субстратом является ДАГ, синтезированный в

пластидах. Вместе с тем, синтаза СХДГ, как и синтазы МГДГ и ДГДГ, в качестве субстрата может использовать ДАГ, синтезируемый не только в пластидах, но и импортируемый из ЭР [30]. Такая способность гликолипидсинтаз вместе с экспрессией определенных генов, необходимых для преобразования ДАГ в результате деградации фосфолипидов в СХДГ и ДГДГ, являются молекулярными основами для существенных трансформаций состава мембранных липидов в условиях дефицита P_i [11, 17, 24, 25, 29, 31–33].

Гены, контролирурующие синтез фосфолипаз, вовлечены в деградацию фосфолипидов, синтез галактолипидов, ДАГ и фосфатидной кислоты (ФК) в растениях. В частности, гены *PLDz* кодируют подсемейство белков РХРН-PLD фосфолипазы D (КФ 3.1.4.4), вызывающей деградацию фосфолипидов и образование галактолипидов как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих клетках. Активация транскрипции *PLDz1* приводит к деградации фосфолипидов в корнях. *PLDz2* экспрессируется при дефиците P_i как в корнях, так и в побегах и инициирует гидролиз ФХ и ФЭ с образованием ДАГ [34–36].

Биосинтез неспецифичной фосфолипазы С (КФ 3.1.4.3) контролируется транскрипцией гена *NPC5*. В условиях дефицита P_i фосфолипаза С вызывает деградацию фосфолипидов и синтез галактолипидов в листьях растений [37].

Исследование показателей фосфатазной и нуклеазной активностей генетически модифицированных растений *A. thaliana*, выращиваемых при различных концентрациях P_i , и последующая идентификация генов представляют ценную информацию о молекулярных механизмах регуляции гомеостаза P_i . Применение дифференциальной или субтрактивной гибридизации ДНК-микрочипов выявило, что транскрипционный уровень нескольких сотен генов регулируется изменением концентрации P_i [38]. Функции этих генов достаточно разные, что подчеркивает важную роль фосфора для оптимального функционирования клеток. Результаты различных манипуляций с генами позволили расширить представления об их регуляторной роли в гомеостазе P_i .

Анализ уровня транскрипции генов определил, что в условиях дефицита фосфора к биосинтезу ли-

пидов растений *A. thaliana* причастны 44 гена (7%). Из них только два оказались супрессированными. Около 50% генов, связанных с липидным обменом, экспрессируются на протяжении двух дней после возникновения дефицита P_i . Преимущественно это гены, кодирующие ферменты, вовлеченные в деградацию фосфолипидов, синтез галакто- и сульфолипидов, а также – в биосинтез ДАГ (рис. 1) [39, 40]. При этом транскрипционная регуляция немногих из них, участвующих в биосинтезе фосфолипаз D (*PLDz2*) и С (*NPC5*), индуцируется в условиях дефицита P_i [40, 41].

Экспрессия генов *MGD2* и *MGD3* происходит в 4–10 раз быстрее по сравнению с *DGD1* и *DGD2*, индуцирование которых, в свою очередь, наблюдается лишь после действия среднего и длительного по времени дефицита P_i . Кроме того, гены, кодирующие UDP-галактозу, – UDP-глюкозо-4-эпимераза и UDP-галактозо-4-эпимераза (*UGE2* и *UGE5*), преобразующие UDP-глюкозу в UDP-галактозу (предшественники галактолипидов), также экспрессируются при среднем и продолжительном дефиците P_i . Для сравнения: гены, кодирующие UDP-сульфохинозосу – UDP-сульфохинозосинтаза и UDP-сульфохинозил-ДАГ-сульфохинозилтрансфераза (*SQD1* и *SQD2*), активируются как при непродолжительном, так и продолжительном дефиците P_i , следствием чего оказалось четырехкратное увеличение уровня СХДГ при длительном дефиците P_i .

Такие модуляции в регуляции транскрипции генов, участвующих в биосинтезе глико- и фосфолипидов, подтверждают гипотезу о комплексном механизме замены мембранных фосфолипидов нефосфоросодержащими гликолипидами в растениях при условии недостатка P_i [40].

