

GUN1调控质体/叶绿体蛋白稳态的分子机制

孙雪萍¹, 王兴军², 马长乐¹, 李鹏呈^{1,2,*}

¹山东师范大学生命科学学院, 济南250014

²山东省农业科学院生物技术研究中心, 山东省作物遗传育种与生态生理重点实验室, 济南250100

*通信作者(lpcsas@outlook.com)

摘要: 细胞内蛋白稳态(proteostasis)的维持对机体正常生长发育至关重要。在植物细胞中, 质体/叶绿体作为半自主细胞器, 具有由核基因组和自身基因组编码的蛋白构成的蛋白质组。因此, 质体中蛋白稳态的维持不仅需要质体自身调控, 还需要其与细胞核之间通过逆行信号进行协调。GUN1 (GENOMES UNCOUPLED 1)被认为是介导质体逆行信号的中央枢纽。最新研究结果进一步揭示GUN1在多维度参与调控质体蛋白稳态。本文重点综述GUN1调控质体蛋白稳态分子机制的研究进展。

关键词: 质体蛋白稳态; GUN1; 质体逆行信号; 叶绿体

Mechanisms for the regulation of chloroplast/plastid proteostasis by GUN1

SUN Xueping¹, WANG Xingjun², MA Changle¹, LI Pengcheng^{1,2,*}

¹College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

²Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100, China

*Corresponding author (lpcsas@outlook.com)

Abstract: The maintenance of protein homeostasis (proteostasis) is essential for organism's normal growth and development. In plant cells, the chloroplast/plastid, as a semi-autonomous organelle, possesses a proteome that consists of proteins encoded by both the nuclear and its own genomes. Thus, the maintenance of plastid proteostasis is not only depended on the plastid's self-regulation mechanism, but also needs its fine coordination with the nucleus through the retrograde communication. GUN1 (GENOME UNCOUPLED 1) is known as a central hub mediating the chloroplast-to-nucleus retrograde signaling. However, several recent studies have stated that GUN1 is also required for the self-regulation of plastid proteostasis through multiple pathways. Here, we summarize advances in the molecular mechanism by which GUN1 maintains the plastid proteostasis.

Key words: plastid proteostasis; GUN1; plastid retrograde signaling; chloroplast

叶绿体是植物细胞特有的细胞器, 作为光合作用的主要场所, 极容易受到氧化损伤。为协调叶绿体内的能量分配, 维持最佳的光合作用活性, 植物体内不同的细胞器之间需要相互感知以及时应对各种破坏稳态的因素。质体蛋白稳态是指质体或叶绿体蛋白的合成、降解、转运、折叠修饰及

质量控制等复杂的生理过程的动态平衡, 这个稳态系统的实现离不开质体与细胞核及其他细胞器

收稿 2020-07-27 修定 2021-02-24

资助 国家自然科学基金(31500257)、山东省泰山学者项目(ts20190964)和山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2018E13)。

之间的相互协调。叶绿体蛋白质的正常周转是光合作用的基础, 稳态的破坏将会在一定程度上影响植物的正常生长进程。

叶绿体由大约3 000个蛋白组成, 其中超过95%的蛋白由核基因编码并在翻译完成后依赖N端的信号肽转运至叶绿体中, 其余蛋白则由叶绿体自身编码。因此, 叶绿体内蛋白稳态的维持涉及自身调控和细胞核调控。自身调控涉及多种蛋白酶(如Clp、FtsH、Deg等)和分子伴侣(如cpHsc等)(Nishimura等2017), 而依赖于细胞核的调控由质体逆行信号介导。逆行信号是质体发育和代谢状态变化时产生特定的信号分子传递到细胞核, 从而改变某些核基因的表达(Hernandez-Verdeja和Strand 2018)。GUN1 (GENOMES UNCOUPLED 1)蛋白最初被发现介导质体逆行信号(Susek等1993), 进一步研究发现其在质体自身调控中的作用更为突出(Tadini等2016)。来自不同研究组的人员通过免疫共沉淀串联质谱技术(CoIP-LC-MS/MS)发现GUN1至少可以和300多种不同的质体蛋白发生互作(Tadini等2016; Wu等2019)。这些GUN1潜在的互作蛋白涉及转录、RNA编辑、翻译及翻译后调控等过程, 暗示GUN1可能在多维度参与调控质体蛋白稳态。GUN1基因在植物体整个发育过程中都有表达, 在不同的发育阶段对稳态的维持可能发挥不同的作用(Wu等2018)。

