

## STRESZCZENIE

Plastoglobule, istotne składniki plastydów, są zaangażowane w wiele etapów ich rozwoju: od biogenezy chloroplastów przez transformację chloroplast-chromoplast, aż do powstawania gerontoplastów. Unikatowy skład białkowy i lipidowy tych struktur zależny od ich lokalizacji, sugeruje, iż plastoglobule są zarówno rezerwuarem materiałów zapasowych jak i stanowią ośrodek zachodzenia wielu reakcji metabolicznych. Plastoglobule aktywnie uczestniczą w metabolizmie prenylochinonów, karotenoidów, kwasu jasmonowego i odpowiadają za recykling produktów powstałych podczas dezintegracji błon tylakoidów. Bezpośrednie połączenie plastoglobul z tylakoidami pozwala na redystrybuowanie związków między obiema strukturami, co przyczynia się do ich roli w odpowiedzi na warunki stresowe. Silnie hydrofobowy charakter plastoglobul, ich specyficzny proteom i dostatecznie prosta procedura izolacji stwarza niezwykle możliwości wykorzystania plastoglobul w biotechnologii roślin.

## WPROWADZENIE

W komórkach roślinnych neutralne lipidy stanowiące łatwe do magazynowania źródło energii, gromadzą się w dwóch różnych przedziałach: plastoglobulach i cytoplazmatycznych kroplach tłuszczowych (z ang. *lipid droplets* – LD) [1]. W przeciwieństwie do plastoglobul specyficznych dla roślin, krople tłuszczowe (LD) opisane zostały w każdym organizmie, od bakterii po człowieka [2].

LD to dynamiczne organelle kontrolujące metabolizm i magazynowanie lipidów obojętnych. Jako takie, uczestniczą w wielu krytycznych szlakach komórkowych, w tym w transporcie lipidów między organellami [3], metabolizmie i degradacji białek [4]. W konsekwencji dysfunkcje LD prowadzą np. do kilku chorób metabolicznych człowieka (jak kacheksja czy lipodystrofia) [5]. U roślin krople tłuszczowe są niezbędne w procesie rozmnażania, ponieważ gromadzą olej w nasionach, który jest wykorzystywany jako źródło energii podczas wzrostu po kiełkowaniu, aż do nabycia fotautotrofizmu [1]. W liściach LD gromadzą się podczas starzenia i przejściowo magazynują lipidy, takie jak estry sterylowe i triacyloglicerole (TAGs) pochodzące z demontażu błon. Jednak skład, struktura i funkcje kropli tłuszczowych obecnych w organach wegetatywnych, takich jak liście lub korzenie pozostają niejednoznaczne [1].

LD i plastoglobule mają podobną strukturę. Podczas gdy lipidy polarne błony otaczającej plastoglobule pochodzą bezpośrednio z zewnętrznego listka błony tylakoidów, lipidy błon LD pochodzą z błony retikulum endoplazmatycznego [6]. Badania na drożdżach i komórkach zwierzęcych, a także rozwijających się siewkach dostarczyły aktualnych modeli biogenezy LD (przegląd w [7]). Krople tłuszczu mogą powstawać z wcześniej istniejących LD lub tworzyć się *de novo*.

Biorąc pod uwagę ich funkcje, lokalizację i skład wyróżniamy (i) krople tłuszczowe charakterystyczne dla nasion – oleozynowe, niezagregowane, wypełnione TAGs wykorzystywanymi w procesie glukoneogenezy, jako materiał zapasowy dla rozwijającego się zarodka; (ii) pyłkowe krople tłuszczowe – oleozynowe, niezagregowane, transportowane do szczytu łagiewki pyłkowej, uwalniające wolne kwasy tłuszczowe z TAGs, wykorzystywane do elongacji błony komórkowej łagiewki; (iii) tapetosomy w rodzinie *Brassicaceae* – oleozynowe, stanowiące klaster parafinowych kropli tłuszczowych i pęcherzyków flawonoidowych, których główna funkcja jest związana z programowaną śmiercią komórki pyłku; (iv) olbrzymie krople tłuszczowe w epidermie *Asparagales* – oleozynowe klaster kropli tłuszczowych i innych pęcherzyków zawierających głównie woski kutylularne; (v) duże mezokarpalne krople tłuszczowe – oleozynowe, nieagregujące, zwiększające wartość odżywcza owoców (np. awokado); (vi) ciałka gumy – pojedyncze, nieagregujące, uwalniane z komórki po zranieniu, zawierające poliizopreny zamiast TAG [6].

mgr Joanna Wójtowicz,

dr Katarzyna Gieczewska ✉

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Warszawa

[https://doi.org/10.18388/pb.2020\\_347](https://doi.org/10.18388/pb.2020_347)

✉ autor korespondujący: kat.gieczewska@biol.uw.edu.pl

**Słowa kluczowe:** biotechnologia roślin, błony tylakoidów, fibryliny, metabolizm karotenoidów, metabolizm prenylochinonów, monowarstwa białkowo-lipidowa, stres abiotyczny

**Wykaz skrótów:** FBN – fibryliny; PGs – plastoglobule; TAG – triacyloglicerole

**Finansowanie:** Prezentowane wyniki finansowane były z grantu SONATA 2013/09/D/NZ3/02399 Narodowego Centrum Nauki.

**Podziękowania:** Składamy serdeczne podziękowania dla prof. dr hab. Agnieszki Mostowskiej za krytyczne przeczytanie manuskryptu.

Obrazowanie plastoglobul prowadzone było w laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marczelego Nenckiego PAN, przy wykorzystaniu mikroskopu elektronowego JEM1400 (JEOL Co. Japan).

Plastoglobule to lipoproteinowe struktury znajdujące się w plastydach większości niefotosyntetyzujących i fotosyntetyzujących tkanek roślinnych [8-10]. U roślin wyższych lokalizują się w sąsiedztwie tylakoidów, zaś pojedyncza błona otaczająca plastoglobule zachowuje ciągłość z zewnętrznym listkiem błony tylakoidów. Przez długi czas plastoglobule uważane były za bierny magazyn substancji powstających podczas degradacji błon tylakoidów w chloroplastach [11]. Współczesne badania wykazały jednak, iż struktury te aktywnie uczestniczą w syntezie i metabolizmie lipidów (metabolizm prenylochionów i karotenoidów) [12], syntezie  $\alpha$ -tokoferolu [13] oraz zapewniają wymianę hydrofobowych metabolitów z tylakoidami [9]. Za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego i tomografii elektronicznej możliwe stało się określenie dokładnej budowy tych struktur i ich lokalizacji [14,15]. Charakterystyka, ich dotąd nieznaną naturę, stała się przedmiotem licznych doniesień naukowych publikowanych w przeciągu ostatnich 50 lat. Zaobserwowane zmiany w ich ilości oraz wielkości w zależności od gatunku rośliny, rodzaju plastydów, różnych warunków hodowli roślin bądź działania stresów abiotycznych, przybliżyły obraz pełnionych przez plastoglobule w plastydach funkcji.

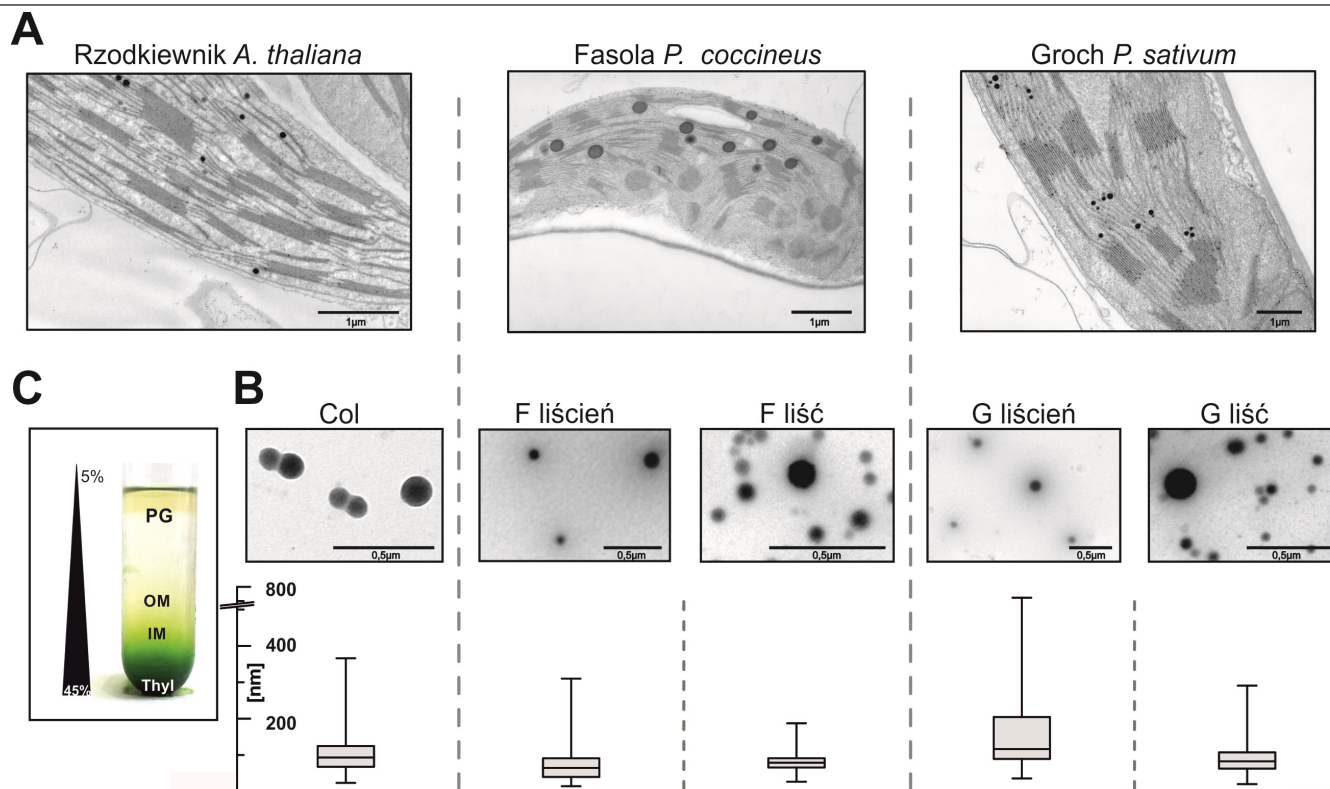
Różnicowanie plastydów w specyficzne typy jest związane z ich funkcją w metabolizmie określonej tkanki [11]. We wszystkich rodzajach plastydów wykryto plastoglobule, których budowę i funkcję najlepiej poznano w chloroplastach, chromoplastach i gerontoplastach [16].

