

AMEDEO ALPI*

Le diverse forme di plastidi e le vie metaboliche associate

I plastidi sono organelli cellulari che effettuano funzioni metaboliche fondamentali come la fissazione fotosintetica del carbonio, la sintesi dell'amido, degli aminoacidi, degli acidi grassi e di molti metaboliti secondari. Questi organelli esistono in più tipi nella cellula dei vegetali, distinguibili per struttura, qualità dei pigmenti e per funzione. Tra i più diffusi, oltre ai cloroplasti del tessuto fotosintetico fogliare, si conoscono i cromoplasti dei fiori e dei frutti, e, tra i leucoplasti, gli amiloplasti delle radici e dei tessuti di riserva (fig. 1).

CLOROPLASTO

I cloroplasti, sotto il profilo evolutivo, si considerano originati per integrazione endosimbiontica di un procariote fotosintetico – cianobatterio – in un eucariote progenitore delle alghe; in altre parole, una intera cellula si sarebbe trasformata in un organello che, del cianobatterio, avrebbe conservato molte funzioni, nonostante che molti dei geni batterici siano stati trasferiti nel nucleo dell'organismo ospite.

Considerata l'importanza di questo comparto della cellula verde, la sua fisiologia è sempre stata studiata con grande attenzione, soprattutto tramite metodologie biochimiche e biofisiche, sino a quando, negli anni '80 del secolo scorso, le metodiche "high throughput" hanno cambiato il nostro modo di indagare sui fenomeni biologici; la genomica e la genomica funzionale, oltre alle analisi trascrittomiche, proteomiche e metabolomiche, hanno consentito di avere un quadro delle attività del cloroplasto certamente più preciso e completo che nel passato. In particolare la trascrittomica e la proteomica sono i me-

* *Università di Pisa*

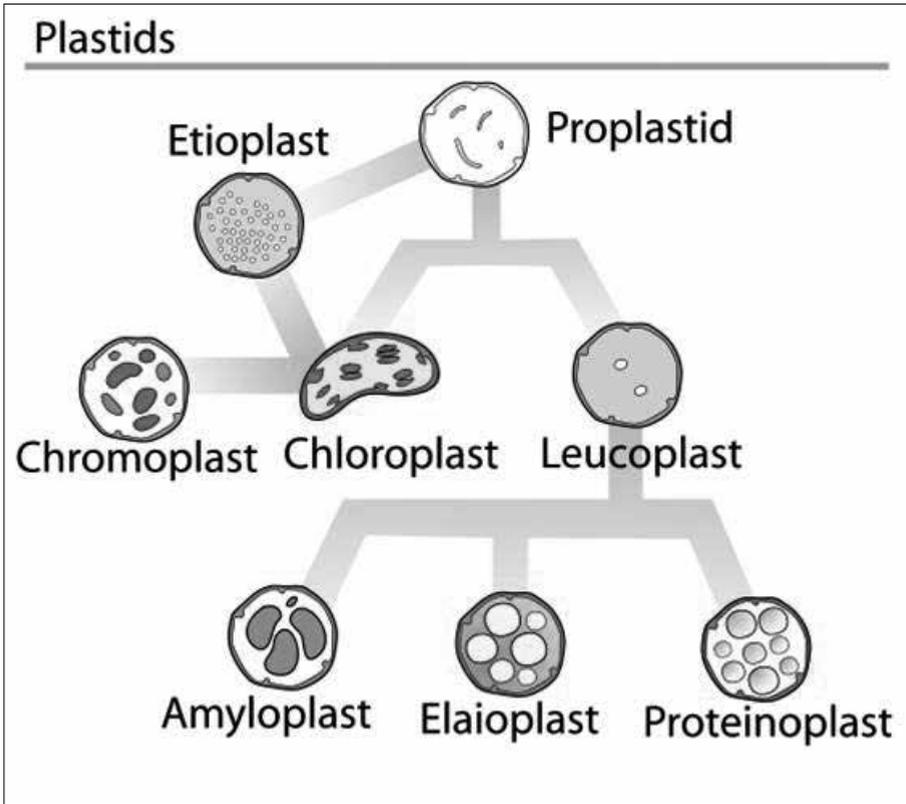


Fig. 1 I diversi tipi di plastidio della cellula dei vegetali (Wikipedia)

todi normalmente impiegati per assegnare precise funzioni alle proteine del cloroplasto. In questo periodo, come è accaduto in altri settori della fisiologia vegetale, sono cambiate, parzialmente, anche le specie oggetto di indagine: si indaga sostanzialmente per le alghe verdi, il *Chlamydomonas reinhardtii*, e per le piante superiori, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*.

Le funzioni essenziali del cloroplasto sono, oltre alla fotosintesi, la biosintesi dell'amido, la biosintesi degli aminoacidi e il metabolismo dei lipidi. Il livello di approfondimento di cui siamo stati capaci nei decenni accennati, ha reso possibile lo sfruttamento delle conoscenze acquisite nel miglioramento delle coltivazioni tramite metodi biotecnologici. Siamo ormai vicini alla totale identificazione del proteoma plastidiale, pertanto è facile prevedere che progredirà anche lo studio delle interazioni tra queste proteine, mettendo nelle mani dei ricercatori utilissime informazioni per procedere a ulteriori conoscenze e inevitabili applicazioni.

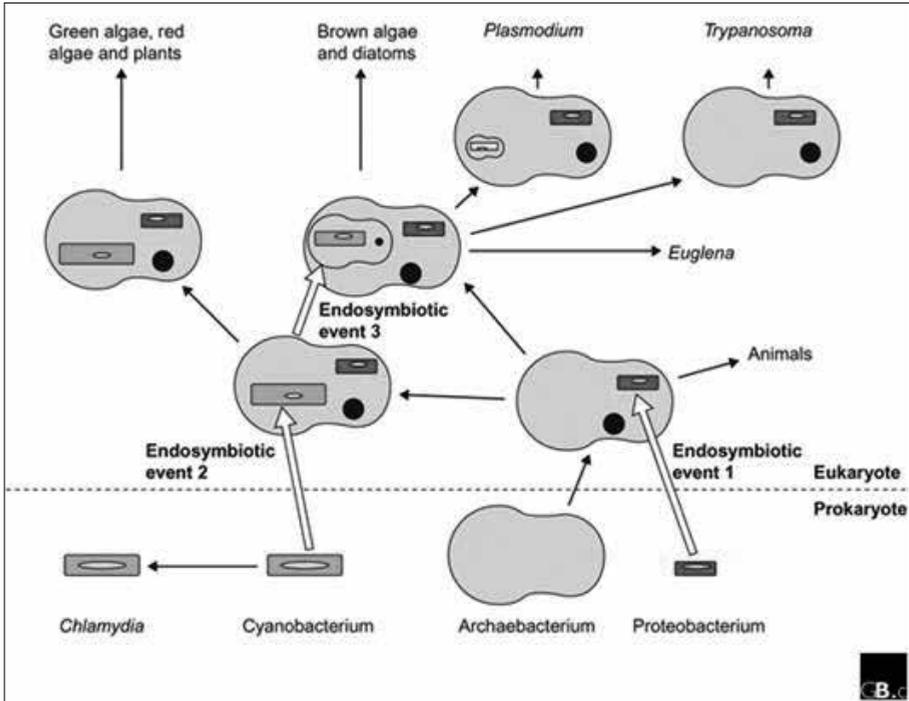


Fig. 2 Rappresentazione schematica del processo endosimbiontico (Raven e Allen, 2003). Le frecce nere indicano le pathway evolutive; quelle bianche gli eventi endosimbiontici nelle cellule ospiti. L'evento simbiotico 1 rappresenta l'origine degli eucarioti e l'acquisizione del mitocondrio; l'evento 2 è l'origine della cellula contenente il plastidio, mentre l'evento 3 rappresenta endosimbiosi di ordine superiore che avrebbe condotto all'origine di molti "Phyla" algali, come pure degli Apicomplexa (come il «Plasmodium»). I segni ellittici dentro agli organelli indicano l'origine batterica