Реутилизация фосфора мембранных фосфолипидов в условиях дефицита P_i . Замещение фосфолипидов нефосфоросодержащими липидами в мембранах впервые обнаружено у нефотосинтезирующей бактерии *Pseudomonas diminuta* [42], а затем и в фотосинтезирующих организмах [43]. В генетически модифицированных фотосинтезирующих бактериях (*Rhodobacter* sp. и *Synechococcus* sp.), в которых отсутствует нефосфоросодержащий СХДГ, обнаружена его аккумуляция в условиях недостатка P_i [43, 44]. Обратимая взаимосвязь между

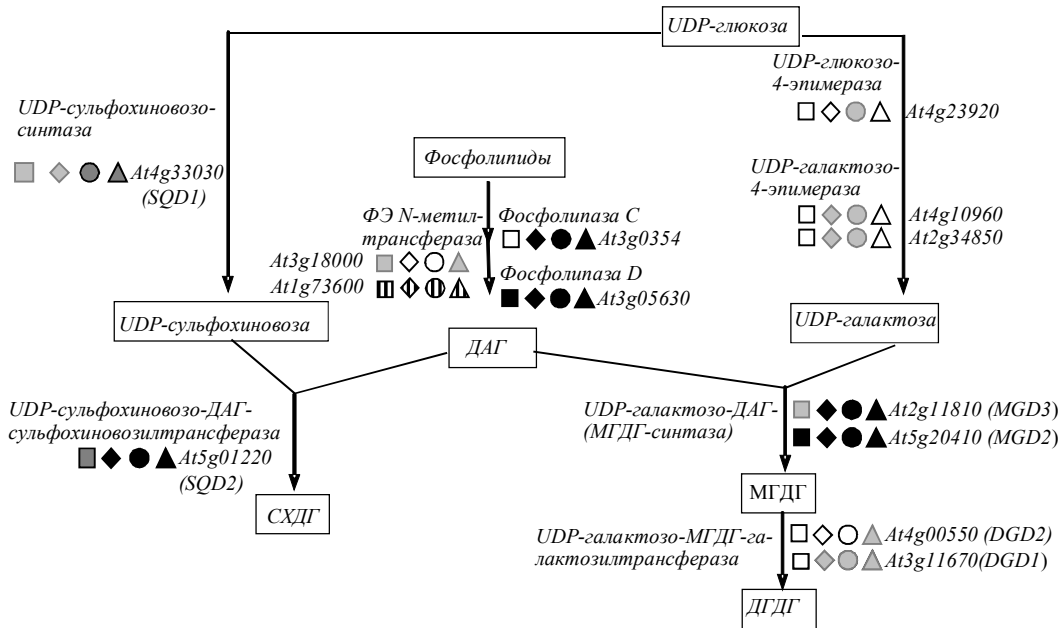


Рис. 1. Регуляция транскрипции генов при биосинтезе глико- и фосфолипидов в условиях дефицита P_i по [40]: □ – непродолжительный дефицит P_i (до 12 ч); ◇ – средний (до 2 сут); ○ – продолжительный (более 2 сут, листья); △ – продолжительный (более 2 сут, корни). Количественные изменения (разы): черный цвет – > 10; темно-серый – 4–10; светло-серый – 2–4; белый – 0,5–2; в полосу < 0,25. НСР = 0,05

СХДГ и ФГ в зависимости от уровня обеспеченности P_i выявлена также для растений *A. thaliana* [25]. В *Chlamydomonas reinhardtii* при дефиците P_i установлено увеличение содержания СХДГ наряду с деструкцией ФГ [45]. Данное наблюдение стали основой гипотезы о замене ФГ на СХДГ в фотосинтетических мембранах [27, 29].

Исследования, проведенные с мутантными растениями *pho1 A. thaliana*, дефицитными по белку, обеспечивающему поступление P_i в ксилему [9], свидетельствуют о том, что не только содержание СХДГ, но и ДГДГ увеличивается в условиях недостатка P_i . Аккумуляция СХДГ коррелирует с возрастанием содержания белка, что подтверждает его косвенное участие в синтезе СХДГ [18, 46].

