УДК 581.1

РЕТРОГРАДНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА ХЛОРОПЛАСТОВ

© 2019 г. Н. П. Юрина^{а, 1}, М. С. Одинцова^а

^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.05.2018 г.

После доработки 15.08.2018 г.

Принята к публикации 03.09.2018 г.

В обзоре суммированы современные представления о природе и функциях ретроградных сигналов (ретроградном сигналинге) пластид, преимущественно хлоропластов. Подчеркивается участие ретроградных сигналов пластид в меж- и внутриклеточных сигнальных путях, их роль в процессах роста и развития растений. Изложены немногочисленные данные о малоизученной ретроградной сигнальной системе митохондрий растений.

Ключевые слова: хлоропласты – ретроградные сигналы – метаболиты – факторы транскрипции

DOI: 10.1134/S0015330319040146

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, пластиды произошли от свободно живущей фотосинтезирующей цианобактерии около 1.6 млрд лет назад. В течение пост-эндосимбиотической эволюции хлоропластов большинство генов, кодируемых этим бактериальным предком, были перенесены в ядерный геном клеток хозяина. Геномы пластид современных наземных растений кодируют только 60–200 белков, в то время как число белков, функционирующих в хлоропластах, составляет от 2000 до 4000 тысяч [1, 2]. Эти белки участвуют в фотосинтезе, биосинтезе жирных кислот, аминокислот, гормонов, витаминов, нуклеотидов и вторичных метаболитов, а также во внутриклеточном сигналинге. Идентифицировано 1750 ядерных белков, функционирующих в хлоропластах: ~344 белка в строме, ~400 белков в тилакоидах и ~400 белков в двуслойной окружающей мембране пластид [1]. Мультибелковые комплексы хлоропластов, необходимые для образования полностью функциональных органелл, мозаичны по своему происхождению и состоят из субъединиц (СЕ), синтезированных в

самых органеллах, а также СЕ, кодируемых генами в ядре, транслируемыми в цитозоле и посттрансляционно поступающими в хлоропласты. В комплексах ЭТЦ тилакоидной мембраны одна часть СЕ кодируется геномом хлоропластов, а другая – геномом ядра. В строме большая субъединица РБФК/О (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа) кодируется геномом пластид, в то время как малая субъединица – ядром [3]. Локализация генов, кодирующих белки хлоропластов в различных компартментах клетки, свидетельствует о существовании молекулярных и физиологических механизмов, которые координируют экспрессию ядерных и пластидных генов, что позволяет сохранить функции пластид и клеток на всех стадиях развития растений при различных условиях окружающей среды [1, 4]. Чтобы обеспечить правильность сборки важнейших фотосинтетических комплексов пластид и их реорганизацию в ответ на изменения окружающей среды, возник процесс так называемого ретроградного сигналинга, когда пластиды посылают в ядро сигналы, регулирующие экспрессию ядерных генов в соответствии с состоянием органелл [3].

Настоящий обзор суммирует современные представления о быстро развивающейся области биологии – ретроградном сигналинге хлоропластов. Особое внимание уделено типам ретроградных сигналов. Приводятся новые данные о метаболитах как источниках ретроградных сигналов, а также о потенциальных ретроградных сигналах. Также обсуждаются полученные в последнее время данные об участии факторов транскрипции в передаче ретроградных сигналов. Не обсуждаются вопросы участия редокс-состояния электрон-транспорт-

Сокращения: СЕ – субъединица; PPR – пентатрикопептидный повтор; PAP – фосфоаденозин-5-фосфат; МЕСРР – метилэритрол-циклодифосфат; β-СС – β-циклоцитраль; CAS – Ca²⁺-связывающий белок хлоропластов; JA – жасмоновая кислота; Et – этилен; SA – салициловая кислота; ABA – абсцизовая кислота; ER – эндоплазматический ретикулум; ТФ – транскрипционные факторы; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; АФК – активные формы кислорода.

¹ Адрес для корреспонденции: Юрина Надежда Петровна. 119071 Москва, Ленинский проспект, 33. Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН. Электронная почта: nyurina@inbi.ras.ru

ной цепи хлоропластов в ретроградном сигналинге, которые требуют отдельного рассмотрения.

РЕТРОГРАДНЫЙ СИГНАЛИНГ

Традиционно ретроградный сигналинг определяют как процесс передачи информации от пластид к ядру, ведущий к изменению транскрипции ядерных генов и биогенезу белков, необходимых хлоропласту. В более широком смысле под ретроградным сигналингом понимают процесс, при котором внешний “раздражитель” нарушает гомеостаз пластид и дает начало одному или ряду ретроградных сигналов, которые осуществляют многоуровневый контроль транскрипции ядерных генов белков пластид и в итоге изменяют функционирование пластид [5, 6]. Ретроградный сигналинг обнаружен у представителей всех царств эукариот: животных, грибов и растений, но каждое царство, вероятно, имеет свои собственные ретроградные системы [7].

Первое сообщение о ретроградном сигналинге пластид было опубликовано около 40 лет назад в результате исследования двух мутантов ячменя (*albostrians* и *Saskatoon* мутанты *Hordeum vulgare* cv. Haisa) с морфологически aberrантными пластидами [4, 8, 9]. У этих мутантов была частично понижена экспрессия ядерных генов. Позднее аналогичные мутанты были обнаружены у других растений [4, 9]. На этом основании было высказано предположение, что пластиды, по-видимому, посылают сигнал в ядро, “сообщая” ему о своем физиологическом и функциональном состоянии. В настоящее время известно, что в пластидах функционирует сложная сеть многочисленных ретроградных сигнальных путей, которые взаимодействуют друг с другом и с другими сигнальными системами клетки [10–15]. Показано, что один ретроградный сигнал может регулировать экспрессию генов, участвующих в различных сигнальных путях, в то же время, разные ретроградные сигналы могут регулировать экспрессию генов одного и того же сигнального пути [12]. Связь между органеллами и ядром осуществляется с помощью сложных и очень точно синхронизированных антероградных (от ядра к органеллам) и ретроградных (от органелл к ядру) сигнальных путей. Наиболее изученной мишенью ретроградного сигналинга являются связанные с фотосинтезом ядерные гены. В то же время ретроградный сигналинг служит основным путем регуляции и координации многих процессов в живых организмах, включая процессы развития, реакции на биотические и абиотические стрессы, транспорт белков и ремоделирование структуры хроматина. Растения, в силу своего неподвижного образа жизни, в ходе эволюции развили сложную регуляторную сеть для координации клеточных активностей и изменения метаболизма в соответствии

с условиями окружающей среды, что повышает их шансы на выживание при неблагоприятных условиях [12].

ТИПЫ РЕТРОГРАДНЫХ СИГНАЛОВ

Обнаружены разные типы ретроградных сигналов, которые в последнее время подразделяют на две группы (в зависимости от стадии биогенеза хлоропластов). Первая группа – биогенные сигналы (biogenic signaling) – регулирует ранние стадии биогенеза хлоропластов и сборки фотосистем, когда проростки переходят от гетеротрофного роста к фотоавтотрофному. Примером биогенных сигналов может служить GUN1 белок. Вторая группа – операционные сигналы (operational signaling) – функционирует в зрелых растениях, в полностью развитых хлоропластах. Эти сигналы регулируют экспрессию ядерных генов, ответственных за индукцию ответных реакций на стресс (например, световой) [5, 6]. Метаболиты хлоропластов, такие как MEcPP, являются примером операционных сигналов. В отдельную группу иногда выделяют сигналы, которые “управляют” распадом пластид в процессе их старения и индуцируют гибель клеток (деградационные сигналы) [16].

Исходя из источников сигналов, первоначально предполагали наличие в хлоропластах четырех ретроградных путей: биосинтез тетрапирролов, экспрессия генов хлоропластов, редокс-состояние хлоропластов и образование АФК. В последнее время было обнаружено, что кроме “классических” пластидных сигналов, в регуляции экспрессии ядерных генов возможно участие метаболитов хлоропластов [14].

В обзоре не будет рассматриваться участие редокс-состояния электрон-транспортной цепи хлоропластов в ретроградной регуляции. Это один из классических участников ретроградного сигналинга и его роль подробно изложена в ряде статей и обзоров [2, 3, 6, 10].