Considerata la vastissima letteratura scientifica sul cloroplasto, credo che l'unico approccio utile sia quello di indicare quali siano oggi le principali novità circa le funzioni dell'organello e quali siano i fronti su cui si concentrano le attenzioni dei ricercatori, così come delineato in un recente e importante contributo di Armbruster et al. (2010).

Principali metodologie usate

Grandi avanzamenti nella nostra conoscenza sono stati acquisiti tramite "forward genetics" (genetica diretta) isolando mutanti con fenotipi specifici e ricercandone la base genica; si sono, così, ampliate le basi molecolari delle

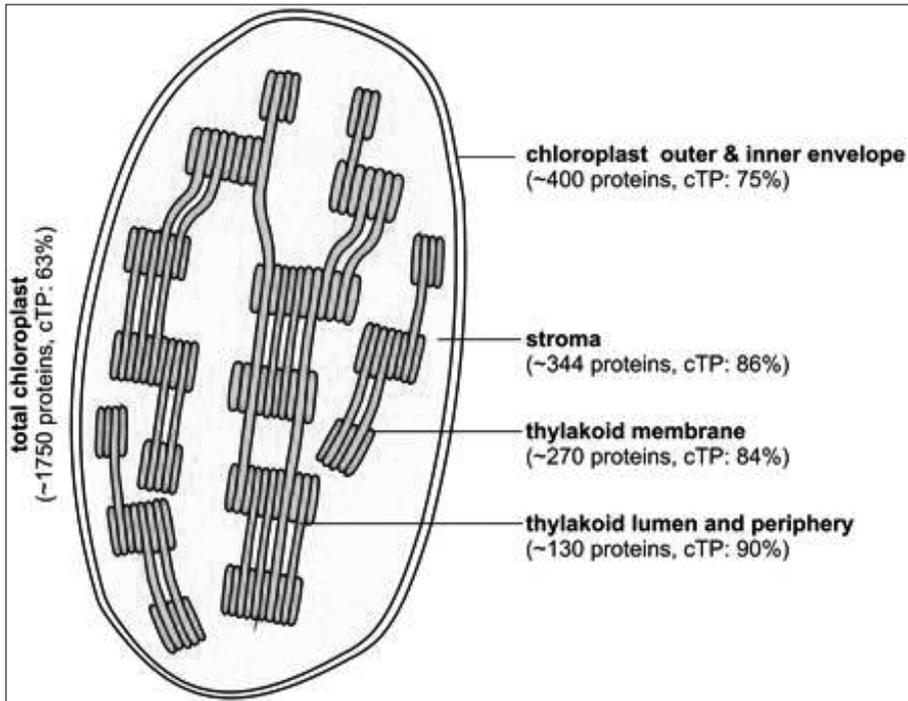


Fig. 3 *Proteine identificate del cloroplasto (Armbruster et al., 2011)*

diverse funzioni delle piante e ancora questo lavoro continua. Nel contempo il sequenziamento di genomi di vari organismi fotosintetici, l’ottenimento di grandi collezioni di mutanti inserzionali (T-DNA in *Arabidopsis thaliana* e trasposoni endogeni in *Zea mays*) hanno reso possibile lo studio delle funzioni delle piante a partire da un singolo gene di interesse (genetica inversa). È un fatto che molte funzioni del cloroplasto sono state chiarite tramite questa “reverse genetics”.

La proteomica del cloroplasto ha condotto a una caratterizzazione delle proteine appartenenti all’organello e a una migliore comprensione della loro dinamica. Sono stati realizzati in anni recenti molti studi di proteomica (Rutschow et al., 2008; Zybailov et al., 2008; Ferro et al., 2010) del cloroplasto ivi inclusi le analisi dei subproteomi dell’organello (stroma, membrane tilacoidali, membrana organellare, lume tilacoidale, plastoglobuli). Si ritiene che siano state identificate, a oggi, circa 1750 proteine nel cloroplasto. Con un po’ di approssimazione si può dire che queste proteine risultano equamente ripartite tra involucro plastidiale, membrana e lume tilacoidale, e stroma. La proteomica del cloroplasto è stata anche usata per caratterizzare modifi-