## PLASTOGLOBULE CHLOROPLASTÓW

Pierwsze plastoglobule zaobserwowano w chloroplastach w latach 50-tych i 60-tych [17-20]. Zlokalizowano je na błonach tylakoidów, gdzie przyjmowały okrągły bądź owalny kształt. W dojrzewających lub dojrzałych chloroplastach dominują pojedyncze plastoglobule wielkości 30-500 nm [8]. Podczas stresu bądź starzenia się chloroplastów, plastoglobule znacznie zwiększają swoje rozmiary i zbierają się w niewielkie grupy [8]. Szczegółowe analizy przeprowadzone na izolowanych plastoglobulach pozwoliły poznać ich podstawowy skład. W swym wnętrzu magazynują znaczne ilości związków lipidowych takich jak: budujący błony monogalaktozydylacyloglicerol i digalaktozydylacyloglicerol (MGDG, DGDG), triacyloglicerole, prenylochiny (tokoferol, plastochinon) wolne kwasy tłuszczowe i niewielkie ilości karotenoidów [11]. Zaś w otaczającej ich błonie wykryto białka o charakterze enzymatycznym jak i strukturalnym [21].

## PLASTOGLOBULE CHROMOPLASTÓW

Informacje o plastoglobulach chromoplastów pochodzą z licznych badań przeprowadzonych na papryce rocznej (*Capsicum annuum*) [22] oraz kolorowych płatkach wielu innych gatunków roślin [23]. Obrazy ultrastruktury chromoplastów pokazały, iż znajdujące się w nich plastoglobule są znacznie większych rozmiarów aniżeli ich chloroplastowe odpowiedniki i, w przeciwieństwie do tych ostatnich, mogą przyjmować różne kształty: globularne, fibrylarne bądź



**Figura 1.** Obrazy z mikroskopu elektronowego (A) chloroplastów liści rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia, Col), fasoli (*Phaseolus cocineus*) i grochu (*Pisum sativum*), (B) izolowanych plastoglobul z rzodkiewnika (*A. thaliana*, Col), liścieni i liści fasoli (*P. cocineus*) oraz liścieni i dojrzałych liści grochu (*P. sativum*) wraz ze zmierzonymi średnicami  $\varnothing$  plastoglobul obecnych na elektronogramach. Różnice w wielkości pomiędzy poszczególnymi roślinami zostały przedstawione w formie wykresu. Zdjęcie gradientu sacharozy (C) z wyszczególnionymi frakcjami (PG - plastoglobule, OM - zewnętrzna otoczka chloroplastu, IM - wewnętrzna otoczka chloroplastu, Thyl - błony tylakoidów) - kluczowy etap w procedurze izolacji plastoglobul (wyniki badań własnych, nieopublikowane).

tubularne [24,25]. Plastoglobule chromatoplastów magazynują także duże ilości karotenoidów i ksantofili (94%) zaś w mniejszych ilościach zawierają tokoferole i plastochinon [21], co jest wynikiem procesu przekształcenia chloroplastów w chromatoplasty.

## PLASTOGLOBULE GERONTOPLASTÓW

Gerontoplasty i chromatoplasty zawierają zredukowany system tylakoidów co skutkuje nagromadzeniem dużej ilości plastoglobul. Podczas procesu starzenia tkanek liścia następuje spadek wymiany gazowej oraz poziomu białek i zachodzi przemiana chloroplastów w gerontoplasty. Powstawanie gerontoplastów następuje poprzez destabilizację gran, zanik błon tylakoidów oraz masową akumulację plastoglobul [26]. Plastoglobule gerontoplastów magazynują w sobie lipidowe produkty degradacji błon tylakoidów, co potwierdza fakt, iż ich powstawanie połączone jest w czasie z utratą aktywności fotosystemu II i zanikiem zwięzłości gran podczas procesu starzenia. Innymi słowy funkcją gerontoplastów, w połączeniu z innymi organellami, jest kontrolowany rozkład aparatu fotosyntetycznego podczas procesu starzenia. Kontrola tego procesu jest wymagana z dwóch powodów. Po pierwsze, chloroplasty zawierają 75% wszystkich białek liścia. Podczas ich degradacji uwalniane są duże ilości aminokwasów i azotu niezbędnego dla innych organów rośliny. Po drugie, chlorofil i jego główne produkty rozkładu są niezwykle toksyczne [27].

## NIE TYLKO ROŚLINY WYŻSZE

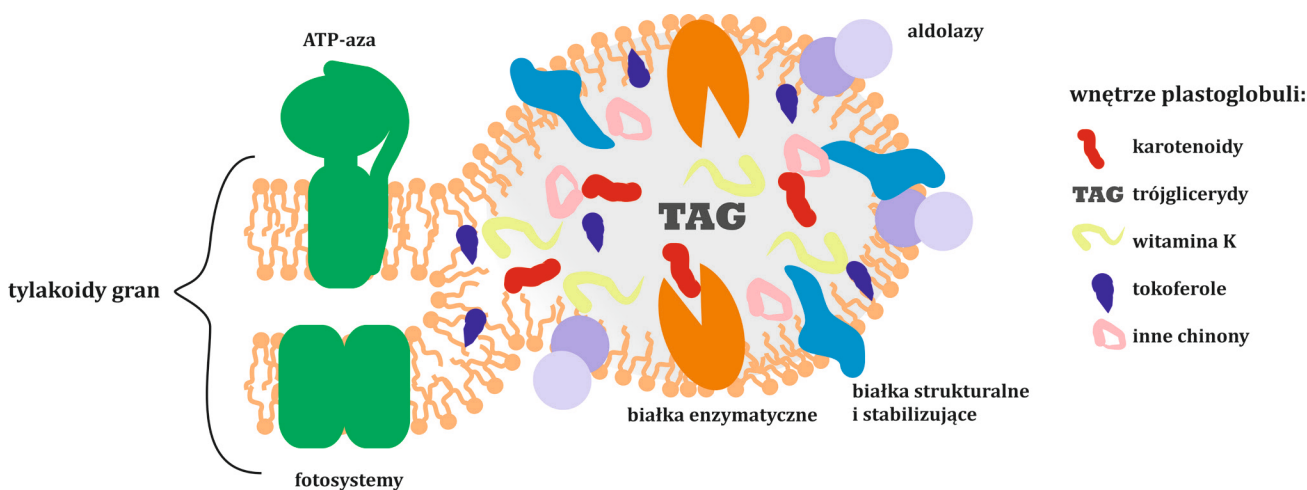
Plastoglobule występują nie tylko u roślin wyższych, lecz także u mszaków i glonów, np. *Physcomitrella patens* [28], *Pleurococcus*, *Nostoc*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella bardawil* [18,29] czy sinic (np. *Synechocystis* sp.) [30]. Choć procedurę izolacji tych struktur i analizę ich składu przeprowadzono jedynie w przypadku zielenicy *D. bardawil* [31]. Plastoglobule zlokalizowane w sinicach, mimo nieokreślonego składu białkowego i lipidowego, występują związane z tylakoidami w podobnym połączeniu jak u roślin wyższych [30]. Badania przeprowadzone na *Synechocystis* sp. PCC 6803 wskazują na podobieństwo białek wchodzących

w skład plastoglobul do ich roślinnych odpowiedników [32]. Wykorzystując tomografię krio-elektronową udało się określić wielkość (ok. 65 nm) i umiejscowienie plastoglobul w pobliżu błon tylakoidów *Chlamydomonas reinhardtii* [33]. Ponadto analiza genomu *Ch. reinhardtii* wykazała obecność wielu homologów plastoglobulowych białek roślin wyższych. *D. bardawil* to zielenica, która w przeciwieństwie do roślin akumuluje zarówno krople tłuszczowe jak i chloroplastowe plastoglobule. W plastoglobulach tej zielenicy wykryto znaczne pokłady  $\beta$ -karotenu i duże podobieństwo w składzie białkowym z białkowo-lipidowymi strukturami *Arabidopsis thaliana* [31].

## STRUKTURA PLASTOGLOBUL

Przez ostatnie 60 lat prowadzono intensywne ultrastrukturalne badania nad organizacją błon chloroplastów [34]. Jednak zawarte wewnątrz tych organelli plastoglobule, ich struktura, umiejscowienie oraz rodzaj oddziaływania z błonami wewnętrznymi przez długie lata pozostawały tajemnicą. Dopiero wnikliwe doświadczenia przeprowadzone na tych strukturach w 1999 roku [35] pozwoliły na poznanie ich złożonej budowy i związanych z nią funkcji.