Анализ субклеточных фракций фотосинтетических и нефотосинтетических мембран *A. thaliana* выявил существенное повышение содержания ДГДГ в мембранной фракции корней в условиях дефицита P_i как у растений дикого типа, так и у трансформированных растений *dgd1* [18]. Наряду с интенсивной аккумуляцией ДГДГ во фракции нефотосинтетических мембран менее значительное увеличение относительного содержания этого галактолипида наблюдалось также в мембранах хлоропластов P_i -дефицитных немодифицированных и *dgd1*-трансформированных растений.

Исследованиями на *fad3*-модифицированных растениях *A. thaliana*, у которых нарушен синтез десатуразы $C_{18:2}$ жирной кислоты (ЖК), ассоциированный с ЭР, установлена аккумуляция $C_{18:2}$ и уменьшение уровня $C_{18:3}$ ЖК в составе ДГДГ этих растений. Поскольку мутация *FAD3* затрагивает в первую очередь липиды, содержащиеся в нефотосинтетических мембранах, обнаруженные изменения в соотношении $C_{18:2} : C_{18:3}$ ЖК ДГДГ *fad3*-растений свидетельствуют о локализации ДГДГ главным образом в нефотосинтетических мембранах [47].

Таким образом, анализ полученных результатов подтвердил преимущественную аккумуляцию ДГДГ у растений, выращиваемых в условиях недостатка P_i , в плазматических мембранах, что, однако, не исключает возможности накопления этого галактолипида и в фотосинтетических мембранах.

В нефотосинтетических мембранах основными липидами являются галактолипид ДГДГ и фосфолипид ФХ. Они являются нейтральными соединениями, вовлеченными в формирование мембранного бислоя. Анализ ЖК в составе этих липидов выявил их подобность. Поэтому сделано предположение о том, что ДГДГ, синтезируемый в условиях недостатка P_i , в плазматических мембранах заменяет ФХ, как в мембранах хлоропластов СХДГ компенсирует ФГ [25, 46].

Сравнительный анализ характера трансформации липидов плазматических мембран и мембран хлоропластов показал, что действие непродолжительного дефицита P_i не вызывает существенных модификаций в составе нейтральных липидов плазматических мембран. При незначительных изменениях ФХ не зафиксировано интенсивной аккумуляции ДГДГ в мембранах корней растений *A. thaliana* в течение двухсуточного P_i -дефицита [40]. Полученные данные свидетельствуют о меньшей чувствительности нефотосинтетических мембран по сравнению с мембранами хлоропластов в условиях недостатка P_i [48].

Реутилизация фосфора из фосфолипидов мембран при дефиците P_i является обратимой. Исследованиями, проведенными на растениях *Avena sativa* L., установлено включение радиоактивно меченого фосфора при возобновлении поступления P_i в растения, в первую очередь в молекулы ФХ, а через двое суток более половины фосфолипидов плазматических мембран корней уже содержали меченый фосфор [49].

В результате изучения функциональной активности фосфолипаз с использованием анализа аминокислотной последовательности бактериальной фосфолипазы С, подобной таковой из *A. thaliana*, обнаружены шесть фосфолипаз Сs. В условиях P_i -дефицита отмечена значительная активация транскрипции только одной из них – неспецифической фосфолипазы С4 (КФ 3.1.4.3) (*NPC4*). С применением молекулярного клонирования и функциональной экспрессии *NPC4* подтверждено, что этот ген участвует в кодировании ФХ-гидролизующей фосфолипазы С4, функциональная активность которой не зависит от присутствия ионов Ca^{2+} . [31]. Исследование активности фосфолипаз С у *A. sativa* не выявило их активного участия в деградации фосфолипидов плазматических мембран корней *A. sativa* [49].

Наличие мутации *npc4* в растениях *A. thaliana* вызывает существенное снижение ФХ-гидролизующей активности фосфолипазы С вследствие дефицита P_i . Полученные данные позволяют предположить, что *NPC4* участвует в поставке как неорганического фосфата, так и ДАГ, образующихся в результате деградации фосфолипидов в плазматических мембранах при дефиците P_i [31].