1 GUN基因的发现

当用影响叶绿体生物发生的质体翻译抑制剂林可霉素(lincomycin, Lin)或类胡萝卜素生物合成抑制剂达草灭(norflurazon, NF)处理拟南芥幼苗时, 发现部分光合作用相关的细胞核基因表达水平显著降低。这一现象暗示可能存在一种感知叶绿体受损的信号因子或者受损的叶绿体本身释放某种信号因子, 逆行传递到细胞核, 协调核基因的表达以维持质体的稳态。对在此现象中有缺陷的突变体进行遗传筛选, 发现了*gun1*突变体(Susek等1993)。在Lin或NF处理条件下, *gun1*突变体细胞核中本该受抑制的光合作用相关基因仍具有较高表达水平(Koussevitzky等2007)。进一步突变体筛选共获得了6种*gun*突变体, 相关基因编码的蛋白均定位于

质体。其中, GUN2~GUN6参与四吡咯生物合成(tetrapyrrole biosynthesis pathway, TBP), 它们的突变体*gun2~gun6*在NF处理后未能有效抑制相关核基因的转录。GUN2和GUN3分别编码亚铁血红素加氧酶(heme oxygenase)和生色团合酶(phytychromobilin synthase), 负责将亚铁血红素(heme)转化为生色团(phytychromobilin) (Tanaka和Tanaka 2007)。GUN4编码叶绿素生物合成的调节因子, 可以通过激活镁螯合酶(Mg-chelatase)来调节叶绿素的合成(Larkin等2003)。GUN5编码镁螯合酶的ChlH亚基, 也被称为CHLH (Mochizuki等2001)。GUN4和GUN5参与原卟啉IX (protoporphyrin IX, proto IX)的镁螯合作用以产生镁-原卟啉IX (Mg-proto IX), 这是叶绿素生物合成的关键步骤。*gun6*是一个功能获得型突变体, 其解偶联表型的产生来自于GUN6基因的功能增强(Woodson等2011)。GUN6基因编码质体亚铁螯合酶(ferrochelatase 1, FC1)。FC1可将铁离子插入原卟啉IX形成亚铁血红素, 功能位于GUN2和GUN3上游, 在四吡咯合成血红素的分支中起关键作用(Woodson等2011)。值得注意的是, GUN1虽不直接参与四吡咯生物合成, 然而最新研究结果表明, GUN1不仅可以增强FC1的活性及其与底物的亲和性, 其三角状五肽重复(pentatricopeptide repeat, PPR)结构域还可以与亚铁血红素等结合进而调控四吡咯生物合成(Shimizu等2019)。

2 GUN1维持质体蛋白稳态的分子机制

2.1 GUN1通过逆行信号调控质体蛋白稳态

GUN1基因编码一个叶绿体定位的三角状五肽重复蛋白, 包含10个重复的PPR结构域和C端的小增变基因S相关(small MutS-related, SMR)结构域(Wu等2018)。最新研究发现GUN1蛋白在体内半衰期非常短暂(约4 h), 其蛋白的不稳定性部分依赖于Clp蛋白酶体对它的降解作用(Wu等2018)。ClpC1 (caseinolytic protease complex 1)是定位于叶绿体基质的一个重要分子伴侣, 由叶绿体基因组编码, 主要作用是将蛋白底物运送至Clp蛋白酶体进行降解(Sjogren等2014)。在质体翻译抑制剂Lin或壮观霉素(spectinomycin, Spec)处理条件下, ClpC1蛋白积累水平显著降低, 而此时GUN1蛋白在体内

却变得稳定。此外,在*clpC1*突变体背景下, GUN1蛋白也显著积累。上述结果暗示GUN1蛋白的高周转率可能由ClpC1参与调控。进一步研究发现,去除最后一个PPR结构域和与其紧邻的结构域间隔区(spacer),能够明显抑制GUN1的高周转率,说明此区域包含GUN1蛋白的降解信号(Wu等2018)。