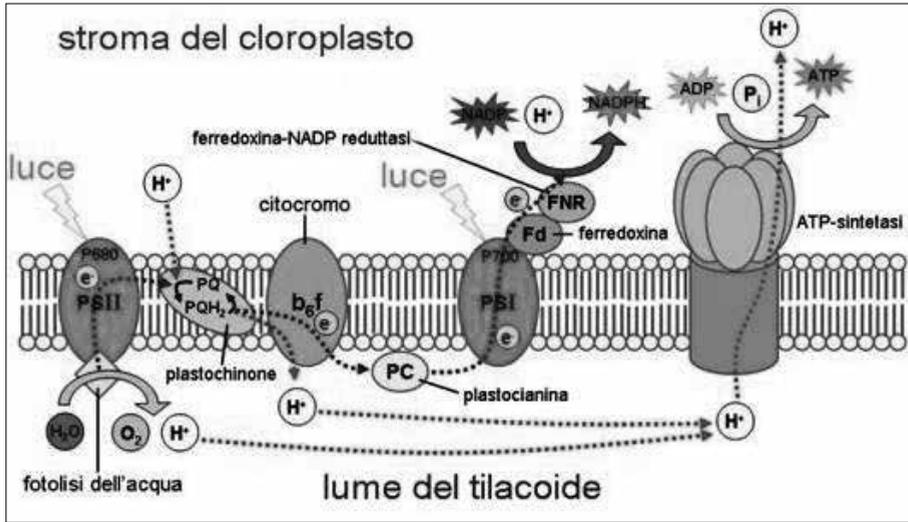


Fig. 4 *Complessi coinvolti nella fase luminosa della fotosintesi*

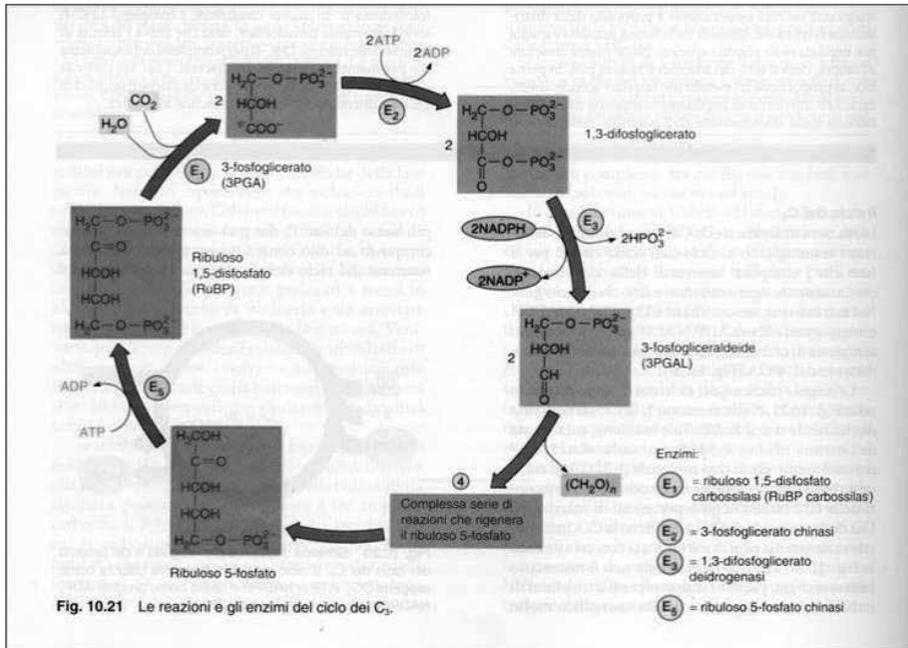


Fig. 5 *Ciclo di Calvin-Benson*

che post-traduzionali; infatti si sono recentemente identificati i substrati, che erano rimasti sconosciuti per molto tempo, di chinasi e fosfatasi cloroplastiche, mediante le analisi del fosfoproteoma organellare (Reiland et al., 2009). Le analisi sulle proteine del cloroplasto sono state anche confrontate con le analisi dei proteomi di altri plastidi quali ezioplasti, cromoplasti e proplastidi. Previsioni computazionali hanno indicato la presenza di circa 2500-3000 proteine nel cloroplasto. La localizzazione sub-organellare di alcune proteine è ancora incerta, per cui siamo sicuri solo per 1144 proteine perché la loro appartenenza si è basata anche sul cTP (chloroplast transit peptide).

Anche l'esame comparato di molti genomi (tra piante e altri organismi) ha consentito di procedere nelle nostre conoscenze circa il cloroplasto; per esempio è stata possibile l'identificazione di geni, specifici degli organismi fotosintetici dotati di cloroplasti, detti "GreenCut"; essi sono presenti nelle alghe verdi e nelle piante, mentre sono assenti nei funghi e negli animali. Molti di questi geni codificano per proteine cloroplastiche anche se spesso con funzioni ignote; averli identificati è stato comunque il passo iniziale per capirne il ruolo. Così è accaduto per il complesso NDH (complesso NAD(P)H deidrogenasi del fotosistema 1, fondamentale per la risposta delle piante agli stress ambientali), derivato dai cianobatteri endosimbionti, che è presente in tutte le specie vegetali ma assente in *Chlamydomonas reinhardtii*; di alcune subunità di questo complesso deve essere ancora definito il ruolo biochimico-fisiologico (Sirpio et al., 2009).

Avanzamenti conoscitivi dei processi fisiologici del cloroplasto

Ingresso nel cloroplasto senza "transit peptide"

Non tutte le proteine del cloroplasto possiedono un cTP (chloroplast transit peptide) che dovrà essere riconosciuto e poi eliminato; normalmente esse vengono sintetizzate nel citosol come precursori contenenti la presequenza che serve al trasporto post-traduzionale nell'organello, tramite l'azione dei trasloconi della membrana plastidiale (apparato Toc/Tic). Però talora, come accade per gran parte delle proteine della membrana esterna del cloroplasto, non esiste uno specifico cTP, ma la loro destinazione organellare è dovuta a informazione "intrinseca". In certi casi l'ingresso della proteina avviene diversamente: in *Arabidopsis* l'anidrasi carbonica (CAH1) contiene un peptide segnale N-terminale che dirige la proteina nello ER dove il polipeptide è N-glicosilato prima di essere indirizzato al cloroplasto. Questo meccanismo

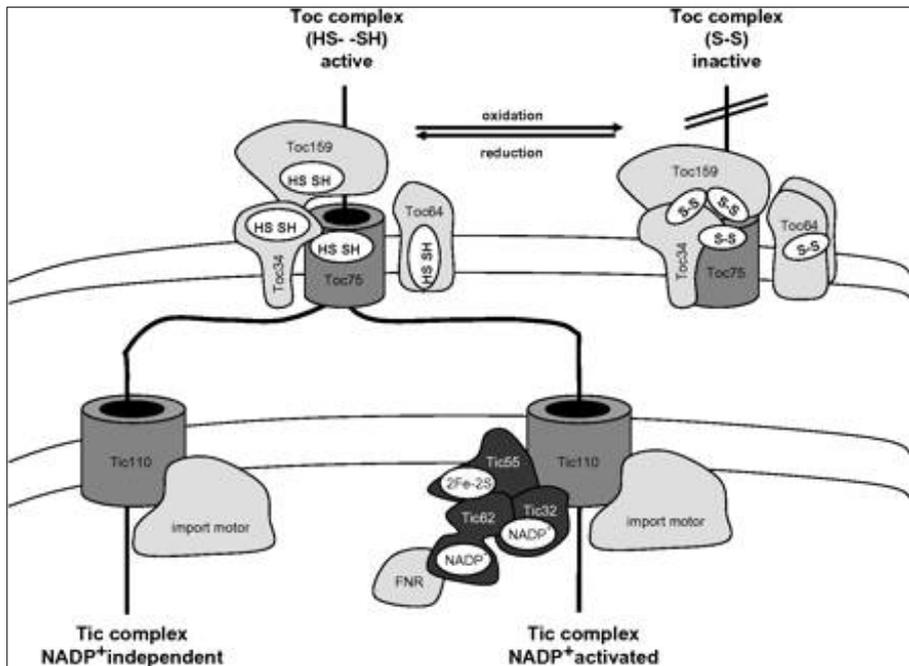


Fig. 6 *Regolazione redox del trasporto delle proteine nel cloroplasto (da: Stengel et al., 2009)*

viene considerato un residuo ancestrale, originatosi prima dell'evoluzione dell'attuale sistema dominante basato sui trasloconi Toc/Tic. Si stima che da un minimo di 10-15% a un massimo di 30%, le proteine del cloroplasto siano introdotte nell'organello tramite un sistema alternativo al meccanismo Toc/Tic (Armbruster et al., 2009).