Кроме активации транскрипции фосфолипазы С4, в растениях *A. thaliana* обнаружено повышение активности неспецифической фосфолипазы С5 (*NPC5*) при дефиците P_i . Анализ липидной фракции в генетически трансформированных растениях *A. thaliana* показал, что функциональная активность гена *NPC5* существенно влияет на биосинтез ДГДГ в фотосинтезирующих мембранах при недостатке P_i . Биосинтез ДГДГ у трансформированных растений *npc5/pho1* значительно уменьшался по сравнению с немодифицированными вариантами. На основе полученных данных авторы пришли к выводу о зависимости приблизительно 50 % синтеза ДГДГ в фотосинтезирующих мембранах от функциональности гена *NPC5* при дефиците P_i [37].

Изучение функциональной активности фосфолипазы D тесно коррелирует с соотношением ДГДГ/ФХ при различных уровнях обеспеченности растений P_i . Установленная корреляция между активностью фосфолипазы D и соотношением ДГДГ/ФХ согласуется с результатами, полученными на модели замещения фосфолипидов ДГДГ с образованием ФК в плазматических мембранах [49].

Исследованиями интенсивности гидролиза фосфолипидов в корнях и розетках *A. thaliana* определена более интенсивная их деградация в плазматических мембранах корней. Изучение активности фосфолипазы D в растениях *A. thaliana* на примере генетически трансформированных растений *pldz1*, *pldz2* и *pldz1/pldz2* продемонстрировало, что нарушение функций *PLDz1* и *PLDz2* приводит к уменьшению деградации ФХ наряду со снижением аккумуляции ДГДГ в P_i -дефицитных растениях. Результаты исследований показали, что гидролиз ФХ при участии *PLDz* в условиях дефицита P_i способствует поставке неорганического фосфора для клеточного метаболизма и ДАГ – для синтеза галактолипидов [35].

Таким образом, комплексный подход с использованием генетических, биохимических и физиологических методов при изучении трансформации глико- и фосфолипидов выявил компенсаторные механизмы замещения фосфолипидов нефосфоросодержащими гликолипидами в плазматических мембранах, проявляющиеся в способности растений реагировать на дефицит P_i селектив-

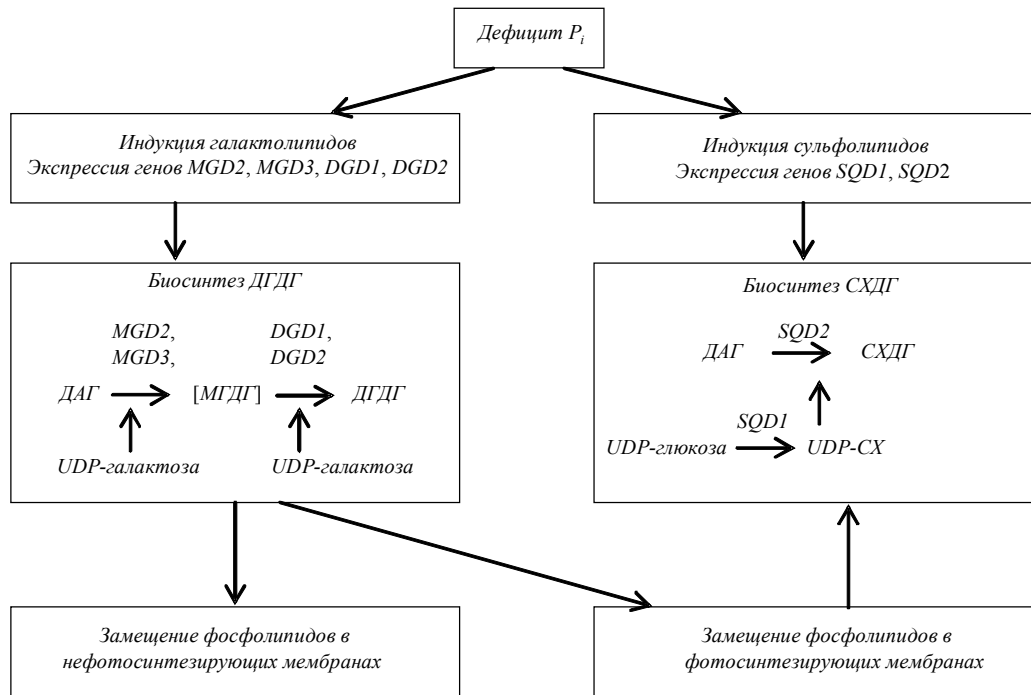


Рис. 2. Компенсаторное замещение фосфолипидов нефосфоросодержащими гликолипидами в фотосинтетических и нефотосинтетических мембранах растений в условиях дефицита P_i