Figura 1 przedstawia plastoglobule w chloroplastach rzodkiewnika, grochu i fasoli oraz zdjęcia izolowanych plastoglobul z chloroplastów tych gatunków (zdjęcia otrzymane z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego). Widoczne są wyraźne różnice w wielkości, kształcie i rozmieszczeniu tych struktur na terenie chloroplastów w zależności od gatunku rośliny jak i stadium rozwojowego (liście i liścienie). Rozmiar plastoglobul zmienia się także pod wpływem stresów abiotycznych i w okresie starzenia rośliny [16]. Za średnią wielkość tych struktur przyjęto przedział od 30 do 500 nm średnicy, choć są wyjątki: plastoglobule w liściach figusa osiągają wielkość nawet do 4  $\mu$ m [8]. Przestrzenne rozmieszczenie tych struktur wewnątrz plastydów ogranicza się do powierzchni tylakoidów. Większość plastoglobul związana jest z tylakoidami w obszarach brzegowych. Mogą one występować pojedynczo, bądź tworzyć gromady (od 2 do 7), które wizualnie przypominają „koraliki nawleczone na nitkę”. Obraz połączonych ze sobą



**Rycina 1.** Schemat budowy plastoglobuli ze szczególnym uwzględnieniem lipidów wchodzących w skład tej struktury. Białka zakotwiczone w pojedynczej otoczce o funkcji zarówno strukturalnej jak i enzymatycznej. Rejony funkcyjne tych białek skierowane są do wnętrza plastoglobuli (na podstawie [35], zmodyfikowane).

kilku plastoglobul możemy zaobserwować w plastydach roślin poddawanych działaniu stresu lub w starzejących się plastydach, co jest wynikiem rozpadu i zanikania błon tylakoidów [16].

Plastoglobule ograniczone są monowarstwą białkowo-lipidową. Błona ta wykazuje ciągłość z błoną tylakoidów będącą wypukleniem zewnętrznej warstwy lipidów tej błony. Rejon ten przyjmuje charakterystyczny kształt przypominający lejek (Ryc. 1) i pozwala sądzić, że plastoglobule prawdopodobnie powstają w wyniku utworzenia pęcherzyków (uwypukleń), bądź fuzji wielu pęcherzykowatych, lipidowo-białkowych struktur pochodzących z tylakoidów [16]. Zjawisko to nosi nazwę *blistering* z ang. - tworzenie bąbli. Połączenie plastoglobul z tylakoidami za pomocą błony umożliwia wewnętrzną wymianę metabolitów pomiędzy obiema strukturami (plastochinon, karotenoidy, tokoferol) [8]. W plastoglobulach następuje synteza, bądź magazynowanie tych substancji, które w błonach tylakoidów pełnią rolę przenośników elektronów oraz chronią aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniami [13,16,36].

W monowarstwie otaczającej plastoglobule zakotwiczone są liczne białka. Hydrofobowa część tych białek skierowana jest do wnętrza plastoglobul natomiast część hydrofobowa wystaje poza błonę do stromy plastydu (Ryc. 1). Mają one zdolność do magazynowania lipidów takich jak np. karotenoidy,  $\alpha$ -tokoferol, triacyloglicerole i plastochinon [35].

#### SKŁAD LIPIDOWY PLASTOGLOBUL

Głównymi składnikami lipidowymi występującymi we wnętrzu plastoglobul chloroplastowych są lipidy neutralne (TAG, wolne kwasy tłuszczowe), prenylochinony (plastochromanol-8, plastochinon-9 i tokoferole biorące udział w syntezie witaminy E) oraz filochinony (głównie witamina K1) [37].

#### UDZIAŁ PRENYLOCHINONÓW I KAROTENOIDÓW W STRUKTURZE PLASTOGLOBUL

Plastochinon to rozpuszczalny w tłuszczach związek organiczny przenoszący elektrony z centrum reakcji fotosystemu II (PS II) na kompleks cytochromu  $b_6/f$ , oraz odpowiadający za ochronę lipidów błon tylakoidów przed działalnością reaktywnych form tlenu (ROS). Postuluje się, że ogromna frakcja tego związku (ponad 50%) zmagazynowana we wnętrzu plastoglobul, odgrywa rolę ochronną w przypadku działania czynników stresowych [38], poprzez aktywną wymianę plastochinonu-9 na drodze plastoglobule – błony tylakoidów [39].

W mniejszych ilościach w plastoglobulach znajdują się także fenylochinony i należący do tej grupy filochinon, które odpowiadają za syntezę witaminy K1 oraz chinonów  $\alpha$ -tokoferolu. Filochinon, akceptor elektronów w kompleksie PSI, powstaje na terenie plastoglobul i prawdopodobnie podlega aktywnej dystrybucji do błon tylakoidów, by pełnić swoją rolę podczas fotosyntezy [36]. Do grupy związków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych zlokalizowanych w plastoglobulach należą także plastochromanol-8 i tokoferole w tym najobficiej występujący  $\alpha$ -tokoferol. Synteza plastochromanolu-8 bezpośrednio z plastochinonu-9

przebiega na terenie plastoglobul, przy udziale dwóch przypisanych tym strukturom enzymów: cyklazie tokoferolu (VTE1, *Tocopherol cyclase*) i dehydrogenazie NADP(H) C1 (NDC1, *NAD(P)H dehydrogenase C1*) [8]. Tokoferole w chloroplastach odpowiadają za utrzymanie stabilności błon (poprzez zwiększanie ich sztywności), chronią lipidy błonowe przed utlenieniem [13], bronią fotosystem II przed działaniem stresu oksydacyjnego i degradacją, regulują cykliczny transport elektronów wokół PSII [40].  $\alpha$ -Tokoferol zapobiegając peroksydacji lipidów błonowych przekształca się w  $\alpha$ -tokoferylchinol, swoją utlenioną formę, która również przejawia własności antyutleniające, a jej głównym miejscem akumulacji w chloroplastach są plastoglobule [41]. Reakcja ta jest odwracalna w procesie zwanym cyklem naprawy  $\alpha$ -tokoferolu ( *$\alpha$ -tocopherol repair cycle*), który zachodzi na terenie plastoglobul [8,40]. Badania wykazały, iż poziom  $\alpha$ -tokoferolu w plastoglobulach wzrasta podczas stresu oksydacyjnego, co skutkuje zwiększeniem rozmiaru jak i ilości tych struktur w chloroplastach [37,40,42].

We frakcjach plastoglobul wykryto także śladowe ilości chlorofilu i karotenoidów głównie  $\beta$ -karotenu i luteiny oraz niewielkie ilości glikolipidów i fosfolipidów. Tak różnorodny skład lipidowy tych struktur wymusza odpowiednią lokalizację związków w ich wnętrzu: lipidy niepolarne wypełniają wnętrza struktury, natomiast lipidy o charakterze polarnym lokalizują się bliżej monowarstwy z zakotwiczonymi w jej wnętrzu białkami. Modyfikacje w składzie lipidowym plastoglobul wpływają na zmiany ich wielkości oraz kształtu [39]. Przyczyniają się również do zmiany ich zdolności do reakcji z tlenkiem osmu ( $OsO_4$ ), co obserwujemy na zdjęciach z TEM-u w postaci zmienionej gęstości elektronowej utrwalonych struktur. Łańcuchy nienasyconych kwasów tłuszczowych, metabolitów obecnych we wnętrzu plastoglobul, silnie reagują z tlenkiem osmu, dzięki czemu uzyskujemy wyraźny, ciemny obraz kształtu i wielkości tych struktur (Fig. 1). Mutanty *Arabidopsis thaliana fbn4* (pozbawione strukturalnego białka plastoglobulowego z rodziny fibrylin – FBN4) charakteryzują się znacznie obniżonym poziomem plastochinonu-9 we wnętrzu tych struktur. W związku z tym, plastoglobule mutantu *fbn4* akumulują mniejsze ilości związków lipidowych i na zdjęciach TEM charakteryzują się mniejszą gęstością elektronową, są mniej wyraźne i bardziej blade [43].

#### UDZIAŁ LIPIDÓW W PROCESIE STARZENIA

Proces starzenia się roślin również wywołuje istotne zmiany w składzie lipidowym plastoglobul chloroplastowych. Zawartość TAG gwałtownie spada, podczas gdy poziom karotenoidów głównie w formie zestyfikowanej jak i wolnych kwasów tłuszczowych wzrasta. Natomiast najobficiej występujący w plastoglobulach przedstawiciel prenylochinonów, plastochinon-9, występuje w formie utlenionej [44].

Skład lipidowy plastoglobul pochodzących z plastydów pozbawionych chlorofilu znacznie różni się od plastoglobul występujących w chloroplastach. Plastoglobule gerontoplastów akumulują duże ilości TAG, estrów karotenu, utlenionych prenylochinonów i wolnych kwasów tłuszczowych [44].