Espressione dei geni del cloroplasto

I geni organellari si esprimono tramite l'intervento di proteine regolatrici che sono codificate dal nucleo e quindi esercitano un controllo "anterogrado". L'espressione dei geni del cloroplasto richiede la partecipazione di diverse famiglie di proteine regolatrici "RNA-binding" codificate dal nucleo. Tra di esse si includono le PPR (pentatricopeptide repeat), ciascuna delle quali si legherebbe a pochissimi trascritti plastidiali variabili da uno a tre (Yu et al., 2009). In questo lavoro si conclude che tale proteina regola l'"editing" del trascritto cloroplastico accD, fondamentale per la sintesi della acetyl-Co A carbossilasi, enzima della sintesi degli acidi grassi.

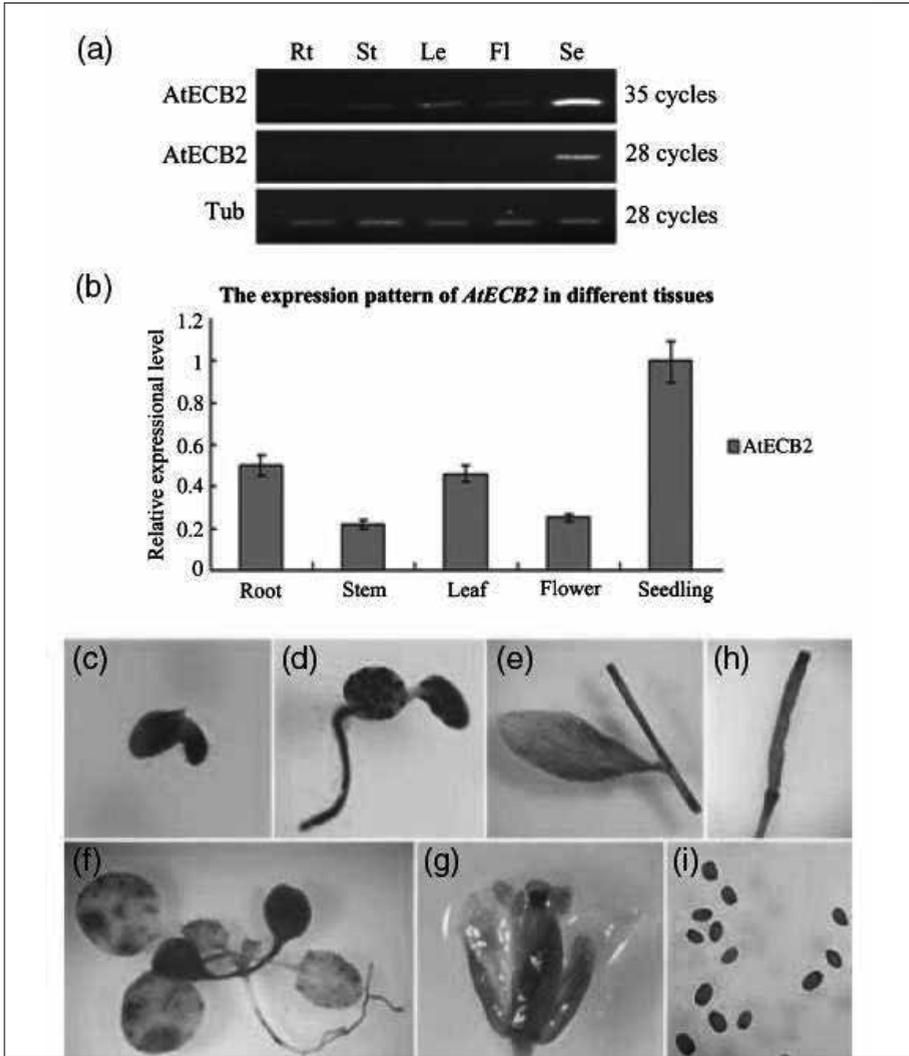


Fig. 7 Pattern di espressione dell'*AtECB2* in differenti tessuti di *Arabidopsis* (Yu et al., 2009). La proteina pentatricopeptide nella biogenesi del cloroplasto

Fotosintesi

Quenching non fotochimico

Le xantofille sono coinvolte nel “quenching” delle clorofille eccitate e delle ROS, proteggendo l'apparato fotosintetico dal danno ossidativo; pertanto

l'eccitazione energetica viene dissipata in maniera innocua sotto forma di calore. È il quenching non-fotochimico (NPQ) che viene misurato tramite la fluorescenza della clorofilla. Il ruolo delle xantofille è stato ulteriormente accertato tramite l'ottenimento di mutanti con ridotto NPQ; in tali mutanti sono state rinvenute modifiche negli enzimi del ciclo delle xantofille come la violaxantina deepossidasi e la zeaxantina epossidasi. In aggiunta alle xantofille anche la proteina PsbS (appartenente al gruppo delle proteine del LHC-light harvesting complex-) partecipa al NPQ nelle piante superiori (Li et al., 2000).

Novità nel metabolismo dei cloroplasti

Molti passi avanti sono stati fatti nella conoscenza della regolazione dei processi metabolici organellari.

– Tetrapirroli e carotenoidi

Tutti i principali comparti del cloroplasto – membrana, tilacoide e stroma – sono coinvolti nella sintesi e degradazione delle clorofille. Tutte le reazioni che portano alla sintesi del protoporfirino IX avvengono nello stroma, mentre le successive modifiche sono associate alle membrane del cloroplasto e del tilacoide. Confermerebbero questa distribuzione delle attività, alcune analisi proteomiche che hanno rinvenuto proteine della degradazione della clorofilla in tutti e tre i comparti.

Enzimi del ciclo delle xantofille, violaxantina deepossidasi (VDE) e zeaxantina epossidasi (ZEP), sono localizzati nel tilacoide. ZEP catalizza la sintesi di violaxantina che, oltre a funzionare da pigmento fotosintetico, serve come precursore C_{40} per la sintesi dell'acido abscissico; è interessante notare che la ZEP è localizzata anche nella membrana del cloroplasto (Joyard et al., 2009). Ciò implica che la sintesi delle xantofille e la sintesi dei precursori dell'ABA, a partire dalla zeaxantina, siano spazialmente separati e che, probabilmente, le due pathway non interagiscono. Conseguentemente potrebbe essere messa in discussione l'ipotesi che la sintesi dell'ABA sia regolata dalla disponibilità dei suoi precursori provenienti dal ciclo delle xantofille.

– Biosintesi dei galattolipidi

Le membrane plastidiali contengono elevati livelli di galattoglicerolipidi (monogalattosildiacilglicerolo-MGDG e digalattosildiacilglicerolo-

DGDG entrambi sintetizzati nel cloroplasto). Lo MGDG si forma per azione della MGDG sintasi, che trasferisce il galattosio dall'UDP galattosio al diacilglicerolo ed è localizzata nella membrana plastidiale; l'isoforma MGD1, la maggiore, è fondamentale per la biogenesi del tilacoide. Siccome recenti lavori hanno dimostrato che questo enzima è attivato allostericamente, da acido fosfatidico e da fosfatidilglicerolo, si ritiene che esso rappresenti un punto regolatorio chiave tra la sintesi dei fosfolipidi e dei galattolipidi nelle piante. Nella membrana ci sono anche due DGDG sintasi; i mutanti *mgd1* e *dgd1* sono caratterizzati da livelli fotosintetici molto bassi. Una funzione dei MGDG nel processo della fotosintesi è stato recentemente scoperto: promuoverebbero la de-epossidazione della xantofilla violaxantina che rappresenta un passaggio fondamentale della protezione da eccesso di energia luminosa (Schaller et al., 2010).