ным накоплением СХДГ и ДГДГ (рис. 2). Модификация липидных компонентов мембран, направленная на синтез нефосфоросодержащих гликолипидов в ответ на недостаток P_i , способствует поддержанию развитых мембранных систем хлоропластов и плазматических мембран растительных организмов. Фосфолипиды при этом служат резервным пулом клеточного фосфора. Описанная реутилизация ионов фосфора в донорно-акцепторной системе является одной из стратегий, позволяющих растениям адаптироваться к условиям ограничения P_i .

N. B. Svetlova

The molecular components of phospho- and glycolipid metabolism in plant cell membranes under the phosphorus deficiency

Educational and Scientific Center «Institute of Biology»,
Taras Shevchenko National University of Kyiv
64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

One of the aspects of molecular regulation of phosphorus metabolism in plants, the lipid components of membrane structures, has been reviewed. The refocusing of phospho- and glycolipid metabolism is an indicator of phosphorus accessibility in plants. The compensatory mechanisms of substitution of phospholipids with non-phosphorus containing glycolipids in membranes, allow plants to adapt to the phosphate (P_i) starvation. Phospholipids are the reserve pool of cellular phosphorus at reutilization of ions in the donor-acceptor system of

plants. The mechanisms of transcriptional regulation of genes involved in the synthesis of phospholipids and glycolipids under P_i deficit have been analyzed.

Keywords: phosphate starvation, monogalactosyl diacylglycerol, digalactosyl diacylglycerol, sulfoquinovosyl diacylglycerol, phosphatidyl glycerol, *MGD*, *DGD*, *SQD*, *PLDz*, *NCP* genes.

N. B. Svetlova

Молекулярні складові метаболізму фосфо- і гліколіпідів мембран рослинних клітин за умов дефіциту фосфору

Резюме

Огляд присвячено одній із складових молекулярної регуляції метаболізму фосфору в рослинному організмі – ліпідним компонентам мембранних структур. Зміна спрямованості метаболізму фосфо- і гліколіпідів є показником доступності фосфору рослинам. Компенсаторні механізми заміщення фосфолипідів нефосфоросодержачими гліколіпідами у мембранах дозволяють рослинам адаптуватися до умов обмеження надходження фосфатів (P_i), а фосфолипідів слугують резервним пулом клітинного фосфору за реутилізації іонів у донорно-акцепторній системі. Проаналізовано механізми транскрипційної регуляції генів, залучених до синтезу фосфо- і гліколіпідів за умов дефіциту P_i .

Ключові слова: дефіцит фосфору, моногалактозилдіацилгліцерол, дигалактозилдіацилгліцерол, сульфохіновозилдіацилгліцерол, фосфатидилгліцерол, гени *MGD*, *DGD*, *SQD*, *PLDz*, *NCP*.

REFERENCES

1. Yuan H., Liu D. Signaling components involved in plant responses to phosphate starvation // *J. Integr. Plant Biol.*–2008.–**50**, N 7.–P. 849–859.