质体逆行信号目前被发现有4种主要调控途径,包括质体基因表达(plastid gene expression, PGE)、TBP相关信号、光合电子传递链(photosynthetic electron transport, PET)活性改变和其产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS; 如 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 等)以及受损的质体代谢产生的信号分子(如MEcPP和 β -cyclocitral等)(Chan等2016; de Souza等2017; Hernandez-Verdeja和Strand 2018)。其中, PGE和TBP引发的信号属于biogenic类质体信号,主要在叶绿体生物发生过程中起作用;而质体代谢受损引发的信号则属于operational类,其生物学意义在于调控叶绿体及细胞内稳态响应外界环境刺激。由于ROS和PET氧化还原状态改变产生的信号在叶绿体生物发生过程中及成熟叶绿体中均发挥作用,因此其既属于biogenic类,也属于operational类信号。

GUN1目前被发现参与PGE和TBP信号通路(Shimizu等2019; Wu等2019)。在PGE信号通路中,一个定位于叶绿体膜的包含植物同源结构域(plant homeodomain, PHD)的转录因子PTM作用于GUN1下游。在Lin或NF处理下, GUN1介导的质体信号促使PTM蛋白发生丝氨酸蛋白酶体依赖的蛋白剪切, PTM被切下的N端PHD结构域游离至细胞核,并作为转录因子进一步激活*ABI4* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4*)基因的表达(Sun等2011)。ABI4转录因子可以靶向光合作用相关基因启动子的S-box元件并抑制它们的转录(Koussevitzky等2007)。然而,由于此部分结果无法被其他研究组重复, GUN1-PTM-ABI4通路仍处于争议中(Page等2017; Kacprzak等2019)。进一步研究发现GUN1还可以通过GLK (Golden2-like)转录因子调控细胞核中光合作用相关基因的表达,进而影响叶绿体蛋白稳态(Tokumaru等2017)。GLK1和GLK2都是叶绿体发育的正调因子,参与调控编码叶绿素生物合成、光捕获及电子传递链相关蛋白基因的表达(Waters和Langdale

2009)。在黑暗条件下, *GLK1*基因的表达主要被PIF (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR)转录因子抑制。然而,当叶绿体功能异常或受损时,抑制*GLK1*基因的表达则依赖于GUN1介导的质体逆行信号(Martin等2016)。GUN1-GLK1信号通路可减缓植物幼苗在高光条件下的光形态建成过程,进而避免幼苗遭受严重的光氧化破坏(Martin等2016)。

由于除GUN1之外的其余GUN蛋白均参与TBP,因此受损的TBP产生的四吡咯代谢中间产物被广泛认为是主要的质体逆行信号分子(Strand等2003; Woodson等2011)。值得注意的是,通过筛选GUN1的互作蛋白,发现GUN1在体内可以和TBP相关酶类发生互作,如胆色素原脱氨酶(porphobilinogen deaminase, PBGD)、尿卟啉原III脱羧酶(uroporphyrinogen III decarboxylase, UROD2)及FC1等,暗示GUN1可能也作用于TBP通路(Tadini等2016)。进一步研究发现GUN1可以直接靶向TBP中间产物如亚铁血红素和卟啉类化合物等,进而调控TBP代谢流并影响细胞核中光合相关基因的表达(图1)(Shimizu等2019)。

2.2 GUN1在质体内直接调控蛋白稳态

由于GUN1蛋白在体内的高周转率,其分子功能一直难以捉摸,成为植物细胞中最神秘的蛋白之一(Wu等2018)。随着研究的深入,越来越多的证据表明GUN1可能依赖于其互作蛋白在质体内直接参与调控蛋白稳态,且其参与的调控机制涉及转录、转录后、核糖体组装、翻译和蛋白输入(protein import)等多个阶段(图1)。

2.2.1 GUN1调控NEP活性

叶绿体中转录过程由2种RNA聚合酶介导:一种是由细胞核中*RpoT2/3*基因编码的RNA聚合酶(nuclear-encoded RNA polymerase, NEP),另一种是由多个质体基因编码的蛋白组成的复合体(plastid-encoded RNA polymerase, PEP)(Yu等2014; Borner等2015)。NEP也称为RpoTp,负责转录质体管家基因,包括编码PEP的基因。当PEP功能异常时,会诱导NEP活性增强,这一现象称为“ Δ -*rpo*表型”(Allison等1996)。研究发现,在Lin处理条件下, PEP活性几乎丧失,而NEP活性显著提高,表现出 Δ -*rpo*表