– Biosintesi e degradazione dell'amido

La sintesi dell'amido comincia con la conversione del glucosio-1-fosfato in ADP-glucosio, catalizzata dall'enzima AGPasi (ADP-glucosio pirofosforilasi); l'ADP-glucosio viene quindi usato sia dall'amido sintasi che dall'enzima ramificante per allungare le catene di glucano (polimeri di glucosio) nel granulo di amido. È ormai chiaro che l'attività dell'AGPasi è accoppiata allo stato redox del cloroplasto, principalmente determinato dalle tioredossine. Infatti sin dal 2000 si sapeva che le tioredossine f e m sono capaci di attivare la AGPasi; nel 2005 Geigenberger ha confermato che questa azione si effettua tramite la riduzione dei ponti disolfuro secondo il seguente schema: si riduce la ferredossina, quindi i gruppi riducenti vengono trasferiti mediante la ferredossina:tioredossina riduttasi alle tioredossine f e m che reagiscono con i loro target. Sempre in quel periodo si è visto che l'AGPasi viene regolata dalla NADP-tioredossina riduttasi C, un enzima scoperto in *Arabidopsis thaliana* e nel riso (Serrato et al., 2004) e, sorprendentemente, localizzato nel cloroplasto. Questo enzima può utilizzare il NADPH, generato dal metabolismo, anziché la ferredossina fotoridotta, per la riduzione di proteine target. Pertanto la modulazione dell'AGPasi da parte della NTRC può rappresentare un mezzo di regolazione di sintesi dell'amido nell'amiloplasto, organello non-fotosintetico. Durante la degradazione dell'amido, l'amilopectina verrebbe attaccata da varie glucano-idrolasi. Se si interviene con mutazioni sul trasportatore del maltosio, originato dalla degradazione, o sull'enzima disproporzionante, che trasferisce unità di maltosio tra glucani diversi, si ottiene un accumulo di maltosio e di maltosio-oligosaccaridi (maltotriosio) all'interno del clo-

roplasto. Questo accumulo è interpretato come un segnale “retrogrado” (dall’organello al nucleo) che fa iniziare la degradazione del cloroplasto tramite un processo autofagico (Stettler, 2009).

Segnali dal plastidio al nucleo

Il cloroplasto contiene molte proteine che, a larga maggioranza, sono codificate nel nucleo; il fatto comporta un dialogo continuo tra organello e nucleo. L’acertamento dell’esistenza di “retrograde signalling” (segnale in direzione contraria) sosterebbe l’ipotesi che si possa regolare l’espressione dei geni nucleari a seconda della necessità del plastidio, per esempio per assicurare un efficiente assemblaggio dei complessi multiproteici fatti da subunità plastidiali e nucleari. Tali segnali si pensa che provengano da vari processi quali: a) biosintesi dei tetrapirroli b) espressione di geni plastidiali c) stato redox organellare 4) ROS.

– Il caso della Mg-protoporfirina IX

Alcuni studi sul “signalling” plastidiale sono stati fatti su mutanti di *Arabidopsis* detti “*genomes uncoupled*” (*gun*). In questi mutanti, anche se i cloroplasti sono “photobleached” tramite il trattamento con l’erbicida “norflurazone”, continua l’espressione dei geni nucleari codificanti per proteine cloroplastiche come Lhcb1 o la sub-unità piccola della Rubisco, contrariamente a quanto avviene nel tipo selvatico. Più recentemente (Moulin et al., 2008) si è concluso che nei mutanti *gun*, difettosi nella sintesi del tetrapirrolo come ad es. la Mg-proto IX, si ottiene un aumento nella capacità di espressione di certi geni cloroplastici, se trattati con norflurazone. Di questo fatto non c’è una precisa spiegazione, ma si potrebbe supporre che la diminuita sintesi di clorofilla possa rendere questi mutanti più resistenti allo stress foto-ossidativo e ciò potrebbe portare a una modifica del signaling plastidiale.

– Cosa accade nel nucleo?

Il concetto di signaling plastidiale comporta che a seguito del segnale “retrogrado” avverrebbe una profonda modifica dell’espressione dei geni nucleari. Le analisi trascrittomiche fatte in *A. thaliana* confermerebbero il controllo sui geni nucleari codificanti proteine plastidiali, inclusa la presenza di un “interruttore principale” (master switch) che agirebbe in modo binario, inducendo o reprimendo un gruppo elevato di geni. Di tale interruttore farebbe parte il fattore di trascrizione ABI4, appartenente al tipo AP-2; ABI4 e GUN1 agirebbero nella stessa pathway di signaling.

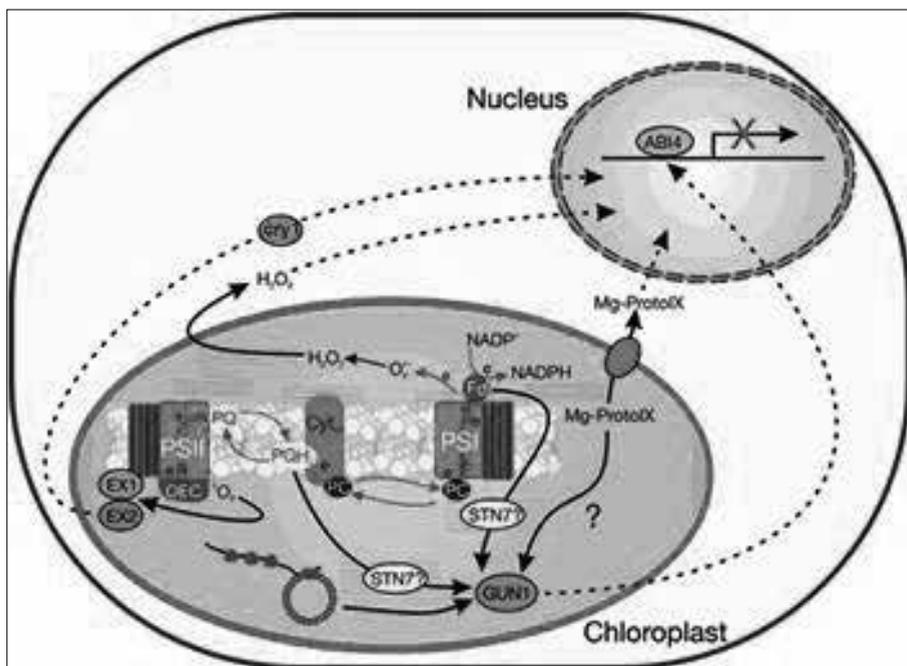


Fig. 8 *Segnale retrogrado* (Strand, 2011)

Alcune nuove tendenze della ricerca nel cloroplasto

Regolazione redox

Una promettente area di ricerca, nella quale si sono concentrate molte attenzioni, riguarda la regolazione redox delle funzioni del cloroplasto, rendendo necessaria l'individuazione di "marker" redox e di sensori *in vivo* nel cloroplasto (Dietz, 2008).