2. *Raghothama K. G.* Phosphate transport and signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2000.—**3**, N 3.—P. 182–187.
3. *Raghothama K. G.* Phosphate acquisition // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*—1999.—**50**.—P. 665–693.
4. *Franco-Zorrilla J. M., Gonzalez E., Bustos R., Linhares F., Leyva A., Paz-Ares J.* The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation // *J. Exp. Bot.*—2004.—**55**, N 396.—P. 285–293.
5. *Poirier Y., Bucher M.* Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis* // *The Arabidopsis book* / Eds C. R. Somerville, E. M. Meyerowitz, M. D. Rockville.—New York: The Amer. Soc. of Plant Biologists Publ., 2002.—P. 1–35.
6. *Joyard J., Marechal E., Block M. A., Douce R.* Plant galactolipids and sulfolipid: structure, distribution and biosynthesis // *Membranes: Specialized functions in plants* / Eds M. Smallwood, P. Knox, D. J. Bowles.—Oxford: BIOS Sci. Publ., 1996.—P. 179–194.
7. *Browse J., Somerville C.* Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1991.—**42**.—P. 467–506.
8. *Joyard J., Marechal E., Mieg C., Block M. A., Dorne A. J., Douce R.* Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts // *Lipids in photosynthesis: Structure, function and genetics* / Eds P.-A. Siegenthaler, N. Murata.—Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1998.—P. 21–52.
9. *Poirier Y., Thoma S., Somerville C., Schiefelbein J.* Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate // *Plant Physiol.*—1991.—**97**, N 3.—P. 1087–1093.
10. *Frentzen M.* Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2004.—**7**, N 3.—P. 270–276.
11. *Awai K., Marechal E., Block M. A., Brun D., Masuda T., Shimada H., Takamiya K., Ohta H., Joyard J.* Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**, N 19.—P. 10960–10965.
12. *Dormann P., Balbo I., Benning C.* *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1 // *Science.*—1999.—**284**, N 5423.—P. 2181–2184.
13. *Kelly A. A., Dormann P.* Green light for galactolipid trafficking // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2004.—**7**, N 3.—P. 262–269.
14. *Miuge C., Marechal E., Shimojima M., Awai K., Block M. A., Ohta H., Takamiya K., Douce R., Joyard J.* Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG // *Eur. J. Biochem.*—1999.—**265**, N 3.—P. 990–1001.
15. *Kobayashi K., Nakamura Y., Ohta H.* Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants // *Plant Physiol. Biochem.*—2009.—**47**, N 6.—P. 518–525.
16. *Kobayashi K., Masuda T., Takamiya K., Ohta H.* Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk // *Plant J.*—2006.—**47**, N 2.—P. 238–248.
17. *Kelly A. A., Froehlich J. E., Dormann P.* Disruption of the two digalactosyldiacylglycerolsynthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis // *Plant Cell.*—2003.—**15**, N 11.—P. 2694–2706.
18. *Hartel H., Dormann P., Benning C.* *DGD1*-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2000.—**97**, N 19.—P. 10649–10654.
19. *Kelly A. A., Dormann P.* *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate limiting conditions // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 2.—P. 1166–1173.
20. *Muller F., Frentzen M.* Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.*—2001.—**509**, N 2.—P. 298–302.
21. *Babiychuk E., Muller F., Eubel H., Braun H. P., Frentzen M., Kushnir S.* *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function // *Plant J.*—2003.—**33**, N 5.—P. 899–909.
22. *Xu C., Hartel H., Wada H., Hagio M., Yu B., Eakin C., Benning C.* The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity // *Plant Physiol.*—2002.—**129**, N 2.—P. 594–604.
23. *Hagio M., Sakurai I., Sato S., Kato T., Tabata S., Wada H.* Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.*—2002.—**43**, N 12.—P. 1456–1464.
24. *Dormann P., Benning C.* Galactolipids rule in seed plants // *Trends Plant Sci.*—2002.—**7**, N 3.—P. 112–118.
25. *Essigmann B., Guler S., Narang R. A., Linke D., Benning C.* Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1998.—**95**, N 4.—P. 1950–1955.
26. *Sanda S., Leustek T., Theisen M. J., Garavito R. M., Benning C.* Recombinant *Arabidopsis SQD1* converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose *in vitro* // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 6.—P. 3941–3946.
27. *Taran N. Yu., Okanenko A. A., Kosyk O. I.* Plant sulfolipid. II. Mutant study and phosphate deficiency // *Biopolym. Cell.*—2009.—**25**, N 1.—P. 3–11.
28. *Yu B., Xu C., Benning C.* *Arabidopsis* disrupted in *SQD2* encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2002.—**99**, N 8.—P. 5732–5737.
29. *Benning C.* Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1998.—**49**.—P. 53–75.
30. *Douce R., Joyard J.* Biosynthesis of thylakoid membrane lipids // *Advances in photosynthesis, oxygenic photosynthesis: The light reactions* / Eds D. R. Ort, C. F. Yocum.—Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1996.—Vol. 4.—P. 69–101.
31. *Nakamura Y., Awai K., Masuda T., Yoshioka Y., Takamiya K., Ohta H.* A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.*—2005.—**280**, N 9.—P. 7469–7476.
32. *Jouhet J., Marechal E., Bligny R., Joyard J., Block M. A.* Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation // *FEBS Lett.*—2003.—**544**, N 1–3.—P. 63–68.
33. *Sato N., Hagio M., Wada H., Tsuzuki M.* Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes // *Biochem. Soc. Trans.*—2000.—**28**, N 6.—P. 912–914.
34. *Li M., Qin C., Welti R., Wang X.* Double knockouts of phospholipases Df1 and Df2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning // *Plant Physiol.*—2006.—**140**, N 2.—P. 761–770.
35. *Li M., Welti R., Wang X.* Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation roles of phospholipases Df1 and Df2 in phosphatidylcholine hydrolysis