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ ТЕТРАПИРРОЛОВ В РЕТРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Очень полезными в расшифровке феномена ретроградного сигналинга оказались *gun-* (genome uncoupled) мутанты, у которых нарушена связь между хлоропластами и ядром [3]. С помощью генетического скрининга *Arabidopsis thaliana* идентифицированы 6 *gun-* мутантов [10, 14, 17, 18]. Было обнаружено, что, несмотря на дефектную физиологию или подавленный биогенез, мутантные проростки в присутствии ингибиторов синтеза белка или каротиноидов продолжают экспрессировать связанные с фотосинтезом ядерные гены, кодирующие белки хлоропластов. Например, светособирающий хлорофилл *a/b* связывающий белок 1.2

(LHCB1.2) [4, 10, 13, 17–19]. Показано, что гены пяти из них (*GUN2–GUN6*) кодируют белки, связанные с биосинтезом тетрапирролов. Как известно, 4 класса тетрапирролов: хлорофилл, гем, сирогем и фитохромобилин синтезируются в хлоропластах. Синтез хлорофилла, гема и фитохромобилина протекает по общему пути до протопорфирина IX (ProtoIX). Последующее встраивание в тетрапиррольное кольцо ионов Mg^{2+} приводит к образованию хлорофилла (мутанты *gun2–gun5*), а ионов Fe^{2+} – к образованию гема (мутант *gun6*). *GUN1* к синтезу тетрапирролов отношения не имеет. У *gun1* мутация обнаружена в гене, кодирующем локализованный в хлоропластах белок, содержащий пентатрикопептидный повтор (PPR) [17]. Точная роль *GUN1* в биохимических и молекулярных процессах остается неизвестной. Как белок, содержащий PPR, он может участвовать в регуляции сплайсинга, стабильности или трансляции мРНК пластид [6]. Предполагают, что *GUN1* обладает нуклеотид-связывающей активностью. Возможно, что *GUN1* зависимый пластидный сигнал может регулировать экспрессию ядерных генов и функционировать до ядерного транскрипционного фактора ABI4, который регулируется PTM, транскрипционным фактором хлоропластов PHD-типа [8, 17, 19]. *GUN1*, PTM и ABI4 участвуют в одном и том же сигнальном пути, однако молекулярный механизм, с помощью которого *GUN1* связан с ретроградным сигналом хлоропластов, не ясен. [8, 14]. Считают, что *GUN1* может участвовать как в возникновении многочисленных пластидных сигналов, так и в их интеграции, включая сигналы, связанные с тетрапирролами, сахарами, экспрессией генов пластид, фотосинтетической ЭТЦ и редокс-состоянием пластид. Мутант *gun1* более чувствителен к абсцизовой кислоте, чем растения дикого типа, и предположительно участвует в АВА-сигнальном пути [18].

Участие ключевых ферментов биосинтеза тетрапирролов в *gun*-фенотипе привело к многочисленным исследованиям тетрапирролов, главным образом, Mg-протопорфирина IX (Mg-ProtoIX) как возможного ретроградного сигнала [4, 5]. Было показано, что изменения в экспрессии ядерных генов, индуцированные стрессом, коррелируют с накоплением промежуточного продукта биосинтеза хлорофилла – Mg-ProtoIX и его метилового эфира Mg-ProtoIX-ME [4]. Было обнаружено также, что у высших растений процесс связанного с MgProtoIX сигнального пути более сложный, чем у водорослей, причем многие связанные с тетрапирролами сигнальные компоненты специфичны для высших растений [18]. Первоначально считали, что Mg-ProtoIX связывается с белками теплового шока типа HSP90, а затем взаимодействует с транскрипционным фактором Long Hycosyl 5 (HY5), который регулирует экспрессию ядерных генов фо-

тосинтеза [6]. Однако эта роль Mg-ProtoIX была впоследствии подвергнута сомнению, поскольку не всегда наблюдалась корреляция между накоплением Mg-ProtoIX и изменениями в экспрессии ядерных генов [4, 5, 16, 17]. На этом основании было высказано предположение, что альтернативным медиатором ретроградного сигнального пути может быть гем [4, 9, 10, 13, 15]. Известно, что тетрапиррол гем регулирует экспрессию генов в клетках животных и дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Гем, добавленный к культурам *Chlamydomonas reinhardtii* в темноте, активирует экспрессию HSP70A, в то время как протопорфирин IX и протохлорофиллид такого действия не оказывают. Исследования профилей экспрессии генов в присутствии гема или MgProtoIX показали, что тетрапирролы индуцируют глобальные изменения в экспрессии генов. Экспрессия почти 1000 генов значительно изменяется в присутствии MgProtoIX, а также гема. Большинство этих генов кодируют ферменты цикла трикарбоновых кислот, гем-связывающие белки, стрессочувствительные белки, а также белки, участвующие в фолдинге и деградации белков, и только немногочисленные гены связаны с процессом фотосинтеза [3, 4]. У сосудистых растений роль гема как медиатора ретроградного сигнального пути подтверждена исследованиями мутанта *gun6*, который характеризуется сверхэкспрессией феррохелатазы (FC1, гемсинтаза) хлоропластов – фермента, катализирующего встраивание Fe^{2+} в ProtoIX с образованием гема. Генетические и биохимические исследования показали, что гем, а не синтез ProtoIX/Mg-ProtoIX, в первую очередь отвечает за регуляцию экспрессии ядерных генов фотосинтеза у *gun6* [8, 13]. Возможно, гем является более вероятным участником ретроградного сигнального пути, чем Mg-ProtoIX, так как гем экспортируется из хлоропластов, в то время как доказательство экспорта Mg-ProtoIX нативными хлоропластами сомнительно. Кроме того, Mg-ProtoIX чувствителен к свету и образует на свету токсичные АФК, в то время как гем фотодинамически неактивен [8]. Фенотип мутантов *gun2–gun5* может быть связан с повышенной концентрацией гема, а не с пониженным содержанием Mg-ProtoIX [4]. Механизмы транспорта и метаболизма гема *in vivo* остаются неизвестными [6]. Показано, что у водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*) гем функционирует как ретроградный сигнал. Наряду с гемом, ретроградными сигналами водорослей могут служить биллины – метаболиты, образующиеся при синтезе тетрапирролов, участвующие в позеленении клеток *Chlamydomonas* на свету [5]. Очевидно, что тетрапирролы участвуют в регуляции экспрессии ядерных генов, регулируют фотосинтетические активности и играют важную роль в адаптации растений к стрессам окружающей среды. Однако точная сигнальная роль Mg-ProtoIX и гема оста-

ется недоказанной. И гем, и Mg-ProtoIX индуцируют образование АФК, главным образом, супероксида и H_2O_2 . По-видимому, только использование новых методических подходов для более глубокого генетического и физиологического исследования MgProtoIX-связывающих (PAPP5, CDR, HSP90) и гем-связывающих (НО и TSPO) белков позволит выяснить сигнальную роль этих двух тетрапирролов [5, 18].

МЕТАБОЛИТЫ – ИСТОЧНИКИ РЕТРОГРАДНЫХ СИГНАЛОВ

Показано, что многие метаболические процессы могут служить потенциальными источниками ретроградных сигналов на разных стадиях развития растений или при ответных реакциях на различные стрессы. В отличие от ранее идентифицированных сигналов, генерируемых при искусственных условиях, новые сигнальные молекулы были идентифицированы при физиологических ответных реакциях на неблагоприятные условия роста, такие как засуха и интенсивный свет [5]. Источниками ретроградных сигналов могут быть такие метаболиты, как фосфоаденозин-5-фосфат (РАР), β -циклоцитраль (β -СС), метилэритрол-циклодифосфат (МЕсРР) и активные формы кислорода (АФК) [15].

РАР – фосфоаденозин-5-фосфат (3'-phosphoadenosine 5'-phosphate) – побочный продукт реакций ассимиляции серы, присутствующий в каждом организме. Предполагают, что РАР подавляет активности 5'-3'-экзонуклеаз, которые влияют на процессинг РНК, предположительно ответственный за изменение экспрессии генов. РАР необходим для активации стрессочувствительных генов, таких как APX2 и ELIP2. Показано, что РАР накапливается в хлоропластах при засухе или избыточном освещении и функционирует как мобильный сигнал, изменяющий метаболизм РНК путем ингибирования экзорибонуклеаз [3, 4, 17]. Хотя роль РАР в качестве сигнальной молекулы, которая опосредует ответные реакции растений на стресс, неоспорима, его роль в качестве типичного ретроградного сигнала еще однозначно не доказана [15].