We wnętrzu plastoglobul chromoplastów dominują duże ilości karotenoidów (ponad 94%) głównie w formie zestryfikowanej. Analiza składu plastoglobul z chromoplastów czerwonej papryki wykazała obecność kapsantyny,  $\beta$ -karotenu, wiolaksantyny, zeaksantyny, kapsorubiny i  $\beta$ -kryptoksantyny [45]. Związki te akumulują się w hydrofobowym wnętrzu tych struktur, które w chromoplastach mogą przyjmować przeróżny kształt: globularny, tubularny i fibrylarny [22]. Analiza struktury plastoglobul wyizolowanych z chromoplastów wykazała obecność desaturazy  $\zeta$ -karotenu (ang. *ZDS*,  *$\zeta$ -Carotene Desaturase*) biorącej udział w wielu cyklach biosyntezy karotenoidów. Sugeruje to, iż plastoglobule chromoplastów pełnią specyficzną, enzymatyczną rolę w akumulacji tych związków. W plastoglobulach obecne są również niewielkie ilości  $\alpha$ -tokoferoli,  $\alpha$ -tokochinonów, plastochinonów, fosfolipidów, sulfolipidów, wolnych kwasów tłuszczowych jak i znaczne ilości triacylogliceroli, które obok karotenoidów są najobficiej występującymi związkami w plastoglobulach chromoplastów. Mniejsze ilości fosfolipidów, sulfolipidów i obecność wolnych kwasów tłuszczowych we wnętrzu tych plastoglobul odróżnia je od błon plastoglobul wyizolowanych z chloroplastów [46].

Plastoglobule aktywnie uczestniczą w transformacji chloroplast-chromoplast jak i w procesie powstawania gerontoplastów. Akumulują znaczne ilości związków lipidowych: karotenoidów i chinonów oraz produktów destabilizacji błon tylakoidów (aminokwasy, reszty fitolowe), gwałtownie zwiększając swoje rozmiary. Przyczyniają się zatem do prawidłowego zachodzenia obu procesów oraz pełnią funkcję ochronną, magazynując szkodliwe produkty rozkładu aparatu fotosyntetycznego.

#### SKŁAD BIAŁKOWY PLASTOGLOBUL

Skład białkowy plastoglobul jest bardzo zróżnicowany, bogaty zarówno w białka o charakterze enzymatycznym jak i strukturalnym, choć większość z nich nie została nadal zidentyfikowana, a funkcje wielu nadal nieznane. Pierwsze doniesienia publikacyjne informujące, o obecności białek charakterystycznych dla plastoglobul, pochodzą z badań przeprowadzonych nad chromoplastami papryki rocznej (*Capsicum annuum* L.) [47] oraz ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.) [48]. Pierwszym rozpoznany białkiem, którego lokalizacja została potwierdzona na terenie tych struktur było białko z rodziny fibrylin odkryte w plastoglobulach chromoplastów papryki (*Capsicum annuum*) w 1994 roku [22]. Obecnie, na ponad 30 białek zidentyfikowanych za pomocą spektrometrii mas z chloroplastowych plastoglobul *Arabidopsis thaliana* jedynie piętnastu udało się przypisać określone funkcje [11,49]. Skład białkowy plastoglobul oraz przykładowe białka strukturalne (fibryliny) i enzymatyczne przedstawia Ryc. 2.

#### UDZIAŁ BIAŁEK STRUKTURALNYCH-FIBRYLIN W STRUKTURZE PLASTOGLOBUL

Do najważniejszych i najliczniejszych zaliczamy białka zakotwiczone w pojedynczej błonie plastoglobul, które, położone obok siebie, tworzą swoisty „płaszcz” okrywający te

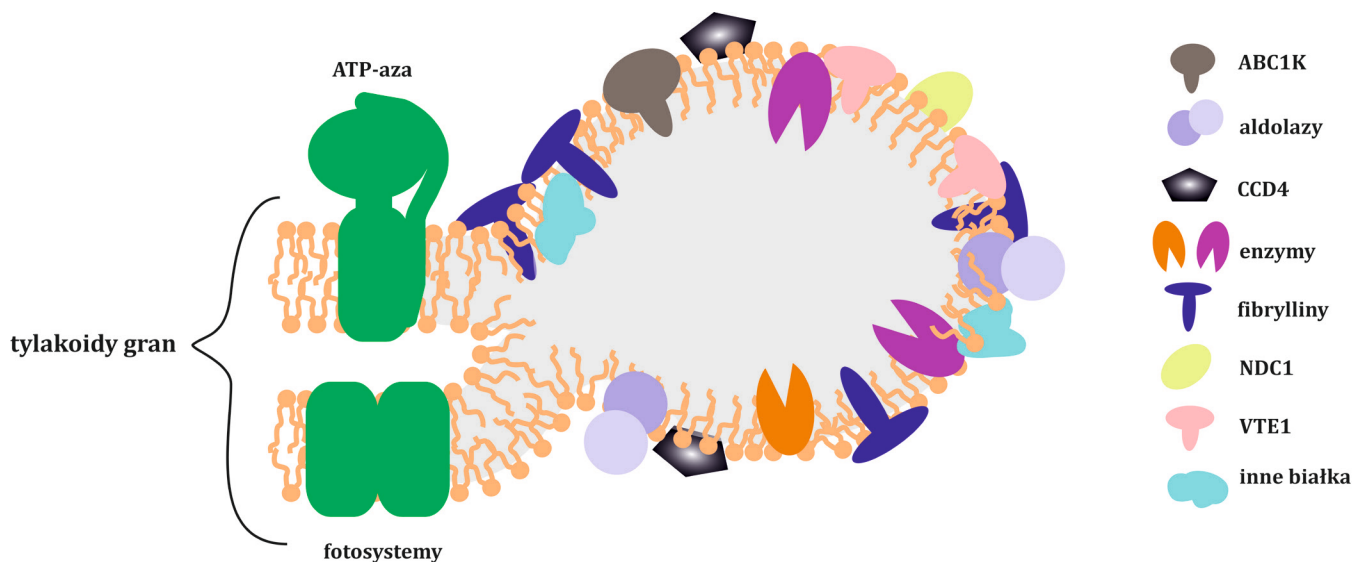
struktury i stanowią ponad 53% całkowitego plastoglobulowego proteomu (Ryc. 2) [50]. Należą one do rodziny PAP (*Plastid-lipid-Associated Protein*)/fibrylin (*Fibrillin*) i zostały zidentyfikowane jako białka specyficzne dla plastoglobul, tzw. plastoglobuliny [43,51]. Genom jądrowy *Arabidopsis thaliana* zawiera 14 genów kodujących fibryliny zlokalizowane na terenie chloroplastów. Aż 7 z nich znajduje się na terenie plastoglobul: FBN1a, FBN1b, FBN2, FBN4, FBN7a, FBN7b, FBN8 [8]. Ich rozmiary oscylują pomiędzy 30 a 38 kDa [8,42].

Białkowy płaszcz zbudowany głównie z plastoglobulin prawdopodobnie dzieli się na białka receptorowe odpowiedzialne za połączenie plastoglobul z tylakoidami oraz białka regulatorowe umożliwiające transport lipidów do/z błon tylakoidów [8]. Pięć z siedmiu plastoglobulin to również najczęściej ufosforylowane białka w plastoglobulach [52], lecz rola tego procesu, jego przebiegu i skutków na terenie tych struktur nie została dotąd zbadana. Plastoglobuliny, odznaczają się budową przypominającą pinnezkę. Posiadają hydrofilową domenę wystającą z otoczki, skierowaną do stromy chloroplastów tworząc płaszcz oraz hydrofobowy ogonek zakotwiczony w lipidowej otoczce plastoglobul (Ryc. 2). Białka te charakteryzują się obecnością jednego lub większej ilości regionów hydrofobowych, które odgrywają rolę w stabilizowaniu struktury plastoglobul oraz jej ochrony. Pozbawione są jednak funkcji enzymatycznych [21]. Hydrofobowy region plastoglobulin prawdopodobnie posiada także zdolność wiązania związków lipidowych obecnych w plastoglobulach takich jak: karotenoidy [8], bądź plastochinon-9 [43]. Wykazano, że plastoglobule z liści jabłoni (*Malus domestica*) o obniżonej zawartości białka FBN4 zawierały 90% mniej plastochinonu sugerując, iż plastoglobulina ta odpowiada za wiązanie i transport tego związku do i z plastoglobul na teren tylakoidów [43]. Potrójny mutant *Arabidopsis FBN1-2*, o zmniejszonej ekspresji FBN1a, FBN1b i FBN2 w chloroplastach, charakteryzował się mniejszą zawartością triacylogliceroli, co miało wpływ na zredukowaną ilość plastoglobul w tym mutancie i ściśle korelowało z biosyntezą kwasu jasmonowego (JA) [53]. Natomiast nadekspresja FBN1a w liściach tytoniu spowodowała zwiększenie ilości i wielkości nagromadzonych w chloroplastach plastoglobul [54].

Plastoglobuliny podobnie jak plastoglobule zmieniają się pod wpływem działania stresu. Uprawa *Arabidopsis thaliana* w warunkach dużego natężenia światła powoduje nadekspresję plastoglobulin przez co i zwiększoną akumulację plastoglobul (od 2 do 5 razy) [21]. Wzrost liczby plastoglobul został również odnotowany podczas poddawania roślin stresowi fotoooksydacyjnemu oraz w warunkach suszy [37]. Doświadczenia te pozwalają wnioskować, iż zmiana kształtu i wzrost liczby plastoglobul w zmienionych warunkach środowiska wynika ze zwiększonej akumulacji plastoglobulin w ich płaszczu [39]. Oznaczałoby to, iż białka te mają wpływ na powstawanie i rozwój plastoglobul [37].