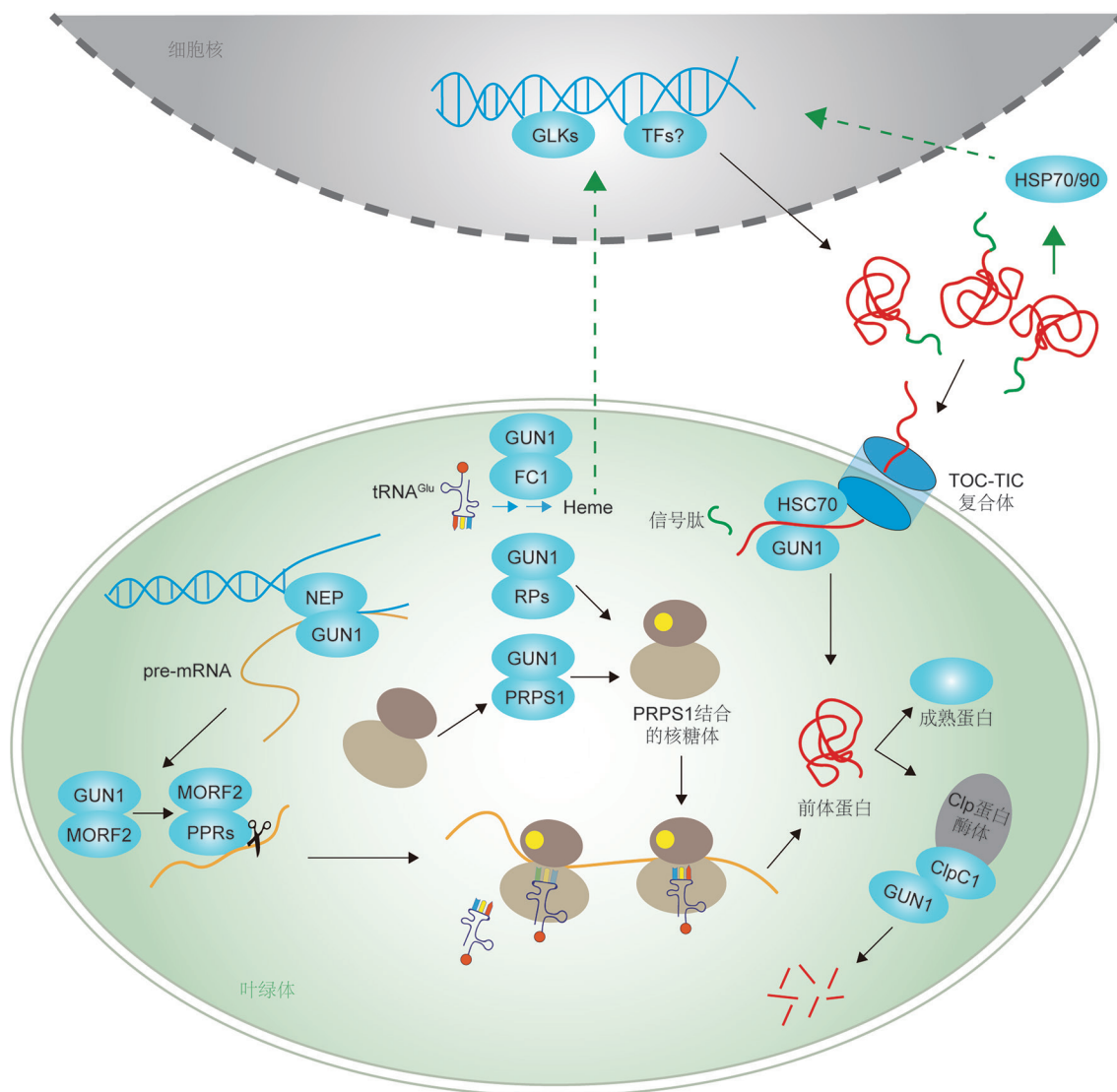


图1 GUN1在多种途径调控质体/叶绿体蛋白稳态

Fig. 1 GUN1 regulates plastid/chloroplast proteostasis in multiple pathways

在叶绿体发育早期或其功能发生异常时, GUN1可通过影响TBP代谢或胞质HSP70/90介导的质体逆行信号来协调质体蛋白的供求关系。在质体/叶绿体发育过程中, 细胞核编码的质体蛋白在信号肽引导下通过质体膜上的TOC-TIC复合体进入质体, GUN1通过与复合体上的HSC70互作影响蛋白输入过程。在质体自身转录阶段, GUN1参与调控NEP (RpoTp)活性; 转录完成后, GUN1通过MORF2影响RNA编辑; 在核糖体加工过程中, GUN1调控PRPS1及多种核糖体蛋白嵌入核糖体前体, 进而影响翻译; 在蛋白翻译完成后, GUN1还可通过Clp蛋白酶体调控前体蛋白的降解过程。图中绿色虚线箭头代表质体逆行信号通路, 黑色实线箭头代表质体自身调控机制, 蓝色实线箭头代表TPB代谢过程。

型(Tadini等2020)。然而, 在相同处理条件的*gun1*突变体背景中, Δ -*rpo*效应丢失, 说明 Δ -*rpo*表型依赖于GUN1。研究还发现GUN1与RpoTp互作(图1), 进一步说明GUN1参与调控NEP活性, 进而在转录水平影响质体蛋白稳态(Tadini等2020)。

2.2.2 GUN1-MORF2调控质体内RNA编辑(RNA-editing)

上文提到, GUN1属于PPR蛋白。植物中典型的PPR蛋白一般定位于线粒体或质体中, 能够结合RNA并对其进行剪切、编辑、拼接、代谢甚至调