Бета-циклоцитраль (β -cyclocitral; β -СС) – летучее, жирорастворимое соединение, один из продуктов окисления каротиноидов в хлоропластах. Воздействие низких концентраций β -СС на растения *Arabidopsis* изменяет экспрессию большого числа генов, причем более 80% генов чувствительны к 1O_2 . Эти данные позволяют предполагать, что β -СС участвует в сигналинге, связанном с 1O_2 [5]. Экзогенное применение β -СС препятствует образованию АФК в хлоропластах, повышает синтез салициловой кислоты и в конечном итоге

репрограммирует транскрипцию генов, участвующих в детоксификации АФК [15].

МЕсРР (methylerythritol cyclodiphosphate) – сигнальный метаболит пластид, функционирующий как промежуточный продукт биосинтеза изопреноидов и ретроградный сигнал, способный изменять экспрессию некоторых стрессочувствительных ядерных генов, например, гидропероксид-лиазы и изохоризмат-синтазы 1, что приводит к накоплению салициловой кислоты и в итоге повышает устойчивость к биотрофному патогену *Pseudomonas syringae*. Этот метаболит регулирует некоторые стрессозависимые процессы не только у растений, но и у эубактерий. Сигнальные механизмы, связывающие уровень МЕсРР с изменениями экспрессии генов, неизвестны. Предполагают, что МЕсРР может влиять на структуру хроматина, что, в свою очередь, ведет к изменениям экспрессии отдельных чувствительных к стрессу генов [15, 17].

АФК. У эукариот АФК принадлежит к побочным продуктам аэробного метаболизма. Наиболее часто встречающимися формами АФК являются H_2O_2 , супероксидные (анионные) радикалы (O_2^-), гидроксильные радикалы (OH^-) и синглетный кислород (1O_2) [2, 4, 12]. 1O_2 образуется в ФС II, а супероксидный анион (O_2^-), который в процессе метаболизма превращается в H_2O_2 , – в ФС I [3]. У растений АФК синтезируется в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и плазматической мембране. В фотосинтезирующих клетках листьев большая часть АФК обнаруживается в хлоропластах и пероксисомах и незначительная часть – в митохондриях. Основными продуцентами АФК в процессе фотосинтеза являются хлоропласты [17]. Показано, что большие количества АФК оказывают повреждающее действие, вызывая окисление липидов, белков и ферментов, необходимых для функционирования хлоропластов и клетки в целом, в то время как в небольших количествах АФК функционируют как сигнальные молекулы [3, 17]. Следует, однако, заметить, что в последние годы появились сообщения об АФК как об универсальных сигнальных метаболитах [20]. Хорошо известна важная роль АФК в ответных реакциях растений на различные стрессы, например, свет высокой интенсивности, высокая температура, засуха [15] или заражение патогенами [21]. Тепловой стресс может приводить к накоплению АФК в ФС I, ФС II, а также в цикле Кальвина, вызывая необратимое окислительное повреждение клеток. В зависимости от происхождения и силы сигнала, АФК, генерируемые фотоокислительным стрессом, инициируют две противоположные реакции: программируемую гибель клеток или реакцию акклиматизации [3]. Для защиты от избытка АФК растения в ходе эволюции выработали ряд антиоксидантных систем,

которые позволяют им не только “справляться” с образованием АФК во время стресса, но и использовать АФК в качестве сигнальных молекул. Эти системы содержат каротиноиды, токоферолы, глутатион и аскорбат. Глутатион – один из наиболее важных антиоксидантов растений. Он может действовать на АФК непосредственно или через систему аскорбат-глутатион. Синтез глутатиона начинается в хлоропластах [17]. Важную роль в защите растений от АФК играют также такие ферменты, как супероксид-дисмутаза, аскорбат-пероксидаза, каталаза, глутатион-пероксидазы и пероксиредоксин, которые могут метаболизировать радикалы O_2^- и удалять H_2O_2 . Хотя различные формы АФК вызывают сходные повреждения клеток, они активируют разные сигнальные пути [3]. Предполагают, что АФК диффундируют от мест образования и в условиях стресса активируют ряд сигнальных путей [4].

Большинство АФК-зависимых ретроградных сигнальных путей связано с 1O_2 [22, 4]. 1O_2 обладает очень высокой реакционной активностью и коротким временем жизни в условиях *in vivo* (200 нс) [17]. Благодаря короткому времени жизни и высокой вязкости тилакоидов хлоропластов, 1O_2 , по-видимому, функционирует вблизи места своего образования. Радиус диффузии 1O_2 составляет 5.5–30 нм [1]. Вероятно, более стабильные вторичные мессенджеры, образующиеся из 1O_2 в пластидах, активируют сигнальный путь, регулирующий экспрессию ядерных генов. Идентифицированы две непосредственные мишени 1O_2 – это β -каротин и белок ФСII–D1. Реакция 1O_2 с β -каротином приводит к образованию β -циклоцитрала, который изменяет экспрессию большого числа чувствительных к 1O_2 генов. Белок D1 защищает ФС II от 1O_2 , поскольку он находится вблизи сайта образования 1O_2 в реакционном центре ФС II. При этом сам белок разрушается. Данные о биологической активности фрагментов D1 у растений отсутствуют [17].

Исследования *flu* (fluorescent) мутантов *Arabidopsis* показали, что на свету они образуют значительные количества 1O_2 , который, в основном, активирует гены, участвующие в программируемой гибели клеток, и лишь менее 15% чувствительных к 1O_2 генов кодируют белки пластид. Сравнительный анализ транскриптомов этих мутантов и растений *Arabidopsis* дикого типа, обработанных паракватом или метилвиологеном, которые катализируют фотовосстановление O_2 с образованием O_2^- и H_2O_2 , показал, что 1O_2 активирует иной набор генов, чем тот, который индуцируется супероксидным анионом и/или H_2O_2 [3]. Повышенное образование 1O_2 в хлоропластах *flu* мутантов связано с индукцией ответных реакций

растений на стресс, вызывая значительные изменения в экспрессии ядерных генов и увеличение накопления стрессовых гормонов – салициловой кислоты (SA), этилена (Et), жасмоновой кислоты (JA), а также промежуточного продукта биосинтеза JA – 12-оксофитодиеновой кислоты (OPDA) [17]. Идентифицированы два белка – EXECUTER1 (EX1) и EXECUTER2 (EX2), локализованных в хлоропластах, которые участвуют в передаче индуцированных 1O_2 пластидных сигналов в ядро [8, 10, 13].

Более стабильной формой АФК является H_2O_2 , которая у высших растений образуется в различных компартментах клетки в ответ на стресс и разнообразные стимулы [4, 22]. H_2O_2 имеет больший период полураспада и обладает меньшей токсичностью, чем другие формы АФК и больше соответствует роли внутри- и межклеточного мессенджера. H_2O_2 может диффундировать на расстояние 1 мкм и обладает высокой реакционной активностью [1]. У древних прокариот (цианобактерий, *Synechocystis*) H_2O_2 и редокс-изменения компонентов синтетической ЭТЦ (пула пластохинонов) могут служить универсальными индукторами ответных реакций на стресс [23]. Согласно имеющимся данным, H_2O_2 способна пересекать внутреннюю и внешнюю оболочки хлоропластов и другие мембраны, что важно для ее функционирования в качестве сигнальной молекулы. Как окислитель H_2O_2 может изменять редокс-состояние клеточных соединений, таких как глутатион и аскорбат. Однако убедительных доказательств того, что H_2O_2 является сигнальной молекулой, до сих пор нет [4].

Предполагают, что H_2O_2 поступает в ядро через стромулы, образование которых индуцируют АФК хлоропластов. Стромулы представляют собой трубочки длиной до 65 мкм, наполненные стромой, оболочка которых образована двуслойной окружающей мембраной пластид. Обнаружены кластеры пластид с длинными стромулами (20–30 мкм), локализованными вокруг ядра. Анализ распределения стромул в клетках эпидермиса розеточных листьев *Arabidopsis thaliana* показал, что стромулы значительно чаще встречаются в 8 мкм зоне вокруг ядра, чем на периферии клеток. Движение и образование стромул коррелирует с движением ядра. Возможно, что ассоциация ядра со стромулами необходима для того, чтобы обеспечить контакт определенного числа пластид с постоянно движущимся ядром [24]. Предполагают, что взаимодействия стромул с ядром могут играть важную роль в ответных реакциях растений на биотический стресс [17].