#### UDZIAŁ BIAŁEK ENZYMATYCZNYCH W STRUKTURZE PLASTOGLOBUL

Plastoglobule zawierają także wiele białek o charakterze enzymatycznym związanych z syntezą i metabolizmem li-



**Rycina 2.** Skład białkowy plastoglobul – przykładowe białka strukturalne (fibryliny) i enzymatyczne. Skrót: ABC1K, kinazy o aktywności kompleksu BC1; CCD4, dioksygenaza karotenów; NDC1, dehydrogenaza NAD(P)H C1 typu II; VTE1, cyklaza tokoferolu (opracowane na podstawie [15,21]).

pidów [12,13,21,42,55]. Do najliczniejszej grupy z tej kategorii należą białka z rodziny kinaz ABC1K (ang. *Activity of BC1 Complex Kinase*), które stanowią 19 % proteomu plastoglobul (Ryc. 2) [50]. U *Arabidopsis* występuje 17 członków rodziny ABC1K, 8 lokalizuje się w mitochondriach, zaś 9 w plastydach z których 6 (ABC1K1, -3, -5, -6, -7 i -9) zidentyfikowanych zostało na terenie plastoglobul [50,56,57]. Na podstawie homologii białek ABC1K z domenami funkcyjnymi kinaz występujących u bakterii (m.in. *Escherichia coli*) jak i w mitochondriach stwierdzono, iż biorą one udział w regulacji syntezy ubichinonów [21] poprzez fosforylację komponentów szlaku ich biosyntezy [50]. Rozpowszechnienie rodziny kinaz ABC1K w plastydach, a szczególnie w plastoglobulach wskazuje na udział tych białek w regulacji metabolizmu także innych prenylochinonów [50,56,57]. Badania przeprowadzone na roślinach *Arabidopsis* pozbawionych kinaz ABC1K1 i ABC1K3 dowodzą, iż białka te silnie ingerują w redystrybucję prenylochinonów między wnętrzem plastoglobul a tylakoidami, zmniejszając zawartość  $\alpha$ -tokoferolu, plastochromanolu-8 [57], zaś zwiększając plastochinonu-9 i filochinonu na terenie tych lipidowych struktur [39]. Ponadto, plastoglobule mutantów *k1k3* charakteryzowały się zwiększoną ekspresją plastoglobulin, co skutkowało większą ilością tych struktur na terenie chloroplastów oraz podwyższoną akumulacją ksantofili i  $\beta$ -karotenu, co może wskazywać na udział kinaz poprzez fosforylację w regulacji metabolizmu karotenoidów [39].

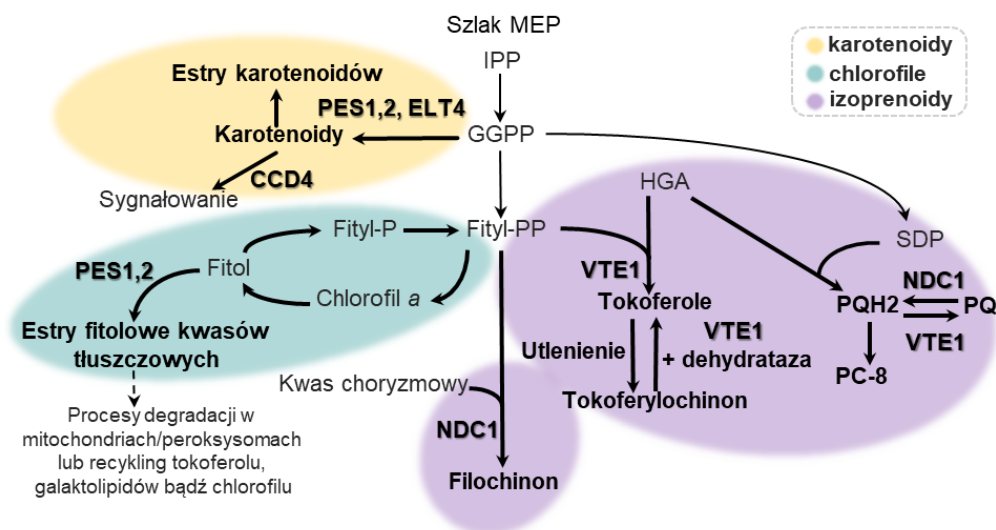
Do najważniejszych i najlepiej poznanych białek zidentyfikowanych w plastoglobulach należy cyklaza tokoferolu (VTE1, *Tocopherol cyclase*) [58]. Cyklaza tokoferolu jest kluczowym enzymem biorącym udział w syntezie  $\alpha$ -tokoferolu, najbardziej reaktywnej formy witaminy E. Tokoferol występuje jedynie w organizmach tlenowych przeprowadzających proces fotosyntezy, chroni lipidy przed wolnymi rodnikami tlenowymi oraz bierze udział w ochronie struktur komórkowych [58]. Jeszcze w latach 90-tych uważano, iż wszystkie etapy biosyntezy witamin E zachodzą w podwójnej błonie otaczającej chloroplasty [59]. Obecnie wiadomo,

że VTE1 lokalizuje się głównie w plastoglobulach (Ryc. 2), zarówno chloroplastów jak i chromoplastów [13,50], przeprowadzając zmiany 2,3-dimetylo-6-fitylo-1,4-benzochinonu (DMPBQ) do  $\gamma$ -tokoferolu. Reakcja ta zachodzi na terenie plastoglobul i stanowi pośredni etap syntezy  $\alpha$ -tokoferolu (Ryc. 3) [60]. Pozostałe etapy syntezy mają miejsce na terenie stromy plastydu i katalizowane są przez enzymy: VTE3 (*Phytylbenzoquinol Methyltransferase*) i VTE4 ( *$\gamma$ -Tocopherol Methyltransferase*).

VTE1 bierze także udział w cyklu naprawczym  $\alpha$ -tokoferolu oraz odpowiada za syntezę plastochromanolu-8 z plastochinonu-9, oba te procesy zachodzą we wnętrzu plastoglobul (Ryc. 3) [60,61].

Wykazano, iż aktywność VTE1 wzrasta podczas stresu oksydacyjnego, chroniąc w ten sposób błony plastoglobul i tylakoidów przed utleniaczami [21]. Związany z tym wzrost zawartości  $\alpha$ -tokoferolu i plastochromanolu-8 powoduje zwiększenie objętości i liczby plastoglobul w chloroplastach [40]. Natomiast, mutant *Arabidopsis thaliana vte1* pozbawiony cyklazy tokoferolu, posiada fenotyp niezwykle wrażliwy na działanie silnego światła, gdyż pozbawiony obecności  $\alpha$ -tokoferolu oraz plastochromanolu-8 w chloroplastach, narażony jest na działanie powstających reaktywnych form tlenu (ROS). Badania wykazały, iż VTE1 podlega ścisłej regulacji na terenie plastoglobul w wyniku fosforylacji przez dwie kinazy obecne w otocze tych struktur ABC1K1 i ABC1K3 [39,57], podkreślając istotną rolę plastoglobul nie tylko jako rezerwuarów antyoksydantów ale też platform zachodzenia wielu reakcji metabolicznych.

Funkcja dehydrogenazy NADP(H) C1 typu II (ang. *NDC1, NAD(P)H Dehydrogenase C1*) w czasie pojawienia się pierwszych analiz proteomu plastoglobul była nieznaną [21], zaś wcześniejsze badania nad genem kodującym ten enzym wskazywały na jego mitochondrialną lokalizację [62]. Do poznania funkcji NDC1 na terenie plastoglobul przyczyniły się prace zespołu Kesslera w 2011 roku [41]. Dzięki zasto-



**Rycina 3.** Zintegrowany schemat funkcji enzymatycznych sześciu białek występujących w plastoglobulach w szlakach metabolizmu izoprenoidów i lipidów neutralnych. Skrót: CCD4, dioksygenaza karotenowa 4; ELT4, esteraza/lipaza 4; GGPP, difosforan geranylogeranylu; HGA, kwas homogentyzynowy; IPP, difosforan izopentenyli; MEP, fosforan metyloerytrytolu; NDC1, dehydrogenaza NAD(P)H C1 typu II; P, fosforan; PC-8, plastochochromanol-8; PES1 i 2, syntazy estrów fitolowych 1 i 2; PQ, plasto-chinon-9; PQH2, plastochinon-9; VTE1, cyklaza tokoferolu (opracowane na podstawie [8]).

sowaniu immunolokalizacji z białkiem GFP, potwierdzono obecność NDC1 w otoczce plastoglobul (Ryc. 2), zaś badania nad mutantami *Arabidopsis ndc1* pozwoliły na identyfikację trzech ważnych procesów, w których bierze udział na terenie tych struktur [40,41]. NDC1 jest niezbędnym enzymem w biosyntezie filochinonu (witamina K1), ponadto bierze udział w procesie redukcji plastochinonu-9 regenerując jego pulę na terenie plastoglobul i umożliwiając w ten sposób syntezę plastochochromanolu-8 (Ryc. 3). Postuluje się także, że wraz z VTE1 zaangażowany jest na jednym z etapów w cykl naprawczy  $\alpha$ -tokoferolu z  $\alpha$ -tokoferylochinolu [8,40,61].

#### ROLA W PROCESIE STARZENIA

Zwiększająca się liczba i rozmiary plastoglobul podczas procesu starzenia, wynikające z gromadzenia się w ich wnętrzu lipidowych produktów rozpadu błon tylakoidów (galaktolipidów, karotenoidów i chlorofilu) jest prawdopodobnie mechanizmem obronnym przed toksycznym charakterem uwolnionych w tym procesie reszt fitolowych i grup acylowych [11,61]. Za odłączenie  $Mg^{2+}$  z pierścienia porfirynowego i uwolnienie fitolu z chlorofilu odpowiada zlokalizowany w plastoglobulach enzym PPH (*Pheophytin Pheophorbide Hydrolase*) [39]. Następnie dwie występujące w plastoglobulach syntazy estrów fitolowych PES1 i PES2 (*Phytol Ester Synthase*) katalizują reakcję odcinania reszt fitolowych z cząsteczek chlorofilu i uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych z galaktolipidów (Ryc. 3) [21]. Trzecim komponentem wspomagającym proces syntezy TAGs na terenie plastoglobul podczas procesu starzenia i w warunkach deficytu azotu jest enzym ELT4 (*Esterase/Lipase/Thioesterase 4*) (Ryc. 3), należący do tej samej rodziny ELT acylotransferaz co PES1 i PES2 [50]. Jednak dokładny mechanizm działania tego enzymu w plastoglobulach nie został do końca poznany.