控其翻译(Liu等2013; Barkan和Small 2014)。然而,实验发现GUN1似乎无法直接结合RNA (Tadini等2016)。有趣的是,在NF或Lin条件下, GUN1功能缺失改变了质体中许多基因的RNA编辑效率,如*clpP*-559和*ndhD*-878等效率增强以及*psbZ*-50和*rpoC1*-488等效率降低,说明GUN1在逆行信号发生的条件下可能参与调控质体RNA编辑(Zhao等2019)。利用酵母双杂交筛选发现GUN1可以和MORF2 (MULTIPLE ORGANELLAR RNA EDITING FACTOR 2)互作,并利用双分子荧光互补及免疫共沉淀实验确认其在体内互作(Zhao等2019)。MORFs蛋白被证实可以与RNA识别蛋白及锌指蛋白共同组成RNA编辑小体(Sun等2016)。进一步实验发现MORF2过表达植株在NF条件下表现出类似于*gun1*的逆行信号表型,且对RNA编辑效率的影响也与*gun1*类似,暗示MORF2和GUN1共同调控质体蛋白稳态(图1) (Zhao等2019)。遗憾的是,由于*morf2*单突变体幼苗致死(Takenaka等2012),缺乏对*gun1*和*morf2*的遗传学分析,因此目前无法准确判断GUN1对RNA编辑的影响是否依赖于MORF2。尽管如此,此研究指出RNA编辑效率和质体逆行信号存在关联,为后续深入研究提供了线索。

2.2.3 GUN1-PRPS1调控质体核糖体功能

研究还发现GUN1可以与核糖体蛋白PRPS1 (PLASTID RIBOSOMAL PROTEIN S1)互作(Tadini等2016)。更重要的是, GUN1在转录后水平上影响PRPS1蛋白的积累。*prps1-1*是PRPS1的敲低突变体,蛋白水平下降约70%,具有叶黄表型。在*prps1-1*背景中敲除GUN1,虽然PRPS1的RNA水平并未发生明显变化,但PRPS1蛋白积累及叶片颜色均恢复至野生型水平。此外,在野生型背景中过量表达GUN1使PRPS1的蛋白积累水平下降约30%。因此, GUN1可能是PRPS1的负调因子(Tadini等2016)。