ХЛОРОПЛАСТНЫЕ СИГНАЛЫ, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕТРОГРАДНОМ СИГНАЛИНГЕ

Ca²⁺-зависимый сигналинг

Предполагают, что наряду с АФК важную роль в ретроградном сигналинге играет Ca²⁺ — широко распространенный вторичный мессенджер клеток [25]. Кальциевые сигналы цитозоля возникают в апопласте. Сообщения о кальциевых сигналах хлоропластов впервые появились в 2002 г. [26]. Было обнаружено, что кальциевый сигналинг тесно связан с регуляцией фотосинтеза и врожденным иммунитетом растений. В хлоропластах Ca²⁺ связан с тилакоидными мембранами. Перемещение Ca²⁺ в строму приводит к увеличению его концентрации в строме, что индуцирует фотоингибирование. Основным рецептором и переносчиком Ca²⁺ у растений служит кальций-связывающий белок хлоропластов — CAS [27]. Этот сенсорный белок регулирует концентрации Ca²⁺ в пластидах и в цитозоле, а также накопление стрессового гормона — салициловой кислоты [26]. CAS играет центральную роль в восприятии и передаче кальциевых сигналов, связанных с иммунитетом растений. Связанный с тилакоидами CAS фосфорилируется на свету киназой STN8, которая фосфорилирует также белки ФС II [27]. Растения, лишённые CAS, не образуют SA в ответ на заражение патогенами [5]. CAS и Ca²⁺ (через циклический поток электронов) могут активировать ретроградный сигналинг, индуцированный ¹O₂ [26]. CAS регулирует также активность MAP-киназ МРК3/МРК6, влияющих на функционирование транскрипционного фактора ABI4, участвующего в ретроградном сигналинге. Это свидетельствует о наличии в пластидах механизма, с помощью которого кальциевый сигналинг хлоропластов контролирует MAP-киназный путь активации важнейших компонентов ретроградной сигнальной цепи [28].

У *Chlamydomonas* идентифицирован кальций-связывающий тип тиоредоксина, названный кальредоксином, который может быть соединительным звеном между редокс-состоянием пластида и Ca²⁺-зависимой регуляцией. Гомологи этого белка у высших растений не обнаружены [26]. Исследования молекулярных механизмов Ca²⁺-зависимого сигналинга показали, что динамические (в пространстве и во времени) изменения концентрации Ca²⁺, так называемые Ca²⁺-signatures, индуцируют каскады клеточных сигналов. Ca²⁺-signatures функционируют как прямые и/или непрямые межорганелльные коммуникационные сигналы. Клетки выработали механизмы, позволяющие накапливать Ca²⁺ в определенных клеточных компартментах, таких как апопласт, вакуоль, хлоропласт и митохондрии, в ответ на дей-

ствие озона, элиситоров защитных реакций, факторов, участвующих в образовании клубеньков, а также циркадных и дневных ритмов [15]. Предполагают, что Ca²⁺-signatures регулируют устьичную щель, а также время наступления различных клеточных процессов. Сравнение специфических характеристик Ca²⁺-signatures, возникающих в ответ на различные стимулы, показало, что они существенно различаются по числу фаз, их величине и продолжительности, что согласуется с представлением о том, что в Ca²⁺-signatures закодирована информация, специфичная для каждого типа стимулов. Ca²⁺ является интермедиатом между восприятием стимула и экспрессией генов при таких воздействиях, как окислительный и низкотемпературный стресс, а также засуха [25]. Накапливаются данные о том, что Ca²⁺ и H₂O₂ выступают в роли вторичных мессенджеров, которые активируют экспрессию температурочувствительных генов, содержащих в своих промоторах HSEs (регуляторные элементы теплового шока), такие как HSF и HSP, а также аскорбат-пероксидазы цитозоля [4]. Информация, “закодированная” в Ca²⁺-signatures, улавливается Ca²⁺-связывающими белками, такими как кальмодулин, кальмодулин-подобные белки, Ca²⁺ и кальмодулин-зависимые протеинкиназы. Кальмодулины являются, по-видимому, компонентами определенных стадий ответных реакций растений на тепловой стресс. У *Arabidopsis* предполагают наличие более 40 кальциевых каналов с кальмодулин-связывающим доменом. Комплекс Ca²⁺-кальмодулин активирует не только многочисленные киназы, но и регулирует активность транскрипционных факторов, связанных с тепловым стрессом. По-видимому, кальмодулин может быть интегратором разных, связанных со стрессом сигнальных путей, позволяя растениям сохранять гомеостаз при различных физиологических процессах. Несмотря на то, что ответная реакция растений на тепловой стресс инициируется разными факторами, Ca²⁺ является ключевым “игроком” в передаче сигналов теплового стресса, индуцирующих ответные реакции клеток [4]. Остается пока неясным, как “декодируется” информация, содержащаяся в Ca²⁺-signatures, и что представляют собой “дешифровщики”. Эти знания, в конечном итоге, позволят регулировать ответные реакции растений на стресс и получать устойчивые к стрессу культуры [4]. Накапливаются данные о взаимосвязи между АФК и Ca²⁺. Например, транспортеры ионов в пластидах активируются АФК, а Ca²⁺-signatures, в свою очередь, могут индуцировать образование АФК в плазматической мембране и, вероятно, других клеточных компартментах. Функционирующие в цитоплазме сигналы АФК, как и CAS, активируют MAP-киназы МРК3/МРК6 [26, 28]. Таким образом, сигналы АФК и Ca²⁺ являют-

ся основными индукторами внутри- и межклеточных сигнальных каскадов, которые действуют последовательно или конкурентно, индуцируя общие ответные реакции клеток на действие факторов окружающей среды [15].

Оксид азота

Оксид азота (NO) – небольшая газообразная молекула, которая играет важную роль в передаче сигналов у растений и животных и считается возможной ретроградной сигнальной молекулой [12, 17]. NO важен в физиологических процессах у растений, таких как покой семян, прорастание, переход к цветению и ответные реакции на стресс. Уровень NO быстро изменяется в ответ на биотические и абиотические стрессы: заражение патогенами, засуха, низкие температуры или засоление. У растений NO синтезируется в хлоропластах, и синтез NO тесно связан с метаболизмом липидов, особенно с олеиновой кислотой [17]. Показано, что восстановление олеиновой кислоты повышает уровни NO, что влияет на течение заболеваний. NO и олеиновая кислота индуцируют экспрессию сходных ядерных генов. Это позволяет предполагать, что олеиновая кислота является регулятором синтеза NO и, следовательно, опосредованного NO-сигналинга. Реакция между NO и ненасыщенными ЖК ведет к образованию модифицированных ЖК. Недавние исследования показали, что сигнальная роль модифицированных ЖК состоит в участии NO_2 -линоленовой кислоты в ответных реакциях растений на абиотический стресс, главным образом, путем индукции белков теплового шока [15].

Жирные кислоты

Жирные кислоты (ЖК) функционально и структурно являются консервативными макромолекулами, которые влияют на состав и проницаемость мембран, активность ферментов и биохимические процессы. В растениях ЖК образуются преимущественно в пластидах [12]. Ненасыщенные ЖК – сигнальные молекулы, модулирующие различные ответные реакции на биотические и абиотические стрессы. Экзогенное применение и эндогенное изменение содержания ненасыщенных ЖК может значительно изменять профиль экспрессии генов и метаболизм, что влияет на акклиматизацию к абиотическому стрессу (температурному, солевому, вызванному засухой или тяжелыми металлами) и взаимодействия растение-патоген и растение-насекомые-вредители. Ненасыщенные ЖК играют также важную роль в ответных реакциях растения на биотический стресс. Например, арахионовая и эйкозапентаеновая кислоты, которые не образуются в сосудистых растениях, но в больших количествах содержатся в оомицетах,

таких как фитопатогенные виды *Phytophthora*, выделяются патогенами в растительную ткань на ранних стадиях инфекции, способствуя тем самым индукции защитных реакций. Активация чувствительного к стрессу *cis*-элемента, известного как быстрый чувствительный к стрессу элемент (RSRE), в ответ на экзогенное применение ряда ЖК, свидетельствует о том, что некоторые ненасыщенные ЖК могут функционировать в качестве ретроградного сигнала [12, 15]. Хорошо известна сигнальная роль ЖК-синтазного комплекса пластид, который катализирует синтез ЖК *de novo* в ответ на факторы, связанные с развитием и окружающей средой. Еноил-редуктаза, активная субъединица ЖК-синтазного комплекса пластид, участвует в регуляции развития и программируемой гибели клеток. Идентифицированы некоторые гены, участвующие в биосинтезе липидов, при мутациях которых восстанавливается не только уровень олеиновой кислоты, но и экспрессия генов устойчивости, что является дополнительным доказательством ретроградно-сигнальной функции ЖК [15].