Jedną z pierwszych wykrytych funkcji plastoglobul związana była z akumulacją i biosyntezą karotenoidów.

Plastoglobule chromoplastów magazynują duże ilości tych związków nadając chromoplastom ich charakterystyczne zabarwienie, od odcieni pomarańczy po czerwień. Za ten stan odpowiedzialne są enzymy zlokalizowane we wnętrzu plastoglobul: desaturaza  $\zeta$ -karotenu (ang. *ZDS*,  $\zeta$ -*Carotene Desaturase*) związana z syntezą likopenu, cyklaza  $\beta$ -likopenu (ang. *LYC- $\beta$* , *Lycopene  $\beta$ -Cyclase*) przeprowadzająca reakcję cyklizacji, których głównym produktem jest  $\beta$  oraz  $\alpha$ -karoten oraz  $\beta$ -hydrochlaza  $\beta$ -karotenu (ang. *CrtR- $\beta$* ,  *$\beta$ -Carotene  $\beta$ -Hydroxylases*) hydrolizująca powstałą pulę karotenu do luteiny na terenie plastoglobul [8,11,21]. Dioksygenaza karotenowa 4 (ang. *CCD4*, *Carotenoid Dioxygenase 4*) (Ryc. 2) obecna w otoczce plastoglobul zarówno chloro- jak i chromoplastów jest enzymem ściśle związanym z procesem starzenia. Katalizuje oksydacyjny rozkład karotenoidów zgromadzonych w tych strukturach:  $\beta$ -karotenu, luteiny i zeaksantyny w pozycji 9,10 i 9',10' do apokarotenoidów, głównie  $\beta$ -jononu,  $\beta$ -cytrauryny i  $\beta$ -cyklocytralu [8,55,63]. Apokarotenoidy funkcjonują jako cząsteczki sygnałowe w odpowiedzi roślin na stres np. silnego światła [8] wpływając na ekspresję wielu genów u *Arabidopsis* (Ryc. 3) [55]. Mutanty *Arabidopsis* pozbawione CCD4 akumulują znaczne ilości karotenoidów ( $\beta$ -karotenu, luteiny i wiolaksantyny) we wnętrzu plastoglobul, co wpływa stymulująco na proces starzenia [8,63]. Efekt odwrotny, wraz z obniżoną zawartością tych związków w plastoglobulach, obserwujemy u mutantów z nadekspresją enzymu CCD4. Informacje te wskazują na prawdopodobną regulacyjną rolę tego enzymu nie tylko w procesie starzenia ale także w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny [8,55].

Według najnowszych doniesień dotyczących analiz proteomu plastoglobul, postulowany jest udział dodatkowej peptydazy zlokalizowanej w plastoglobulach, kontrolującej aktywność głównych enzymów zaangażowanych w rozkład związków lipidowych we wnętrzu tych struktur: PES1 i CCD4 (Ryc. 2). Funkcje te przypisywane są białku PGM48 (AT3G27110, Plastoglobular M48). Ekspresja tego enzymu znacznie wzrasta podczas naturalnego procesu starzenia

liści, zaś badania na mutantach pozbawionych bądź wykazujących nadekspresję PGM48 wskazują na pozytywną regulację tego procesu [49,63]. Eksperymenty przeprowadzone przy użyciu drożdżowego systemu dwuhybrydowego (Y2H), badającego interakcje białkowe między PGM48 a wybranymi białkami plastoglobul, wyłoniły 3 enzymy silnie oddziałujące z badaną peptydazą: PES1, CCD4 i ABC1K3. Jedynie w przypadku CCD4 udało się ustalić charakter regulacji wywieranej przez PGM48 jako silnie represyjny. Informacje te są jednak nadal niepewne, lecz stanowią prelude do ujawnienia nowych enzymatycznych szlaków interakcji we wnętrzu plastoglobul.

Proteom plastoglobul zawiera także trzy aldolazy fruktozo-bisfosforanowe (FBPAs, *Fructose-bisphosphate Aldolases*), które uczestniczą w cyklu Calvina i glikolizie (Ryc. 2). Dwie z nich dotąd uważane były za obecne jedynie na terenie stromy chloroplastów: AT4G38970 (FBPA-2), At2g21330 (FBPA-1) oraz występująca tylko na terenie plastoglobul aldolaza fruktozo-bisfosforanowa 3 (ang. *FBPA-3, Fructose-bisphosphate Aldolase-3*). Homologi wszystkich trzech enzymów znajdują się także w plastoglobulach chromoplastów [21]. Aktywność aldolaz w plastoglobulach jest wysoka i wynosi 10% całkowitej aktywności tych enzymów zarówno w chloroplastach jak i chromoplastach. Brak pozostałych komponentów kluczowych do przeprowadzenia cyklu Calvina i glikolizy na terenie plastoglobul sugeruje, iż zidentyfikowane aldolazy muszą pełnić odrębne, do końca nie poznane funkcje w tych strukturach. Uważa się, iż mogą być one zaangażowane w przepływ węgla do i z plastoglobul [Brehelin, Kessler, niepublikowane] [21].

#### BIĄŁKA PLASTOGLOBUL O MNIEJ POZNANEJ ROLI

Oprócz wyżej wymienionych białek istnieje wiele do tej pory niesklasyfikowanych białek specyficznych dla plastoglobul (Ryc. 2). Analizując domeny funkcyjne tych białek, stwierdzono iż dwa z nich AT1G78140 oraz AT2G41040 są prawdopodobnie związane z metabolizmem chinonów, zaś AT1G32220, AT2G34460, AT1G06690 biorą udział w rozkładzie lipidów/bądź procesie recyklingu  $\alpha$ -tokoferolu, gdyż posiadają domeny reduktazy. Proteom plastoglobul zawiera także białko z domeną  $\alpha/\beta$ -hydrolazy związane z procesem starzenia (ang. *SAG, Senescence Associated Gene*), a także białko AT3G43540 o potwierdzonej lokalizacji w plastoglobulach lecz niezidentyfikowanej przypuszczalnej funkcji [8]. Ostatnio grupa Espinoza-Corral [64] badając funkcje najmniejszego zlokalizowanego w plastoglobulach białka PG18 (ang. *AT4G13200, Plastoglobular Protein 18*), dotąd niesklasyfikowanego z powodu braku przewidywanej domeny funkcyjnej, wykazała jego rolę w biogenezie tylakoidów. Białko SOUL4 (ang. *AT3G10130, Soul Heme Binding Protein 4*) z domeną wiążącą hem zostało wykryte, za pomocą spektrometrii mas (MS/MS), w otoczce plastoglobul już podczas pierwszych analiz proteomu tych struktur [21]. Jednak dopiero niedawno lokalizacja SOUL4 została definitywnie potwierdzona w plastoglobulach na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Niestety jego funkcja nadal pozostaje tajemnicą [65].

Należy także wspomnieć o puli białek: lipoksygenazy (*Lipoxygenase 2, -3, -4*), syntazy tlenu allenu (ang. *AOS*,

*Allene Oxide Synthase*) i cykazy tlenu allenu (ang. *AOC, Allene Oxide Cyclase*) o charakterze enzymatycznym i potwierdzonej lokalizacji plastydowej, które zaangażowane w proces syntezy hormonu roślinnego kwasu jasmonowego, prawdopodobnie podlegają kontrolowanej rekrutacji do wnętrza plastoglobul [8]. Informacje te są jednak niepewne, a szczegółowa wiedza o składzie białkowym plastoglobul i jego wzajemnych interakcjach pozostaje do końca niejasna.

#### MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA PLASTOGLOBUL W BIOTECHNOLOGII ROŚLIN

Jednym z kierunków badań biotechnologicznych jest wykorzystanie roślin transgenicznych do produkcji środków farmaceutycznych. Stwierdzono, iż rośliny mogą stanowić alternatywę dla stosowanych systemów fermentacyjnych (bakterii, drożdży lub zwierzęcych kultur komórkowych) w produkcji rekombinowanych białek. System ekspresji białek w roślinach pozwala na wytwarzanie rekombinowanych białek na ogromną skalę, jednocześnie znacznie obniżając koszty ich produkcji. Rośliny są mniej podatne, w porównaniu z kulturami *in vitro*, na zakażenia patogenami i wymagają jedynie ustalenia odpowiednich procedur uprawy. Chloroplasty z powodu dużych rozmiarów, liczby w komórce oraz prostego genomu są dogodnym obiektem transformacji oraz miejscem magazynowania ekspymowanych białek. Ponadto wprowadzenie obcego DNA do genomu chloroplastowego umożliwia uzyskanie znacznej liczby kopii transgenicznego DNA i w konsekwencji dużej liczby rekombinowanych białek [36]. Istotną zaletą roślin zawierających transgeniczne chloroplasty jest brak możliwości przeniesienia zmodyfikowanych genów na spokrewnione rośliny podczas rozmnażania generatywnego, ponieważ chloroplasty dziedziczą się tylko w linii matczynej [66].