质体PRPS1与原核RPS1功能保守,可识别mRNA的leader序列,并在翻译起始过程中介导mRNA与30S核糖体结合。PRPS1处于核糖体结合状态或单体状态,是唯一可以在这两种状态间转换的核糖体蛋白(Delvillani等2011),在核糖体翻译过程中发挥“开关”的作用。在GUN1过表达株系中,

游离的PRPS1蛋白相比于野生型及*gun1*突变体减少,而在大分子质量蛋白复合体(200~500 kDa)中增多(Tadini等2016)。因此, GUN1可能通过平衡PRPS1与核糖体的结合与解离过程进而影响质体多聚核糖体(polysome)的组装及翻译过程(图1)。

此外,免疫共沉淀实验发现GUN1与质体编码的核糖体蛋白PRPL2、PRPS3、PRPS4及核编码的质体核糖体蛋白PRPL10等互作,进一步说明GUN1可能通过影响核糖体组装或活性而在质体翻译过程中发挥作用(Tadini等2016; Wu等2019)。

2.2.4 GUN1-FUG1调控质体蛋白稳态

GUN1-GFP融合蛋白的免疫沉淀产物中也检测到叶绿体翻译延伸因子FUG1/cpIF2 (chloroplast translation initiation factor IF-2) (Tadini等2016; Wu等2019)。依据蛋白功能推测, FUG1可能在翻译起始阶段保护Met-tRNA免受自发水解,并促进其与30S核糖体亚基的结合,此外也参与70S核糖体复合体形成过程中GTP的水解。FUG1功能完全丧失胚胎死亡,是生长发育必需蛋白之一(Miura等2007)。其敲低突变体*fug1-3*虽在子叶期无显著表型,但在成苗期莲座叶基部的幼嫩部位略微发黄。然而,在*fug1-3*背景中敲除GUN1则导致子叶萎黄、光合效率下降、生长迟缓及晚花等表型,说明GUN1在*fug1-3*中发挥关键作用。利用S³⁵-Met体内标记技术结合翻译组谱图(polysome profiling)分析D1蛋白的翻译速率,发现GUN1功能缺失并未影响*fug1-3*的翻译效率,暗示GUN1可能并不作用于质体翻译起始阶段(Marino等2019)。

有趣的是,转录组比较分析发现,在*gun1*和*fug1-3*体内产生的转录组变化高度相似(约80%的基因重叠),再次暗示GUN1和FUG1功能相关联。蛋白组学分析进一步发现, GUN1功能缺失使*fug1-3*某些类囊体膜光系统相关蛋白及核糖体蛋白积累水平下调(Marino等2019)。尽管GUN1通过FUG1调控蛋白稳态的机制尚不明确,但上述结果表明GUN1在维持*fug1-3*突变体蛋白稳态过程中发挥重要作用。

2.2.5 GUN1-HSP调控质体蛋白输入

核基因编码的叶绿体蛋白在胞质合成后,依赖于N端的正电荷信号肽通过叶绿体双层膜上的

TOC (translocon at the outer envelope of chloroplasts)-TIC (translocon at the inner envelope of chloroplasts) 复合体进入叶绿体基质(Kikuchi等2013)。跨膜过程需要ATP和GTP供能以及分子伴侣(如质体cpHSP70/90/93等)协助(Shi和Theg 2013)。前体蛋白首先被TOC159和TOC34蛋白所识别,此过程由cpHSP70/90等介导,随后转运至TIC复合体,TIC110和TIC40互作促使TIC110释放前体蛋白,前体蛋白进一步被cpHSP93结合并释放到基质中(Ganesan等2018)。

在GUN1的互作底物中,包含TOC159、TIC110及cpHSP70/90/93等蛋白(Tadini等2016; Wu等2019)。cpHSP93-V亚型即上文提到的调控GUN1积累的ClpC1,此蛋白可能参与对新输入蛋白的质量控制。蛋白组学分析发现,*gun1 clpC1*双突变体相比于野生型及*clpC1*单突变体,其细胞质中伴侣蛋白HSP70/90等显著积累,暗示胞质中蛋白质质量控制系统被激活(Wu等2019)。进一步实验发现,在低浓度Lin处理下,GUN1功能缺失可导致质体蛋白输入效率显著下降(Wu等2019)。前文提到GUN1调控NEP活性,而TIC214由NEP负责转录,因此在Lin处理的*gun1*中,TIC214蛋白积累显著下降(Tadini等2020)。此外,在正常条件下,GUN1功能缺失还可能改变了TOC-TIC复合体的组成。上述结果表明,在早期叶绿体发育过程中或叶绿体受损时,GUN1在质体蛋白输入过程中发挥关键作用,其功能缺失引发细胞质中叶绿体前体蛋白的过量积累,进而激活细胞质中的蛋白质质量控制及降解途径。