Другой класс модифицированных ЖК, обладающих эволюционно консервативной сигнальной функцией, – это оксипирины, которые являются окисленными ЖК, образующимися, главным образом, при окислении линолевой и линоленовой кислот у растений и арахионовой кислоты у животных. И растения, и животные используют оксипирины как сигналы в ответ на биотические и абиотические стрессы. С помощью скоординированных ответных реакций они сходным образом реагируют на изменения окружающей среды. Наиболее изученными оксипиринами растений являются жасмонаты и альдегиды, которые образуются в конкурентных гидропероксид-лиазных и алленид-синтазных метаболических путях, соответственно. Эти соединения участвуют в меж- и внутриклеточной коммуникации и выполняют ключевую роль в индукции защитных реакций растений. AOS (Allene oxide synthase) путь ответствен за образование стрессоиндуцибельной 12-OPDA и жасмонатов, а именно жасмоновой кислоты и метилжасмоната, которые образуются в пероксисомах. Такая организация метаболизма оксипиринов требует тонко регулируемой координации и кооперации между пластидами и пероксисомами, а также сбалансированного экспорта части 12-OPDA из пластид в пероксисомы для синтеза жасмоновой кислоты путем одного или нескольких механизмов, которые пока не изучены [15]. Перекисное окисление липидов под действием АФК (преимущественно $^1\text{O}_2$) приводит к расщеплению жирных кислот и образованию таких продуктов, как азелаиновая кислота. Этот метаболит, который также считают мобильным сигналом, важен для формирования приобретенной системной устойчивости [15].

ГОРМОНЫ И РЕАКЦИОННО АКТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЫ КАК СИГНАЛЫ ХЛОРОПЛАСТОВ

Физиологические процессы, в которых принимают участие биогенные и операционные ретроградные сигналы, связаны также с гормональным сигналингом. Имеются многочисленные данные о взаимодействиях между специфическими операционными сигналами и гормонами [6]. Растения выработали в процессе эволюции механизмы борьбы с экстремальными условиями окружающей среды и их изменениями. К ним относятся засуха и затопление, которые снижают доступность кислорода, а также экстремальные температуры. Кроме того, фотосинтетический аппарат чувствителен к избыточному освещению, который приводит к окислительному стрессу клеток. Кроме этих абиотических стрессов, патогены, вызывающие заболевания, являются постоянной угрозой для растений. Образующиеся в хлоропластах гормоны салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислоты, а также другие вторичные мессенджеры, такие как АФК и активные формы азота (RNS), являются важными компонентами ответных реакций растений на стресс [17].

Салициловая кислота

Салициловая кислота хорошо известна в связи с её ролью во взаимоотношениях растение–патоген и особенно в защите растений. Однако салициловая кислота (SA) участвует также в процессах развития, включая прорастание, рост и развитие корней и побегов, а также в ответных реакциях растений на абиотический стресс. SA – фенольное соединение, образование которого в хлоропластах связано, в основном, с изохоризматным путем синтеза. Конъюгаты SA с глюкозой или метильной боковой группой являются обычно активными формами SA. Метилсалицилат служит важным медиатором приобретенной системной устойчивости. SA повышает устойчивость к патогенам. Кальций-связывающий белок (CAS) регулирует биосинтез SA в хлоропластах. Как было отмечено выше, растения, лишенные CAS, не образуют SA в ответ на заражение патогеном. Многие опосредованные SA-защитные реакции связаны с ее взаимодействием с активатором транскрипции Non-expressor of PR1 (NPR1), но NPR1 не единственный белок, который связывает SA. Установлено, что SA имеет многочисленные мишени в клетке, в числе которых белки хлоропластов [17].

Жасмонаты

Термин “жасмонаты” относится к группе соединений, образующихся из линолевой кислоты. Жасмоновая кислота (JA) – гормон, который является производным липидов и участвует в росте

и развитии растений. Синтез JA начинается в хлоропластах и завершается в пероксисомах. Затем JA превращается в различные метаболиты, обладающие разными функциями. Наиболее активным метаболитом является конъюгат JA с изолейцином. Биосинтез JA и сигнальные пути с участием этого гормона известны [17]. Показано, что механизм сигналинга с участием JA очень сходен с механизмом сигналинга с участием другого гормона – этилена (Et). SA и JA/Et часто выступают антагонистами, что указывает на взаимосвязь сигнальных путей хлоропластов. Промежуточный продукт биосинтеза JA – OPDA поступает в пероксисомы, где углеводородная цепь кислоты укорачивается в реакции β -окисления. Каким образом OPDA поступает в пероксисомы не известно, но процесс должен строго регулироваться, если сама OPDA функционирует как сигнальная молекула. OPDA участвует в прорастании семян у *Arabidopsis*, в развитии зародышей у томатов и в процессах фертильности у *Physcomitrella patens*, а также в защитных реакциях растений. Таким образом, сигналы хлоропластов, являющиеся производными липидов, – эволюционно древнее “приобретение” растений. Использование JA как сигнальной молекулы могло произойти в эволюции позднее [17].

Абсцизовая кислота

Абсцизовая кислота (ABA) – один из наиболее важных гормонов, участвующих в ответных реакциях растений на биотический и абиотический стрессы. Кроме того, ABA участвует в других физиологических процессах и состояниях растений, таких как движение устьиц и покой семян. ABA – сесквитерпеноид, который образуется в МЕСРР сигнальном пути в пластидах, синтезирующих каротиноиды. Все стадии *de novo* биосинтеза ABA протекают в пластидах, за исключением двух последних, которые протекают в цитозоле. Синтезированный гормон через ксилему и флоэму поступает к местам функционирования и таким образом становится доступным корням и побегам. Одним из рецепторов ABA служат Н-субъединицы Mg-хелатазы. Ретроградный сигналинг с участием ABA играет особенно важную роль при стрессах, связанных с засухой, засолением и низкими температурами. При заражении патогенами этот сигналинг является антагонистом сигналинга с участием JA/Et и может быть также антагонистом SA-сигналинга [17].

УЧАСТИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В РЕТРОГРАДНОМ СИГНАЛИНГЕ

Несмотря на большие успехи, достигнутые в последние годы при изучении ретроградного сигналинга клеточных органелл растений (особенно

пластид), многие вопросы, связанные с ретроградной коммуникацией, еще остаются неясными. Один из наиболее важных вопросов – как ретроградные сигналы поступают в ядро. Предполагают, что основными переносчиками ретроградных сигналов являются транскрипционные факторы (ТФ), такие как “классические” ядерные ТФ (первая группа – ABI4, PTM, HY5, GLK1/2), а также ТФ, которые могут перемещаться из органелл в ядро (вторая группа – Whirly1 и WRKY) или освобождаться из ER при протеолитической активации (третья группа – ANACO17) [14]. Доказано участие в ретроградном сигналинге пластид таких ТФ, как ABI4, PTM, HY5, GLK и AP2/EREBP. Однако механизм участия ТФ в переносе информации из пластид или митохондрий в ядро остается неизвестным.

ABI4 – ядерный ТФ ABI4 (ABA-INSENSITIVE 4) – относится к большому семейству типичных для растений ТФ, известному как AP2/EREBP. Транскрипционные факторы AP2/EREBP участвуют в различных сигнальных путях, связанных с метаболизмом, гормонами и акклиматизацией к стрессу, а также в ретроградном сигналинге. Предполагают, что ABI4 является центром конвергенции многочисленных ретроградных сигнальных путей пластид в ответ на сигналы хлоропластов, генерируемые GUN1 [4]. GUN1 передает сигнал, индуцирующий связывание ABI4 с промоторными последовательностями *Lhcb* и других генов фотосинтеза, в ядро, что блокирует экспрессию этих генов, вероятно, препятствуя доступу ТФ, таких как HY5, к G-box или к G-box-связывающим факторам [8, 17]. ABI4 является, таким образом, негативным регулятором экспрессии гена *Lhcb*. Нельзя исключить, однако, что GUN1-зависимые сигналы пластид могут регулировать экспрессию ядерных генов фотосинтеза с помощью иных механизмов [8, 29, 30].