Ważnymi zagadnieniami w przemysłowej produkcji rekombinowanych białek pochodzenia roślinnego są procesy ekstrakcji i oczyszczania. Standardowe protokoły uwzględniają homogenizację biomasy roślinnej a następnie procedury chromatograficzne, których wydajność jest ograniczona przez obecność metabolitów roślinnych. Do tej pory uważano, iż to stroma chloroplastów jest głównym miejscem nagromadzenia białek we wnętrzu plastydów. Jednak odkrycie, że na powierzchni i we wnętrzu plastoglobul lokalizują się białka z rodziny PAP (plastoglobuliny) stwarza nowe możliwości w badaniach biotechnologicznych, ponieważ możliwość akumulacji transgenicznego białka w plastoglobulach uprościłaby procedurę oczyszczania białkowego produktu [36]. Przeprowadzone badania polegające na ekspresji w *Arabidopsis thaliana* transgeny złożonego z plastoglobuliny o masie 34 kDa (PGL 34) i białka fluorescencyjnego YFP (ang. *yellow fluorescent protein*) umożliwiającego wizualizację białkowej hybrydy, wykazały umiejscowienie tego produktu w plastoglobulach. Rozdział frakcji chloroplastowych metodą wirowania w gradiencie stężeń sacharozy potwierdził lokalizację białkowego produktu we frakcji odpowiadającej błonom plastoglobul [36].

Dokonano już fuzji fibryliny 1 z białkami rdzenia wirusa zapalenia wątroby typu C oraz białka p34 z kapsydu wirusa HIV (co zapewnia ich lokalizację wyłącznie w plastoglobulach) [67]. Trwają badania nad optymalizacją procesu



do poziomu, który byłby wystarczający do zastosowania tej metody w produkcji szczepionek.

Kolejna możliwość zastosowania specyficznego składu plastoglobul to biopaliwa [68]. Triacyloglicerole występujące w plastoglobulach to podstawowy składnik olejów roślinnych a zlokalizowana w chloroplastach biosynteza kwasów tłuszczowych, szczególnie w odpowiednich warunkach (nadmiar światła, niski poziom azotu) powoduje nadmierną akumulację TAG w plastoglobulach i kroplach tłuszczowych w cytoplazmie [68-71]. Takie podejście wydaje się być szczególnie cenne dla innych niż normalnie używane roślin oleistych, gdzie presja pozyskania olejów spożywczych nie paliwowych jest bardzo duża. Umożliwia to również wykorzystanie glonów typu *Chlamydomonas reinhardtii* czy *Nannochloropsis* [8,68,70,72].

Istnieje zatem potencjalna możliwość wykorzystania plastoglobul jako specyficznych miejsc akumulacji białek transgenicznych, szczególnie o charakterze hydrofobowym, i wykorzystaniu tak stworzonego układu w biotechnologii oraz wykorzystania ich jako zasobu do pozyskania cennych kwasów tłuszczowych.

## PODSUMOWANIE

Plastoglobule występują we wszystkich plastydach w postaci kulistych, otoczonych pojedynczą błoną, osmofilnych ciał. Te białkowo-lipidowe struktury połączone z tylakoidami chloroplastów, pełnią rolę dodatkowej mikrodomeny wypełnionej w większości składnikami lipidowymi (TAG, lipofilne prenylochinony) oraz białkami o charakterze enzymatycznym i strukturalnym. Plastoglobule odgrywają rolę w wielu istotnych procesach i szlakach metabolicznych m.in. biorą udział w tworzeniu aparatu fotosyntetycznego, magazynują składniki błon tylakoidów, uczestniczą w biosyntezie antyoksydantów, witamin i hormonów. Ich specyficzny, silnie hydrofobowy charakter znalazł zastosowanie w biotechnologii roślin, w otrzymywaniu cennych kwasów tłuszczowych oraz jako miejsce akumulacji białek transgenicznych. Trwające od ponad 50 lat badania nad ujawnieniem pełnego składu i roli plastoglobul w plastydach nadal pozostawiają wiele niewyjaśnionych kwestii. Wydaje się, iż najnowsze doniesienia literaturowe stale poszerzają listę prawdopodobnych funkcji plastoglobul i kontrolowanych w nich procesów. Jedną z nich jest prawdopodobna rola ochronna, przypisywana tym strukturom, w odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne, takie jak susza czy stres niskiej i wysokiej temperatury. Szybki rozwój technik biologii molekularnej, obrazowania komórkowego oraz biochemii komórek roślinnych ostatniej dekady z pewnością zaowocuje wkrótce wieloma nowymi, ekscytującymi informacjami na temat natury i funkcji plastoglobul.

## PIŚMIENNICTWO

1. Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, Maoka T, Hirakawa H, Suzuki Y, Ozeki Y, Shirasawa K, Bernillon S, Okabe Y, Moing A, Asamizu E, Rothan C, Ohmiya A, Ezura H (2014) Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant J* 79: 453-465
2. Austin JR, 2nd, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are

permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* 18: 1693-1703

3. Bailey JL, Whyborn AG, Williams JP, Leech RM, Greenwood AD (1963) Osmiophilic Globules of Chloroplasts. *Biochem J* 88: P27
4. Bartz R, Zehmer JK, Zhu M, Chen Y, Serrero G, Zhao Y, Liu P (2007) Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res* 6: 3256-3265
5. Basset GJ, Latimer S, Fatihi A, Soubeyrand E, Block A (2017) Phylloquinone (Vitamin K-1): Occurrence, Biosynthesis and Functions. *Mini-Rev Med Chem* 17: 1028-1038
6. Bhuiyan NH, Friso G, Rowland E, Majsec K, van Wijk KJ (2016) The Plastoglobule-Localized Metallopeptidase PGM48 Is a Positive Regulator of Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28: 3020-3037
7. Bhuiyan NH, van Wijk KJ (2017) Functions and substrates of plastoglobule-localized metallopeptidase PGM48. *Plant Signal Behav* 12: e1331197
8. Bock R (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* 312: 425-438
9. Brehelin C, Kessler F, van Wijk KJ (2007) Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Sci* 12: 260-266
10. Brehelin C, Kessler F (2008) The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochem Photobiol* 84: 1388-1394
11. Brocard L, Immel F, Coulon D, Esnay N, Tiphile K, Pascal S, Claverol S, Fouillen L, Bessoule JJ, Brehelin C (2017) Proteomic Analysis of Lipid Droplets from *Arabidopsis* Aging Leaves Brings New Insight into Their Biogenesis and Functions. *Front Plant Sci* 8: 894
12. Camara B, Huguency P, Bouvier F, Kuntz M, Moneger R (1995) Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *Int Rev Cytol* 163: 175-247
13. Cunningham FX, Jr., Tice AB, Pham C, Gantt E (2010) Inactivation of genes encoding plastoglobuli-like proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to a light-sensitive phenotype. *J Bacteriol* 192: 1700-1709
14. Davidi L, Shimoni E, Khozin-Goldberg I, Zamir A, Pick U (2014) Origin of beta-carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* 164: 2139-2156
15. Deruere J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B (1994) Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* 6: 119-133
16. Du ZY, Benning C (2016) Triacylglycerol Accumulation in Photosynthetic Cells in Plants and Algae. *Subcell Biochem* 86: 179-205
17. Du ZY, Alvaro J, Hyden B, Zienkiewicz K, Benning N, Zienkiewicz A, Bonito G, Benning C (2018) Enhancing oil production and harvest by combining the marine alga *Nannochloropsis oceanica* and the oleaginous fungus *Mortierella elongata*. *Biotechnol Biofuels* 11: 174
18. Engel BD, Schaffer M, Kuhn Cuellar L, Villa E, Plitzko JM, Baumeister W (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by *in situ* cryo-electron tomography. *Elife* 4: e04889
19. Espinoza-Corral R, Heinz S, Klingl A, Jahns P, Lehmann M, Meurer J, Nickelsen J, Soll J, Schwenkert S (2019) Plastoglobular protein 18 is involved in chloroplast function and thylakoid formation. *J Exp Bot* 70: 3981-3993
20. Eugeni Piller L, Besagni C, Ksas B, Rumeau D, Brehelin C, Glauser G, Kessler F, Havaux M (2011) Chloroplast lipid droplet type II NAD(P) H quinone oxidoreductase is essential for prenylquinone metabolism and vitamin K1 accumulation. *Proc Natl Acad Sci* 108: 14354-14359
21. Eugeni Piller L, Glauser G, Kessler F, Besagni C (2014) Role of plastoglobules in metabolite repair in the tocopherol redox cycle. *Front Plant Sci* 5: 298
22. Frusciantè S, Diretto G, Bruno M, Ferrante P, Pietrella M, Prado-Cabrero A, Rubio-Moraga A, Beyer P, Gomez-Gomez L, Al-Babili S, Giuliano G (2014) Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 111:12246-12251
23. Greenwood AD, Leech RM, Williams JP (1963) Osmiophilic Globules of Chloroplasts. 1. Osmiophilic Globules as a Normal Component of