– Modificazioni post-traduzionali

Le modifiche post-traduzionali di proteine del tilacoide basate sulla fosforilazione sono ben caratterizzate nei cloroplasti (Pesaresi et al., 2010); negli ultimi anni è emerso come meccanismo rilevante la S-nitrosilazione delle proteine; esso è anche un meccanismo per la trasduzione della bioattività dell'ossido nitrico. Più recentemente si è accertata la S-glutationilazione come forma principale di S-tiolazione nelle cellule; essa risulterebbe dalla combinazione di un SH della proteina con un glutatione. Questo evento si riscontra negli stress ossidativi per proteggere i residui cisteinici, modulan-

do le attività proteiche. molte proteine del cloroplasto sono glutationilate, inclusa la tioredossina f durante il signaling redox. Analisi proteomiche in *Chlamydomonas reinhardtii* hanno portato alla identificazione di 25 target della glutationilazione, soprattutto all'interno del cloroplasto; si conclude che questa modifica post-traduzionale interviene nella regolazione di molti processi (Michelet et al., 2005). Pertanto molte novità ci si possono attendere da studi condotti sulla S-nitrosilazione e sulla glutationilazione delle proteine cloroplastiche.

– Cloroplasti modificati

Un processo importante del cloroplasto e che può essere modificato è la fotorespirazione che deriva dalla reazione ossigenasica della Rubisco; si completa attraverso reazioni che interessano i cloroplasti, i perossisomi e i mitocondri. Nei cloroplasti di *A. thaliana* è stata introdotta la via catabolica del glicolato ottenuta da *Escherichia coli* (Kebeish et al., 2007) per ridurre le perdite di carbonio e di azoto fissato, come accade tipicamente nelle C_3 a seguito dell'uso fotorespiratorio del fosfoglicolato. L'intervento transgenico ha condotto a una maggior biomassa; pertanto il risultato incoraggia la manipolazione di fotorespirazione e fotosintesi per aumentare la produzione di molte piante coltivate.

CROMOPLASTO

I cromoplasti sintetizzano caroteni (pigmenti di colore arancione) e xantofille (di colore giallo) e diversi altri pigmenti anche di colore rosso. Comunque nei cromoplasti i pigmenti sono sempre rappresentati da carotenoidi mentre nei vacuoli si rinvengono antocianine e altri flavonoidi. Questi organelli sono funzionalmente diversi dai gerontoplasti tipici delle foglie senescenti e derivati dai cloroplasti, ma nei quali non avviene sintesi *ex-novo* di carotenoidi, ma semplicemente il loro mantenimento. Inizialmente i plastidi "senescenti" furono chiamati da Matile "gerontosomi" e furono caratterizzati anche per la forte perdita di DNA plastidiale (Matile, 2000). Il colore di molti frutti e fiori, ma anche di qualche radice (carota) e tubero (patata dolce) è dovuto all'accumulo nei loro tessuti di carotenoidi, idrocarburi con 40 atomi di carbonio. La pigmentazione giallo-arancio tipica dei fiori del narciso, della scorza degli agrumi o della carota, è dovuta a essi, ma è un carotenoide anche il licopene responsabile della colorazione rossa del frutto del pomodoro e del peperone. Questi colori, anche molto accesi e brillanti, si pensa che siano indispensabili

per richiamare animali e, quindi, favorire l'impollinazione e la dispersione dei semi. I cromoplasti possiedono DNA, ma i geni che presiedono alla sintesi dei pigmenti risiedono nel nucleo. Una volta sintetizzati, i pigmenti si depositano, in forma di minutissime gocce, nello stroma plastidiale; si possono comunque rinvenire sotto forma di inclusioni cristalline. I cromoplasti contengono i plastoglobuli; quest'ultimi possono contenere i pigmenti e anche i chinoni.

In virtù del fatto che contengono i pigmenti responsabili del colore di fiori e frutti, i cromoplasti sono i plastidi non fotosintetici che maggiormente hanno suscitato l'interesse nei ricercatori. Siccome i carotenoidi rappresentano la maggioranza dei pigmenti organellari, molti studi di biochimica e biologia molecolare del cromoplasto sono dedicati alla loro formazione. La funzione di questi organelli risulta comunque complessa e non solo dovuta alla presenza dei carotenoidi; recenti approcci proteomici e trascrittomici ne hanno dato ampia conferma (Siddique et al., 2006). Mentre i cloroplasti utilizzano l'energia fornita dalla reazione luminosa della fotosintesi per sintetizzare gli zuccheri fosfati, i cromoplasti – non fotosintetici – importano dal citosol questi stessi zuccheri e l'ATP necessari per il loro metabolismo. Comunque le funzioni metaboliche dei vari plastidi non sono del tutto accertate. Vari studi del passato hanno chiarito eventi biochimici e strutturali durante la differenziazione del cromoplasto, ma solo recentemente si sono ottenute nuove informazioni mediante l'uso delle tecniche "highthroughput"; un metodo che può aiutare in questa direzione è l'approccio proteomico che, nei plastidi non fotosintetici è addirittura favorito. Infatti in essi non si trova la massiccia presenza delle proteine fotosintetiche tipica dei cloroplasti e quindi l'analisi proteomica può portare più facilmente alla identificazione di proteine caratterizzanti specifiche attività organellari.

Uno dei più recenti "updating" circa lo stato attuale delle conoscenze sul cromoplasto è offerto dall'articolo di Egea et al. (2010). La morfologia del cromoplasto è molto variabile soprattutto per la varietà di strutture contenenti i carotenoidi. Si ritrovano "corpi" globulari, tubulari, reticolo-globulari, membranosi e cristallini. Per fare solo alcuni esempi si possono citare quei cromoplasti che accumulano carotenoidi, sotto forma di grossi cristalli, all'interno dei "lumen" di strutture tilacoide-simili (come accade nelle radici di carota); oppure, come si osserva nei frutti di peperone rosso, i cromoplasti contengono un elevato numero di globuli ed estensioni fibrillari contenenti carotenoidi e tocoferoli circondati da uno strato di lipidi polari a loro volta racchiusi da una plastoglobulina chiamata fibrillina.