В промоторах ядерных генов, которые регулируются пластидными сигналами, обнаружены *cis*-элементы. У высших растений *cis*-элементом, чувствительным к свету и ретроградным сигналам, является G-box (CACGTG) или близкородственный CUF1 (CACGTA) и GATA элемент [13]. Промоторы генов, регулируемых GUN1, содержат также ABI4-связывающий мотив, который перекрывается с G-box или локализован вблизи него [8].

Известно, что GUN1 кодирует локализованный в пластидах белок, содержащий домены пентаатрикопептидных повторов (PPR). За счет этих доменов происходит специфическое связывание GUN1 с последовательностями нуклеиновых кислот, преимущественно с РНК. Некоторые PPR-содержащие белки участвуют в пост-транскрипционных процессах, таких как сплайсинг

РНК, редактирование, процессинг и трансляция в пластидах и митохондриях.

ABI4, подобно другим ТФ семейства AP2/EREBP, является репрессором транскрипции в присутствии ABA, Et и JA [13]. ABI4 служит также регулятором ретроградного сигналинга митохондрий и является, по-видимому, центром интеграции ретроградных сигналов органелл и сигналов, связанных с содержанием сахаров и редокс-состоянием хлоропластов [8]. У *Arabidopsis* ген *ABI4* интенсивно экспрессируется в семенах (в противоположность проросткам) и индуцируется глюкозой и, вероятно, другими сахарами [4]. Путем генетического скрининга мутантов *Arabidopsis* установлено, что ABI4 регулирует экспрессию генов альтернативной оксидазы1а (AOX1a) – фермента, который часто используется как маркерный ген при исследовании митохондриальной ретроградной регуляции [14].

PTM (транскрипционный фактор PHD-типа) осуществляет в ретроградном сигналинге физическую связь между хлоропластами и ядром [17]. Он соединяет GUN1-путь в пластидах с ABI4-путем в ядре (GUN1-PTM-ABI4) [18, 31]. Этот ТФ имеет четыре трансмембранных домена на С-конце и локализован на внешней оболочке хлоропластов. N-концевая область PTM содержит ДНК-связывающий гомеодомен, домен различных транскрипционных факторов (DDT) и растительный гомеодомен (PHD). Растворимая укороченная форма PTM (~58 kDa), не имеющая трансмембранных доменов, образуется в результате протеолиза ТФ сериновой протеазой [32]. Эта форма PTM освобождается из оболочки хлоропласта в цитоплазму, перемещается в ядро, где с помощью PHD домена активирует экспрессию *ABI4*. Последний, как было описано выше, связывается с промотором *Lhcb*, локализованным вблизи CUF1-элемента, и препятствует таким образом связыванию G-box факторов, необходимых для экспрессии *Lhcb* и других ядерных генов фотосинтеза [4, 17].

HY5 (длинный гипокотиль 5) – транскрипционный фактор bZIP-типа, который функционирует в ретроградном сигналинге после нескольких фоторецепторов, включая CRY1, и индуцирует экспрессию связанных с фотосинтезом генов. HY5 и CRY1 функционируют в одном и том же сигнальном пути. Показано, что CRY1 участвует в регуляции экспрессии ядерных генов, контролируемых 1O_2 , и в программируемой гибели клеток [8, 13]. Фоторецептор CRY1 выступает также как негативный регулятор, подавляющий экспрессию гена *Lhcb* при нарушениях биогенеза пластид. Помимо ретроградного сигналинга, светозависимый синтез хлорофилла и белка на ранних стадиях развития хлоропластов может индуцироваться с помощью фоторецептор-зависимого сигналинга.

Оба типа сигнальных путей могут взаимодействовать друг с другом, усиливать или ослаблять взаимный эффект. Так, фотоактивируемые формы фитохрома и криптохромов индуцируют удаление из ядра таких репрессоров, как Constitutive photomorphogenic 1 (COP1) и Phytochrome-interacting factors (PIFs), которые обеспечивают морфогенетическое развитие растений в темноте. Эти репрессоры фотоморфогенеза предотвращают накопление позитивных транскрипционных факторов светоиндуцируемых генов, вызывая их протеолитическую деградацию. После удаления репрессоров из ядра происходит накопление транскрипционных факторов, таких как HY5, LAF1, HFR1 и GLKs, и активация экспрессии ядерных генов фотосинтеза. С другой стороны, транскрипция ядерных генов фотосинтеза ингибируется, если биогенез хлоропластов подавлен или функция хлоропластов серьезно нарушена, и соответствующие хлоропластные сигналы отсутствуют. Ретроградный сигналинг чувствителен к флуктуациям света. Большинство ретроградных сигналов хлоропластов зависит от наличия или недостатка световой энергии. Зрелые хлоропласты являются основными сенсорами изменений световых условий окружающей среды. Взаимосвязь световых и пластидных сигналов не является удивительной, поскольку пластидные и световые сигналы могут регулировать экспрессию ядерных генов фотосинтеза, используя одни и те же или близкие элементы промоторов. Такая взаимосвязь двух типов сигналов (световых и пластидных) важна не только для биогенеза хлоропластов, но и для поддержания их структуры и функций в условиях стресса.

GLK1/2. Ядерный транскрипционный фактор GLK суперсемейства GARP обнаружен у разных видов сосудистых растений, причем каждый вид содержит, по крайней мере, 2 гена *GLK* (golden 2-like 1 и 2). Белки GLK, являющиеся членами суперсемейства GARP, необходимы для нормального развития хлоропластов. Эти белки активируют экспрессию генов, участвующих в биосинтезе хлорофилла, кодирующих компоненты светособирающих комплексов и электрон-транспортной цепи, при этом существенно стимулируя развитие хлоропластов. Гиперэкспрессия GLK индуцирует развитие хлоропластов в каллусе риса и клетках корней *Arabidopsis* [33]. Уровень GLK регулирует убиквитин-протеасомная система. «Мишенями» этой системы являются предшественники белков хлоропластов в цитозоле, компоненты аппарата транслокации белков на поверхности хлоропластов и ТФ в ядре [33]. Доказано, что экспрессия генов GLK регулируется ретроградными сигналами хлоропластов, причем, по крайней мере, один из сигнальных путей не зависит от сигнального пути с участием GUN1. Помимо регуляции на уровне транскрипции, пластидные сигналы регу-

лируют также уровень белка GLK1 с помощью убиквитин-протеасомной системы [34]. GLK1 – ключевой регулятор светоиндуцируемой транскрипционной сети, которая играет основную роль в фотоморфогенезе [35]. Предполагают, что GLK1 является позитивным регулятором ретроградного сигнального пути, который координирует импорт белков в пластиды и экспрессию ядерных генов в ответ на функциональное состояние пластид. Убиквитин-протеасомная система регулирует также уровень GLK в плодах томатов *Solanum lycopersicum*. Развитие хлоропластов в плодах томатов регулирует SIGLK2. Показано, что SIGLK2 разрушается убиквитин-E3 лигазным комплексом, который содержит CULLIN4 (CUL4) и UV-damaged DNA-binding protein 1 (DDB1) [36]. Мутация в DDB1 приводит к существенному увеличению содержания пигментов и соотношения хлоропластов к хромопластам [37], по всей видимости, за счет чрезмерного накопления SIGLK2. Хотя точная роль SIGLK2 в ретроградном сигналинге остается невыясненной, имеющиеся данные подтверждают представление о том, что убиквитин-протеасомная система необходима для регуляции GLK [33].

WHIRLY1 – белок, который входит в состав маленького семейства белков WHIRLY, связывающихся с одонитевой ДНК. WHIRLY1 локализован в пластидах и ядре. У однодольных растений семейство WHIRLY содержит 2 белка, у двудольных – 3 [38]. Белки семейства WHIRLY полифункциональны. Их функции зависят от внутриклеточной локализации и/или стадии развития растений [39]. WHIRLY1 впервые был описан как ядерный ТФ, который участвует в экспрессии генов, связанных с патогенезом, зависящих от SA. Этот ТФ был обнаружен также в хлоропластах [40]. Исследования WHIRLY1 показали, что у *Arabidopsis* этот ТФ придает стабильность пластидному геному, у ячменя WHIRLY1 участвует в компактизации нуклеоидов и регуляции числа копий пластидной ДНК. В хлоропластах кукурузы WHIRLY1 связывается с ДНК и РНК и участвует в сплайсинге интронов.