- Chloroplasts and Their Isolation and Composition in *Vicia faba* L. *Biochim Biophys Acta* 78:148
24. Hadjeb N, Gounaris I, Price CA (1988) Chromoplast-Specific Proteins in *Capsicum annuum*. *Plant Physiol* 88: 42-45
  25. Hansmann P, Sitte P (1982) Composition and molecular structure of chromoplast globules of *Viola tricolor*. *Plant Cell Rep* 1: 111-114
  26. Harris JB, Schaefer VG (1981) Some Correlated Events in Aging Leaf Tissues of Tree Tomato and Tobacco. *Botan Gazette* 142: 43-54
  27. Hortensteiner S (2004) The loss of green color during chlorophyll degradation – a prerequisite to prevent cell death? *Planta* 219: 191-194
  28. Huang AHC (2018) Plant Lipid Droplets and Their Associated Proteins: Potential for Rapid Advances. *Plant Physiol* 176: 1894-1918
  29. Kessler F, Schnell D, Blobel G (1999) Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208:107-113
  30. Krahmer N, Farese RV, Jr., Walther TC (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 5: 973-983
  31. Ksasz B, Becuwe N, Chevalier A, Havaux M (2015) Plant tolerance to excess light energy and photooxidative damage relies on plastoquinone biosynthesis. *Sci Rep* 5: 10919
  32. Langenkamper G, Manac'h N, Broin M, Cuine S, Becuwe N, Kuntz M, Rey P (2001) Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species. *J Exp Bot* 52: 1545-1554
  33. Lavell AA, Benning C (2019) Cellular Organization and Regulation of Plant Glycerolipid Metabolism. *Plant Cell Physiol* 60: 1176-1183
  34. Lichtenthaler HK (1969) [Plastoglobuli and lipoquinone content of chloroplasts from *Cereus peruvianus* (L.) Mill]. *Planta* 87: 304-310
  35. Liu L (2016) Ultramicroscopy reveals that senescence induces in-situ and vacuolar degradation of plastoglobules in aging watermelon leaves. *Micron* 80: 135-144
  36. Lohscheider JN, Friso G, van Wijk KJ (2016) Phosphorylation of plastoglobular proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 67: 3975-3984
  37. Lohscheider JN, Rio Bartulos C (2016) Plastoglobules in algae: A comprehensive comparative study of the presence of major structural and functional components in complex plastids. *Mar Genomics* 28: 127-136
  38. Lundquist PK, Poliakov A, Bhuiyan NH, Zybailov B, Sun Q, van Wijk KJ (2012) The functional network of the Arabidopsis plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide co-expression analysis. *Plant Physiol* 158: 1172-1192
  39. Lundquist PK, Poliakov A, Giacomelli L, Friso G, Appel M, McQuinn RP, Krasnoff SB, Rowland E, Ponnala L, Sun Q, van Wijk KJ (2013) Loss of Plastoglobule Kinases ABC1K1 and ABC1K3 Causes Conditional Degreening, Modified Prenyl-Lipids, and Recruitment of the Jasmonic Acid Pathway. *Plant Cell* 25: 1818-1839
  40. Martinis J, Glauser G, Valimareanu S, Kessler F (2013) A chloroplast ABC1-like kinase regulates vitamin E metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiol* 162:652-662
  41. Martinis J, Glauser G, Valimareanu S, Stettler M, Zeeman SC, Yamamoto H, Shikanai T, Kessler F (2014) ABC1K1/PGR6 kinase: a regulatory link between photosynthetic activity and chloroplast metabolism. *Plant J* 77: 269-283
  42. Michalecka AM, Svensson AS, Johansson FI, Agius SC, Johanson U, Brennicke A, Binder S, Rasmusson AG (2003) Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol* 133: 642-652
  43. Moldavski O, Amen T, Levin-Zaidman S, Eisenstein M, Rogachev I, Brandis A, Kaganovich D, Schuldiner M (2015) Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies. *Dev Cell* 33: 603-610
  44. Nacir H, Brehelin C (2013) When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example. *Front Plant Sci* 4: 114
  45. Park RB, Pon NG (1961) Correlation of structure with function in *Spinacea oleracea* chloroplasts. *J Mol Biol* 3: 1-10
  46. Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, Lemke R, Dormann P (2002) Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci* 99: 12495-12500
  47. Pralon T, Kessler F (2016) Plastoglobules: Lipid Droplets at the Thylakoid Membrane, W: Kirchhoff W (red) Chloroplasts: Current Research and Future Trends, Caister Academic Press, Pullman, USA, str. 171-186
  48. Rey P, Gillet B, Romer S, Eymery F, Massimino J, Peltier G, Kuntz M (2000) Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *Plant J* 21: 483-494
  49. Rinnan R, Holopainen T (2004) Ozone effects on the ultrastructure of peatland plants: *Sphagnum mosses*, *Vaccinium oxycoccus*, *Andromeda polifolia* and *Eriophorum vaginatum*. *Ann Bot* 94: 623-634
  50. Rottet S, Besagni C, Kessler F (2015) The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. *Biochim Biophys Acta* 1847: 889-899
  51. Rottet S, Devillers J, Glauser G, Douet V, Besagni C, Kessler F (2016) Identification of Plastoglobules as a Site of Carotenoid Cleavage. *Front Plant Sci* 7:1855
  52. Schmidt M, Gessner G, Luff M, Heiland I, Wagner V, Kaminski M, Geimer S, Eitzinger N, Reissenweber T, Voytsekh O, Fiedler M, Mittag M, Kreimer G (2006) Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *Plant Cell* 18: 1908-1930
  53. Shanmugabalaji V, Besagni C, Piller LE, Douet V, Ruf S, Bock R, Kessler F (2013) Dual targeting of a mature plastoglobulin/fibrillin fusion protein to chloroplast plastoglobules and thylakoids in transplastomic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 81: 13-25
  54. Shanmugabalaji V, Grimm B, Kessler F (2020) Characterization of a Plastoglobule-Localized SOUL4 Heme-Binding Protein in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 11: 2
  55. Singh DK, Laremore TN, Smith PB, Maximova SN, McNellis TW (2012) Knockdown of FIBRILLIN4 gene expression in apple decreases plastoglobule plastoquinone content. *PLoS one* 7: e47547
  56. Smirra I, Halevy AH, Vainstein A (1993) Isolation and Characterization of a Chromoplast-Specific Carotenoid-Associated Protein from *Cucumis sativus* Corollas. *Plant Physiol* 102: 491-496
  57. Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 238: 290-299
  58. Spicher L, Kessler F (2015) Unexpected roles of plastoglobules (plastid lipid droplets) in vitamin K1 and E metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 25: 123-129
  59. Staehelin LA (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photos Res* 76: 185-196
  60. Steinmuller D, Tevini M (1985) Composition and function of plastoglobuli: I. Isolation and purification from chloroplasts and chromoplasts. *Planta* 163: 201-207
  61. van de Meene AM, Hohmann-Marriott MF, Vermaas WF, Roberson RW (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* 184: 259-270
  62. van Wijk KJ, Kessler F (2017) Plastoglobuli: Plastid Microcompartments with Integrated Functions in Metabolism, Plastid Developmental Transitions, and Environmental Adaptation. *Ann Rev Plant Biol* 68: 253-289
  63. Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dormann P, Kessler F, Brehelin C (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* 281: 11225-11234
  64. Vidi PA, Kessler F, Brehelin C (2007) Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotech* 7: 4
  65. Whatley JM, Whatley FR (1987) WHEN IS A CHROMOPLAST? *New Phytol* 106: 667-678

66. Wilfling F, Wang H, Haas JT, Krahmer N, Gould TJ, Uchida A, Cheng JX, Graham M, Christiano R, Frohlich F, Liu X, Buhman KK, Coleman RA, Bewersdorf J, Farese RV, Jr., Walther TC (2013) Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell* 24: 384-399
67. Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, Yu J, Zhang P, Na H, Zhang H, Ma Y, Liu P (2012) The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* 53: 1245-1253
68. Yang Y, Benning C (2018) Functions of triacylglycerols during plant development and stress. *Curr Opin Biotech* 49: 191-198
69. Youssef A, Laizet Y, Block MA, Marechal E, Alcaraz JP, Larson TR, Pontier D, Gaffe J, Kuntz M (2010) Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *Plant J* 61: 436-445
70. Ytterberg AJ, Peltier JB, van Wijk KJ (2006) Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol* 140: 984-997
71. Zbierzak AM, Kanwischer M, Wille C, Vidi PA, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Brehelin C, Kessler F, Dormann P (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobules. *Biochem J* 425: 389-399
72. Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Poliner E, Du ZY, Vollheyde K, Herrfurth C, Marmon S, Farre EM, Feussner I, Benning C (2017) Nannochloropsis, a rich source of diacylglycerol acyltransferases for engineering of triacylglycerol content in different hosts. *Biotechnol Biofuels* 10: 8

## Plastoglobules - underestimated components of the plant cell

Joanna Wójtowicz, Katarzyna Gieczewska 

Department of Plant Anatomy and Cytology, Institute of Experimental Plant Biology and Biotechnology, Warsaw

 author for correspondence: kat.gieczewska@biol.uw.edu.pl

**Keywords:** plant biotechnology, thylakoid membranes, fibrillins, carotenoid metabolism, prenylquinone metabolism, protein-lipid monolayer, abiotic stress

### ABSTRACT

Plastoglobules (PGs), as important components of plastids, are involved in many stages of their development: from the chloroplast biogenesis through the chloroplast-chromoplast transformations, and finally in the process of gerontoplast formation. The unique protein and lipid composition of these structures, depending on their location, suggests that PGs are both a reservoir of spare materials and a center for many metabolic reactions. Plastoglobules play an active role in the metabolism of prenylquinones, carotenoids, and jasmonic acid, and are responsible for recycling of the thylakoid disintegration products. Their direct connection with the thylakoids allows for tight relationships between these two structures and redistribution of materials, which contributes to PGs' role in response to stressful conditions. Moreover, strongly hydrophobic nature of plastoglobules, their specific proteome and a sufficiently simple isolation procedure create extraordinary possibilities of their application in plant biotechnology.