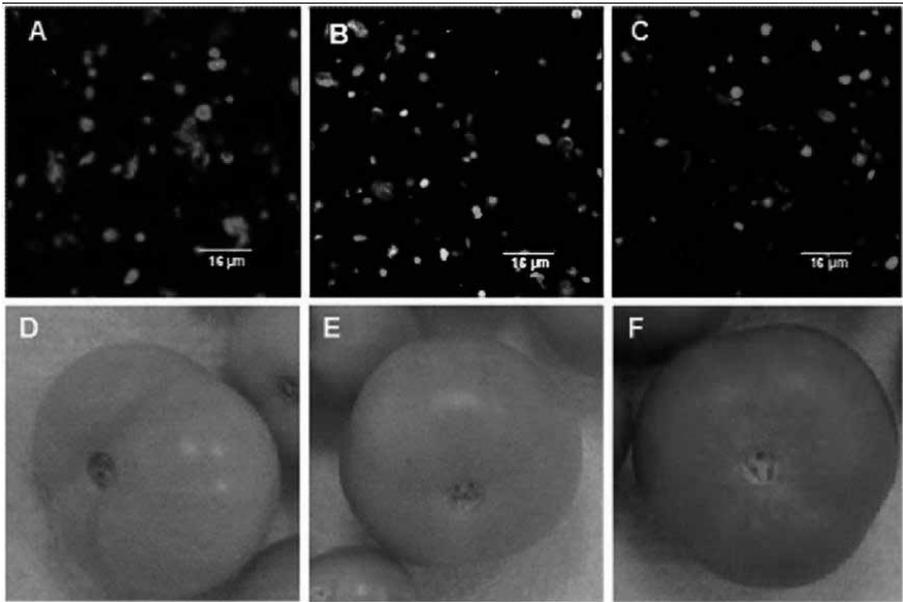


Fig. 9 Immagini confocali di cloroplasti (A), di cloroplasti che iniziano la transizione (B) e cromoplasti maturi (C) (Egea et al., 2010)

È accertata un'origine dei cromoplasti dai cloroplasti; tramite impiego del microscopio confocale e della GFP (green-fluorescent protein) si è potuto osservare che i cromoplasti sono più piccoli dei cloroplasti dai quali derivano.

D'altra parte è noto che alcune forme plastidiali possano generarsi da plastidi pre-esistenti. La conversione più nota è il passaggio da proplastidi a cloroplasti che avviene sotto il controllo della luce; anche i cromoplasti possono originarsi dai proplastidi (come avviene nelle radici di carota), dai cloroplasti (nei frutti in via di maturazione) o dagli amiloplasti (nei fiori di zafferano). Vari studi di microscopia elettronica hanno, già da tempo, messo in evidenza come, nel frutto del peperone rosso, avvenisse una profonda "ristrutturazione" del sistema di membrane interne del cloroplasto durante la formazione del cromoplasto, avente origine con la lisi dei grana e dei tilacoidi intergranali. Nel contempo si osservava la formazione di nuove membrane e, dati recenti, confermano che su queste membrane si accumulano i cristalli dei carotenoidi; le nuove membrane non derivano dai tilacoidi, ma da vescicole generate dalle membrane interne. Un dato interessante, ottenuto studiando la maturazione del frutto di pomodoro, è la forte riduzione della proteina MFP1 (thylakoid-associated DNA-binding protein) di cui si suppone la partecipazione nello sviluppo della membrana tilacoidale.

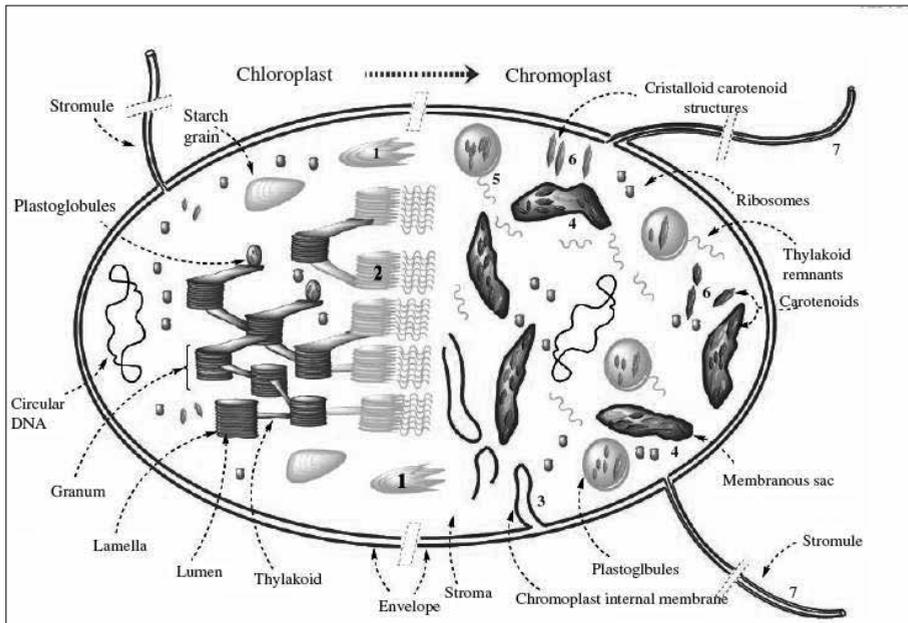


Fig. 10 *Rappresentazione schematica della transizione cloroplasto/cromoplasto (Egea et al., 2010). Si osserva la degradazione dei grani di amido (1), dei grana e del tilacoide (2); la sintesi di nuove invaginazioni della membrana interna dell'involucro plastidiale (3) che conduce alla formazione di sacche membranose arricchite in carotenoidi; l'aumento in numero e dimensione dei plastoglobuli; la comparsa di cristalloidi contenenti carotenoidi; l'aumento delle estroflessioni tubulari dell'involucro, dette stromuli*

Comunque, nonostante che l'ipotesi dell'origine del cromoplasto dal cloroplasto sia stata formulata da tempo, non era mai stata presentata una chiara dimostrazione, in un plastidio in transizione, della fluorescenza della clorofilla e dei carotenoidi rilevata mediante microscopio confocale. Questo dato mancante è stato ottenuto recentemente dallo stesso gruppo di ricercatori (Egea et al., 2011).

Ruolo dei plastoglobuli nell'accumulo dei carotenoidi

Durante la transizione cloroplasto-cromoplasto si osserva generalmente un aumento in dimensione e numero dei plastoglobuli. Le plastoglobuline (fibrilline) – proteine strutturali conosciute come proteine associate ai lipidi del plastidio – ricoprono, insieme agli enzimi del metabolismo lipidico, i plastoglobuli; esse partecipano anche al sequestro dei carotenoidi e alla biogenesi

del cromoplasto. Infatti i plastoglobuli non sono solo corpi contenenti lipidi, ma partecipano ad alcune vie metaboliche: il proteoma dei plastoglobuli di peperone rosso contiene diverse proteine coinvolte nella sintesi dei carotenoidi (zeta-carotene desaturasi; licopene beta-ciclastasi, beta-carotene beta-idrossilasi). La zeta-carotene desaturasi è stata rinvenuta anche in cromoplasti di pomodoro.