- and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants // *Plant Physiol.*—2006.—**142**, N 2.—P. 750–761.
36. Cruz-Ramirez A., Oropeza-Aburto A., Razo-Hernandez F., Ramirez-Chavez E., Herrera-Estrella L. Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2006.—**103**, N 17.—P. 6765–6770.
 37. Gaude N., Nakamura Y., Scheible W. R., Ohta H., Dormann P. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis* // *Plant J.*—2008.—**56**, N 1.—P. 28–39.
 38. Lin W. Y., Lin S. I., Chiou T. J. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants // *J. Exp. Bot.*—2009.—**60**, N 5.—P. 1427–1438.
 39. Benning C., Otha H. Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants // *J. Biol. Chem.*—2005.—**280**, N 4.—P. 2397–2400.
 40. Misson J., Raghothama K. G., Jain A., Jouhet J., Block M. A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N., Dumas P., Nacry P., Herrera-Estrella L., Nussaume L., Thibaud M. C. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2005.—**102**, N 33.—P. 11934–11939.
 41. Westphal S., Heins L., Soll J., Vothknecht U. C. *Vipp1* deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**, N 7.—P. 4243–4248.
 42. Minnikin D. E., Abdolrahimzadeh H., Baddiley J. Replacement of acidic phospholipids by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta* // *Nature.*—1974.—**249**, N 454.—P. 268–269.
 43. Benning C., Beatty J. T., Prince R. C., Somerville C. R. The sulfolipid SQDG is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1993.—**90**, N 4.—P. 1561–1565.
 44. Guler S., Seeliger A., Hartel H., Renger G., Benning C. A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid SQDG // *J. Biol. Chem.*—1996.—**271**, N 13.—P. 7501–7507.
 45. Sato N., Tsuzuki M., Matsuda Y., Ehara T., Osafune T., Kawaguchi A. Isolation and characterization of mutants affected in lipid metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Eur. J. Biochem.*—1995.—**230**, N 3.—P. 987–993.
 46. Hartel H., Essigmann B., Lokstein H., Hoffmann-Benning S., Peters-Kottig M., Benning C. The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*—1998.—**1415**, N 1.—P. 205–218.
 47. Browse J., McConn M., James D. Jr., Miquel M. Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of alpha-linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**, N 22.—P. 16345–16351.
 48. Jouhet J., Marechal E., Baldan B., Bligny R., Joyard J., Block M. A. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria // *J. Cell Biol.*—2004.—**167**, N 5.—P. 863–874.
 49. Tjellstrom H., Andersson M. X., Larsson K. E., Sandelius A. S. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants // *Plant Cell Environ.*—2008.—**31**, N 10.—P. 1388–1398.
 50. Kobayashi K., Awai K., Nakamura M., Nagatani A., Masuda T., Ohta H. Type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling and are crucial for low-phosphate adaptation // *Plant J.*—2009.—**57**, N 2.—P. 322–331.
 51. Holz G., Witt S., Gaude N., Melzer M., Schottler M. A., Dormann P. The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—2009.—**150**, N 3.—P. 1147–1159.
 52. Xu C., Moellering E. R., Fan J., Benning C. Mutation of a mitochondrial outer membrane protein affects chloroplast lipid biosynthesis // *Plant J.*—2008.—**54**, N 1.—P. 163–175.

Received 28.03.11