更重要的是,前体蛋白在胞质中的过量积累诱导的胞质HSP70/90可能参与质体逆行信号。在基因水平或通过药物靶向抑制HSP90,可显著缓解*gun1*突变体在Lin或NF条件下的GUN表型(即细胞核中光合相关基因的高表达),说明胞质中积累的质体前体蛋白可能是质体逆行信号的重要媒介(图1)(Wu等2019)。然而,此部分研究结论也已引发争议,因为大多数的*toc/tic*突变体并未表现出逆行信号表型(Shimizu等2019)。

前体蛋白进入质体,还需HSP70/90/93等分子伴侣介导蛋白折叠过程。尽管GUN1与上述蛋白互作,但目前并没有直接证据表明GUN1参与这一

过程。当HSP功能异常时,质体中未折叠蛋白过量积累,便会引发未折叠蛋白响应(unfolded protein response, UPR) (Ramundo等2014)。叶绿体未折叠蛋白响应(chloroplast unfolded protein response, cpUPR)进一步通过逆行信号诱导细胞核中热激转录因子HsfA2及其靶基因如*Hsp21*和*ClpB3*等表达,此过程也不依赖于GUN1 (Llamas等2017)。然而,同时敲除*GUN1*和编码质体质量控制蛋白的基因*ClpR1*导致幼苗死亡(Llamas等2017)。因此,GUN1是否参与cpUPR响应还需进一步研究。

3 GUN1蛋白依旧神秘且充满魅力

综上,通过鉴定GUN1互作蛋白并结合遗传学分析,人们逐步认识了GUN1复杂的分子及生物学功能。GUN1在调控质体蛋白稳态方面的作用与质体逆行信号密切相关。此外,GUN1同时也参与调控质体四吡咯代谢,进一步说明GUN1可以整合多种质体逆行信号。然而,尽管GUN1能够在多种维度调控质体蛋白稳态,但其本身的分子功能依然未知。前文提到GUN1包含一个保守的SMR结构域,此结构域通常在DNA复制过程中利用其核酸内切酶活性修复错配的碱基。虽然迄今未发现GUN1在体内能够直接结合DNA或RNA的证据,但由于GUN1在体内能与众多蛋白发生互作,其能否通过其他蛋白的桥接作用来发挥SMR的功能仍值得验证。此外,GUN1通过何种因子或机制来协调自身在不同途径中的功能,这些功能的实现是否依赖于其高周转率,以及哪种途径在何时起主导作用等问题仍需要深入探讨。

参考文献(References)

- Allison LA, Simon LD, Maliga P (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J*, 15: 2802–2809
- Barkan A, Small I (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 65: 415–442
- Borner T, Aleynikova AY, Zubo YO, et al (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1847: 761–769
- Chan KX, Phua SY, Crisp P, et al (2016). Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Ann Rev Plant Biol*, 67: 25–53