В хлоропластах *Arabidopsis* и ячменя WHIRLY1 является частью транскрипционно активной хромосомы (ТАС). Кроме того, WHIRLY1 – один из преобладающих белков нуклеоидов хлоропластов [41]. WHIRLY1 играет также важную роль в фотосинтезе и влияет на экспрессию генов ФС I и светособирающих комплексов (LHCI). Показано, что WHIRLY1 участвует в интеграции светового и пластидного сигналинга, хотя детальная роль WHIRLY1 в этих сигнальных путях остается неизвестной [38]. ТФ WHIRLY1 не влияет на старение листьев, зависящее от их возраста и интенсивности освещения, но, вероятно, участвует в преждевременной индукции процессов старения листьев в ответ на фотоокислительный стресс [40].

Распределение WHIRLY1 между ядром и пластидами регулирует протеинкиназа СРК14, которая играет ключевую роль в индукции образования WHIRLY1 в этих органеллах. Световые условия, сахара, цитокинин или сигнал кальций-кальмодулин, которые индуцируют синтез WHIRLY1, могут также влиять на внутриклеточную локализацию и основные функции этого белка [40].

Существуют различные гипотезы, объясняющие механизмы транспорта WHIRLY1. Согласно одной из них, в транслокации WHIRLY1 в ядро участвуют стромулы и ядерные АФК [26]. В пластидах WHIRLY1 принимает участие, в первую очередь, в метаболизме РНК. В ядре он регулирует транскрипцию стрессочувствительных генов [3, 13]. В пластидах WHIRLY1 подвергается процессингу путем отщепления N-концевого пептида, превращаясь при этом в укороченный зрелый белок. Укороченная форма WHIRLY1 освобождается из хлоропластов, накапливается в ядре и функционирует как теломер-связывающий белок, а также как активатор или репрессор транскрипции ряда генов, которые участвуют, в том числе, в ответных реакциях на свет высокой интенсивности и заражение патогенами. Этот белок находится в свободном состоянии в цитозоле, если пластиды повреждены стрессом или старением, являясь средством транспорта стрессового сигнала непосредственно в ядро [1, 39].

Несмотря на то, что нет убедительных доказательств участия WHIRLY1 в ретроградном сигналинге, локализация WHIRLY1 в двух клеточных компартментах (пластидах и ядре), а также тот факт, что обе субпопуляции белка имеют одинаковую молекулярную массу, делает этот ТФ очень вероятным кандидатом на роль передатчика сигналов от хлоропластов в ядро при нормальном развитии листьев и различных видах стресса [3, 38].

ТФ WRKY. В ретроградном сигналинге участвуют мембраносвязанные ТФ клеточных органелл растений: большое семейство WRKY, а также белки ANACO17 и ANACO13, содержащие NAC домен. Исследование 1196 генов, предположительно кодирующих митохондриальные белки, показало, что большинство из них содержат W-box, который узнается ТФ WRKY-типа и который важен для активации промоторов стрессочувствительных генов. Геном *Arabidopsis* кодирует более 70 различных ТФ WRKY, которые, по-видимому, играют разную роль в ответных реакциях на стресс. ТФ WRKY40 и WRKY63 координируют экспрессию ядерных генов, чувствительных к нарушениям функций хлоропластов и стромул [14, 26]. Высказывается предположение о том, что нарушения функций органелл могут индуцировать протеолитическое высвобождение мембраносвязанных ТФ, локализованных в ER (ANACO17 и ANACO13) или в хлоропластах (PTM), и поступ-

ление их в цитоплазму, что обеспечивает этим ТФ возможность служить сигнальными интермедиатами между органеллами и ядром или непосредственно действовать на ядерные гены [14, 31].

WRKY40, WRKY18 и WRKY60 регулируют экспрессию ABI4 в АВА сигналинге. Эти ТФ участвуют также в повышении устойчивости к биотическим стрессам и в регуляции взаимодействия между SA и JA сигнальными путями. Активность WRKY, также как других ТФ, часто регулируется путем пост-трансляционных модификаций, например, путем фосфорилирования. Идентифицированы ТФ WRKY, которые являются прямыми мишенями MA киназ [26].

ТФ ANACO17, содержащий NAC домен, связан с ER и F-актином за счет C-концевого трансмембранного домена. Предполагают, что этот ТФ активируется путем протеолитического отщепления C-концевого трансмембранного участка ромбовидной протеазой, при этом N-концевой домен ANACO17 освобождается из ER, что позволяет ему мигрировать в ядро. Хорошо изучены гены-мишени ANACO17. У *Arabidopsis* их, по крайней мере, 200. К ним относятся гены, которые кодируют митохондриальные белки, такие как AOX1a, альтернативные NADH-дегидрогеназы, OPA3, а также ряд индуцируемых окислительным стрессом генов с мало изученными функциями. Недавние исследования показали, что у эукариот циклин-зависимая киназа E1 (CDKE1), которая локализована в ядре, передает информацию от ДНК-связанных ТФ на РНК-полимеразу II и таким образом осуществляет регуляцию экспрессию мРНК LHCB2.4 и AOX1a в ответ на ретроградные сигналы хлоропластов и митохондрий [14].

Предполагают, что одна из функций ANACO17 состоит в подавлении программируемой гибели клеток (PCD), наиболее вероятным механизмом которой является предотвращение образования избыточного количества АФК. Установлено, что ANACO17 участвует в регуляции ретроградного сигналинга митохондрий, а также некоторых видов ретроградного сигналинга хлоропластов [6, 7]. Считают, что ТФ ANACO17 выступает в роли двустороннего передатчика сигналов между органеллами и ядром. ANACO13 – другой ТФ, содержащий NAC домен, который является регулятором ретроградного сигналинга митохондрий. Этот ТФ локализован в мембране ER и является частью стрессочувствительного регулона митохондрий. Активация ANACO13 сигналами митохондрий происходит, по-видимому, путем того же протеолитического механизма, который описан для ANACO17 [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Являясь неотъемлемой частью внутриклеточного сигналинга, ретроградный сигналинг представляет собой сложный и многоуровневый процесс, центральная роль в котором принадлежит хлоропластам [14]. Известно, что в хлоропластах локализованы компоненты фотосинтетического аппарата высших растений, однако в этих органеллах происходит не только фотосинтез, но и синтез многих важных для клетки соединений, таких как жирные кислоты, аминокислоты, фитогормоны, витамины, нуклеотиды и вторичные метаболиты [5, 14]. Пластиды также служат источником ретроградных сигналов, поступающих из хлоропластов в ядро и регулирующих основные процессы жизнедеятельности растений [17]. Многолетние исследования показали, что ретроградные сигналы осуществляют регуляцию и координацию процессов развития, процессов направленного транспорта белков и ремоделирования структуры хроматина, а также ответных реакций на биотические и абиотические стрессы [12, 15].

Ретроградные сигналы хлоропластов важны для нормального роста и развития растений. Они регулируют прорастание [15], цветение, [42], морфогенез и движение органелл. Повреждения компонентов ретроградных путей, участвующих в биогенезе пластид и морфогенезе листьев, приводят к значительным фенотипическим изменениям: обесцвечиванию семян, пестролистности, сморщенным листьям и измененной форме розеток.

Ретроградные сигналы хлоропластов регулируют также ответные реакции растений на стрессы, вызванные патогенами и абиотическими факторами среды [6]. Изменяя экспрессию тысяч генов на уровне транскрипции и пост-транскрипционных процессов, ретроградные сигналы позволяют приспособить метаболизм в пластидах и других частях клетки к изменениям окружающей среды, улавливаемым пластидами/хлоропластами [9].

В отличие от ретроградного сигналинга пластид, ретроградный сигналинг митохондрий растений, исследования которого начались только около 10 лет назад, изучен гораздо меньше. По всей видимости, некоторые компоненты ретроградного сигналинга являются общими для пластид и митохондрий. Так, например, компонент ретроградного сигналинга хлоропластов ТФ АВ14 является также регулятором митохондриальной ретроградной системы. Фосфатаза SAL1, расщепляющая PAP до АМФ, обнаружена как в хлоропластах, так и в митохондриях. В то же время, ретроградный сигнальный путь SAL1-PAP в митохондриях не обнаружен [6].

Накапливаются данные о взаимодействии сигнальных путей хлоропластов и митохондрий при нормальных условиях роста, а также при адаптации к стрессам окружающей среды [4, 16]. Даль-

нейшие исследования ретроградного сигналинга с использованием новейших достижений протеомики, метаболомики и высокоэффективного секвенирования нового поколения позволят в конечном итоге получить детальное представление о том, каким образом изменения среды регулируют состояние внутриклеточных компарментов клетки и какую роль в этом играют ретроградные сигналы.

Работа подготовлена при частичной поддержке программы Президиума Российской академии наук № 18 “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”, Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 16-04-01626 и 19-04-00798) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Szeczyńska-Hebda M., Karpiński S.* Light intensity-dependent retrograde signalling in higher plants // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 1501–1516.
2. *Leister D., Wang L., Kleine T.* Organellar gene expression and acclimation of plants to environmental stress // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 387.
3. *Barajas-López J.de D., Blanco N.E., Strand Å.* Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell // *Biochim Biophys Acta.* 2013. V. 1833. P. 425–437.
4. *Sun A.Z., Guo F.Q.* Chloroplast retrograde regulation of heat stress responses in plants // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 398.
5. *Chi W., Feng P., Ma J., Zhang L.* Metabolites and chloroplast retrograde signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 25. P. 32–38.
6. *Chan K.X., Phua S.Y., Crisp P., McQuinn R., Pogson B.J.* Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2016. V. 67. P. 25–53.
7. *Van Aken O., Pogson B.J.* Convergence of mitochondrial and chloroplastic ANAC017/PAP-dependent retrograde signalling pathways and suppression of programmed cell death // *Cell Death Differ.* 2017. V. 24. P. 955–960.
8. *Chi W., Sun X., Zhang L.* Intracellular signaling from plastid to nucleus // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 559–582.
9. *Börner T.* The discovery of plastid-to-nucleus retrograde signaling—a personal perspective // *Protoplasma.* 2017. V. 254. P. 1845–1855.
10. *Page M.T., McCormac A.C., Smith A.G., Terry M.J.* Singlet oxygen initiates a plastid signal controlling photosynthetic gene expression // *New Phytol.* 2017. V. 213. P. 1168–1180.
11. *Юрина Н.П., Одинцова М.С.* Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов // *Физиология растений.* 2007. Т. 54. С. 485–498.
12. *Xiao Y., Wang J., Dehesh K.* Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants // *Plant Sci.* 2013. V. 212. P. 102–107.

13. Singh R., Singh S., Parihar P., Singh V.P., Prasad S.M. Retrograde signaling between plastid and nucleus: A review // *J Plant Physiol.* 2015. V. 181. P. 55–66.
14. Kleine T., Leister D. Retrograde signaling: organelles go networking // *Biochim Biophys Acta.* 2016. V. 1857. P. 1313–1325.
15. de Souza A., Wang J.Z., Dehesh K. Retrograde signals: integrators of interorganellar communication and orchestrators of plant development // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. V. 68. P. 85–108.
16. Dietzel L., Gläßer C., Liebers M., Hiekel S., Courtois F., Czarniecki O., Schlicke H., Zubo Y., Börner T., Mayer K., Grimm B., Pfannschmidt T. Identification of early nuclear target genes of plastidial redox signals that trigger the long-term response of *Arabidopsis* to light quality shifts // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1237–1252.
17. Bobik K., Burch-Smith T.M. Chloroplast signaling within, between and beyond cells // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 781.
18. Zhang Z.W., Zhang G.C., Zhu F., Zhang D.W., Yuan S. The roles of tetrapyrroles in plastid retrograde signaling and tolerance to environmental stresses // *Planta.* 2015. V. 242. P. 1263–1276.
19. Karpinska B., Alomrani S.O., Foyer C.H. Inhibitor-induced oxidation of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*: implications for organelle to nucleus retrograde signaling // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2017. V. 372. doi 10.1098/rstb.2016.0392
20. Foyer C.H., Ruban A.V., Noctor G. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage // *Biochem. J.* 2017. V. 474. P. 877–883.
21. Rossi F.R., Krapp A.R., Bisaro F., Maiale S.J., Pieckenstein F.L., Carrillo N. Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* // *Plant J.* 2017. V. 92. P. 761–773.
22. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл. В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. С. 163–178.
23. Sinetova M.A., Los D.A. Systemic analysis of stress transcriptomics of *Synechocystis* reveals common stress genes and their universal triggers // *Mol. BioSyst.* 2016. V. 12. P. 3254–3258.
24. Erickson J.L., Kantek M., Schattat M.H. Plastid-nucleus distance alters the behavior of stromules // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1135.
25. Whalley H.J., Knight M.R. Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses // *New Phytol.* 2013. V. 197. P. 690–693.
26. Kmiecik P., Leonardelli M., Teige M. Novel connections in plant organellar signalling link different stress responses and signalling pathways // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 3793–3807.
27. Gollan P.J., Tikkanen M., Aro E.M. Photosynthetic light reactions: integral to chloroplast retrograde signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 27. P. 180–191.
28. Guo H., Feng P., Chi W., Sun X., Xu X., Li Y., Ren D., Lu C., David Rochaix J., Leister D., Zhang L. Plastid-nucleus communication involves calcium-modulated MAPK signaling // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12173.
29. Colombo M., Tadini L., Peracchio C., Ferrari R., Pesaresi P. GUN1, a jack-of-all-trades in chloroplast protein homeostasis and signaling // *Frontiers in Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1427.
30. Wu G.-Z., Chalvin C., Hoelscherb M., Meyer E.H., Wu X.N., Bock R. Control of retrograde signaling by rapid turnover of GENOMES UNCOUPLED1 // *Plant Physiology.* 2018. V. 176. P. 2472–2495.
31. Sun X., Feng P., Xu X., Guo H., Ma J., Chi W., Lin R., Lu C., Zhang L. A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. P. 477.
32. Adam Z. Plastid intramembrane proteolysis // *Biochim Biophys Acta.* 2015. V. 1847. P. 910–914.
33. Hirosawa Y., Ito-Inaba Y., Inaba T. Ubiquitin-proteasome-dependent regulation of bidirectional communication between plastids and the nucleus // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 310.
34. Tokumaru M., Adachi F., Toda M., Ito-Inaba Y., Yazu F., Hirosawa Y., Sakakibara Y., Suiko M., Kakizaki T., Inaba T. Ubiquitin-proteasome dependent regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 transcription factor in response to plastid signals // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 524–535.
35. Martín G., Leivar P., Ludevid D., Tepperman J., Quail P.H., Monte E. Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network // *Nat Commun.* 2016. V. 7. P. 11431.
36. Tang X., Miao M., Niu X., Zhang D., Cao X., Jin X., Zhu Y., Fan Y., Wang H., Liu Y., Sui Y., Wang W., Wang A., Xiao F., Giovannoni J., Liu Y. Ubiquitin-conjugated degradation of golden 2-like transcription factor is mediated by CUL4-DDB1-based E3 ligase complex in tomato // *New Phytol.* 2016. V. 209. P. 1028–1039.
37. Cookson P.J., Kiano J.W., Shipton C.A., Fraser P.D., Romer S., Schuch W., Bramley P.M., Pyke K.A. Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high pigment-1 mutant of tomato // *Planta.* 2003. V. 217. P. 896–903.
38. Huang D., Lin W., Deng B., Ren Y., Miao Y. Dual-located WHIRLY1 interacting with LHCA1 alters photochemical activities of photosystem I and is involved in light adaptation in *Arabidopsis* // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 2352.
39. Ren Y., Li Y., Jiang Y., Wu B., Miao Y. Phosphorylation of WHIRLY1 by CIPK14 shifts its localization and dual functions in *Arabidopsis* // *Molecular Plant.* 2017. V. 10. P. 749–763.
40. Kucharewicz W., Distelfeld A., Bilger W., Müller M., Munné-Bosch S., Hensel G., Krupinska K. Acceleration of leaf senescence is slowed down in transgenic barley plants deficient in the DNA/RNA-binding protein WHIRLY1 // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 983–996.
41. Юрина Н.П., Шаранова Л.С., Одинцова М.С. Геномы пластид фотосинтезирующих эукариот // *Биохимия.* 2017. Т. 82. С. 902–918.
42. Feng P., Guo H., Chi W., Chai X., Sun X., Xu X., Ma J., Rochaix J.D., Leister D., Wang H., Lu C., Zhang L. Chloroplast retrograde signal regulates flowering // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016. V. 113. P. 10708–10713.