- de Souza A, Wang JZ, Dehesh K (2017). Retrograde signals: integrators of interorganellar communication and orchestrators of plant development. *Ann Rev Plant Biol*, 68: 85–108
- Delvillani F, Papiani G, Deho G, et al (2011). S1 ribosomal protein and the interplay between translation and mRNA decay. *Nucleic Acids Res*, 39: 7702–7715
- Ganesan I, Shi LX, Labs M, et al (2018). Evaluating the functional pore size of chloroplast TOC and TIC protein translocons: import of folded proteins. *Plant Cell*, 30: 2161–2173
- Hernandez-Verdeja T, Strand A (2018). Retrograde signals navigate the path to chloroplast development. *Plant Physiol*, 176: 967–976
- Kacprzak SM, Mochizuki N, Naranjo B, et al (2019). Plastid-to-nucleus retrograde signalling during chloroplast biogenesis does not require ABI4. *Plant Physiol*, 179: 18–23
- Kikuchi S, Bedard J, Hirano M, et al (2013). Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science*, 339: 571–574
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, et al (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316: 715–719
- Larkin RM, Alonso JM, Ecker JR, et al (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science*, 299: 902–906
- Liu S, Melonek J, Boykin LM, et al (2013). PPR-SMRs: ancient proteins with enigmatic functions. *RNA Biol*, 10: 1501–1510
- Llamas E, Pulido P, Rodriguez-Concepcion M (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLOS Genet*, 13: e1007022
- Marino G, Naranjo B, Wang J, et al (2019). Relationship of GUN1 to FUG1 in chloroplast protein homeostasis. *Plant J*, 99: 521–535
- Martin G, Leivar P, Ludevid D, et al (2016). Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network. *Nat Commun*, 7: 11431
- Miura E, Kato Y, Matsushima R, et al (2007). The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis yellow variegated* mutants. *Plant Cell*, 19: 1313–1328
- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, et al (2001). *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 2053–2058
- Nishimura K, Kato Y, Sakamoto W (2017). Essentials of proteolytic machineries in chloroplasts. *Mol Plant*, 10: 4–19
- Page MT, Kacprzak SM, Mochizuki N, et al (2017). Seedlings lacking the PTM protein do not show a *genomes uncoupled (gun)* mutant phenotype. *Plant Physiol*, 174: 21–26
- Ramundo S, Casero D, Muhlhaus T, et al (2014). Conditional depletion of the chlamydomonas chloroplast ClpP protease activates nuclear genes involved in autophagy and plastid protein quality control. *Plant Cell*, 26: 2201–2222
- Shi LX, Theg SM (2013). Energetic cost of protein import across the envelope membranes of chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 930–935
- Shimizu T, Kacprzak SM, Mochizuki N, et al (2019). The retrograde signaling protein GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116: 24900–24906
- Sjogren LL, Tanabe N, Lymperopoulos P, et al (2014). Quantitative analysis of the chloroplast molecular chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* reveals new insights into its localization, interaction with the Clp proteolytic core, and functional importance. *J Biol Chem*, 289: 11318–11330
- Strand A, Asami T, Alonso J, et al (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature*, 421: 79–83
- Sun T, Bentolila S, Hanson MR (2016). The unexpected diversity of plant organelle RNA editosomes. *Trends Plant Sci*, 21: 962–973
- Sun X, Feng P, Xu X, et al (2011). A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun*, 2: 477
- Susek RE, Ausubel FM, Chory J (1993). Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74: 787–799
- Tadini L, Peracchio C, Trotta A, et al (2020). GUN1 influences the accumulation of NEP-dependent transcripts and chloroplast protein import in *Arabidopsis* cotyledons upon perturbation of chloroplast protein homeostasis. *Plant J*, 101: 1198–1220
- Tadini L, Pesaresi P, Kleine T, et al (2016). GUN1 controls accumulation of the plastid ribosomal protein S1 at the protein level and interacts with proteins involved in plastid protein homeostasis. *Plant Physiol*, 170: 1817–1830
- Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, et al (2012). Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 5104–5109
- Tanaka R, Tanaka A (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher

- plants. *Ann Rev Plant Biol*, 58: 321–346
- Tokumaru M, Adachi F, Toda M, et al (2017). Ubiquitin-proteasome dependent regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 transcription factor in response to plastid signals. *Plant Physiol*, 173: 524–535
- Waters MT, Langdale JA (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J*, 28: 2861–2873
- Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Chory J (2011). Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Curr Biol*, 21: 897–903
- Wu GZ, Chalvin C, Hoelscher M, et al (2018). Control of retrograde signaling by rapid turnover of GENOMES UNCOUPLED1. *Plant Physiol*, 176: 2472–2495
- Wu GZ, Meyer EH, Richter AS, et al (2019). Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress. *Nat Plants*, 5: 525–538
- Yu QB, Huang C, Yang ZN (2014). Nuclear-encoded factors associated with the chloroplast transcription machinery of higher plants. *Front Plant Sci*, 5: 316
- Zhao X, Huang J, Chory J (2019). GUN1 interacts with MORF2 to regulate plastid RNA editing during retrograde signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116: 10162–10167