Variazione nella morfologia degli “stromuli” durante la genesi del cromoplasto

Gli stromuli sono protrusioni della membrana del plastidio nel citoplasma. Nel pomodoro, durante la maturazione del frutto, il numero e la lunghezza degli stromuli aumenta, almeno nelle parti più interne del mesocarpo, probabilmente per favorire un più elevato trasporto di proteine per la sintesi dei carotenoidi e per il differenziamento del cromoplasto.

Caratteristiche e stabilità del genoma plastidiale durante il differenziamento in cromoplasti

L'analisi comparata, realizzata mediante enzimi di restrizione, su DNA di cloroplasti fogliari e di cromoplasti di frutto in pomodoro, hanno rivelato l'assenza di importanti modifiche; si sono ipotizzate piccole variazioni del DNA, come l'aumento di metilazione nella citosina, ma le evidenze sperimentali sono state contraddittorie e quindi il loro ruolo nella transizione plastidiale rimane incerto.

Importanza dell'attività trascrizionale e traduzionale durante il differenziamento del plastidio

Il “pattern” di espressione di geni localizzati nel plastidio è stato studiato durante la formazione del cromoplasto con il risultato che, mentre i geni coinvolti in attività fotosintetiche apparivano “down-regolati”, i geni coinvolti nella biosintesi dei carotenoidi – tipo la licopene-beta-ciclastasi (CYC-B) – sembrerebbero up-regolati (dato confermato in frutti di agrumi e di papaya, in radice di carota, ecc.). Però studi comparativi rigorosi, condotti mediante tecnica trascrittomica, non hanno manifestato grandi variazioni tra cloroplasto e cromoplasto (Kahlau e Bock, 2008). D'altra parte la larga maggioranza

delle proteine presenti nel plastidio è codificata da geni nucleari per cui oltre all'attività trascrizionale del nucleo ci deve essere un successivo trasporto delle proteine nel plastidio, dove viene organizzata l'attività metabolica del cromoplasto. Infatti nel proteoma del cromoplasto sono rinvenute proteine per la sintesi di zuccheri, di amido, degli acidi grassi, degli aminoacidi, dei carotenoidi, delle vitamine (riboflavina, acido folico, tocoferoli), di ormoni e di sostanze aromatiche volatili.

*Geni coinvolti nel differenziamento dei cromoplasti
e nello sviluppo di strutture per l'accumulo di carotenoidi*

Nella pubblicazione di Lu et al. (2006) c'è la prima dimostrazione di un gene coinvolto nel differenziamento del cromoplasto; si tratta del gene *Or* del cavolfiore. La mutazione *Orange (Or)* conferisce l'accumulo di alti livelli di beta-carotene in vari tessuti normalmente privi di tale pigmento. Il ruolo funzionale di *Or* sarebbe associato a processi cellulari che attivano il differenziamento dei proplastidi in cromoplasti. Quando il gene *Or* è stato trasferito, come transgene, nella patata, ha indotto nel tubero un forte accumulo di carotenoidi, ma senza influenzare l'espressione dei geni codificanti per la biosintesi dei carotenoidi; pertanto il suo ruolo sarebbe quello di creare un "sink" metabolico (il cromoplasto) nel quale si accumulano i carotenoidi.

Attività metabolica dei cromoplasti

Nella transizione cloroplasto-cromoplasto si assiste alla flessione della clorofilla, delle attività fotosintetiche e all'accumulo di carotenoidi, ma, come già detto, nel cromoplasto si svolgono comunque attività metaboliche. Per quanto concerne gli zuccheri necessari alle attività biosintetiche l'origine può essere duplice: possono derivare dall'interno del plastidio oppure, e soprattutto, dal citosol, grazie a un trasportatore plastidiale del glucosio. Le proteine per la sintesi e la degradazione dell'amido sono state rinvenute nei cromoplasti dei frutti di pomodoro e quindi rimarrebbero durante la transizione. Molti enzimi del ciclo di Calvin sono presenti e attivi.

In essi c'è anche un sistema antiossidante molto attivo. Infatti in cromoplasti isolati di peperone si è rilevato una elevata quantità di glutatione e di ascorbato e alti livelli di enzimi del ciclo ascorbato-glutatione e della superossido dismutasi. Questa alta attività del sistema antiossidante potrebbe funzio-

nare sia per proteggere contro l'ossidazione componenti come i carotenoidi, ma anche nella mediazione del "signalling" tra cromoplasti e nucleo. Le ROS generate nei plastidi up-regolerebbero la trascrizione dei geni di biosintesi dei carotenoidi (Bouvier et al., 1998).

Differenziamento reversibile dei cromoplasti

Sono conosciute varie situazioni nelle quali tessuti colorati tornano a essere verdi come conseguenza del differenziamento dei gerontoplasti, ezioplasti e cromoplasti in cloroplasti. Nel caso dei cromoplasti il miglior esempio è offerto dai frutti degli agrumi, ma si conosce il fenomeno anche nelle cucurbitacee (Preberg et al., 2008). Mentre i frutti si inverdiscono nuovamente, nei cromoplasti spariscono molti plastoglobuli e si formano nuovi tilacoidi da vescicole preesistenti e da invaginazioni della membrana interna, ricostituendo una normale struttura cloroplastica e ripristinando l'attività fotosintetica. Il fattore ambientale che, probabilmente, ha un ruolo preponderante in questo processo, è la luce, ma anche il livello nutrizionale (azoto) può avere una influenza. Anche le temperature più elevate o le gibberelline possono favorire il re-inverdimento della scorza (esocarpo o flavedo dell'esperidio) del frutto degli agrumi, mentre un'abbondanza di saccarosio tende a inibire questo processo. Sul re-inverdimento non c'è accurata descrizione biochimica, ma si sa che l'acido gibberellico riduce l'espressione dei geni per la biosintesi dei carotenoidi (fitoene sintasi, fitoene desaturasi ecc.) e anche l'espressione di geni che presiedono alla degradazione della clorofilla (feoformidi a ossigenasi). Scarsa informazione, al momento, è disponibile circa gli effetti sull'espressione dei geni per la biosintesi dei fotosistemi e della clorofilla.

Mutanti per la formazione del cromoplasto

La scoperta del mutante *or* del cavolfiore ha consentito l'isolamento di un gene che controlla il differenziamento del cromoplasto. Anche alcuni mutanti di pomodoro consentono di identificare le componenti molecolari coinvolte nella biogenesi del cromoplasto. È il caso dei mutanti *hp1*, *hp2* e *suffulta*. Anche gli ormoni giocano un ruolo importante nel controllo della transizione cloroplasto/cromoplasto; è ben noto che in mutanti o linee trasgeniche, danneggiate in elementi della trasduzione del segnale dell'etilene, come nel caso del mutante *never-ripe*, la pigmentazione risulta modificata.

Queste e molte altre mutazioni, indicano che la formazione del cromoplasto è un evento complesso che coinvolge non solo fattori espressi durante la maturazione, ma anche fattori che riguardano più in generale lo sviluppo e gli ormoni come auxine, citochinine, ABA ed etilene.

Prospettive

In virtù di analisi quanti-qualitative, tramite tecnologie di spettrometria di massa, si è arrivati ad assegnare al cromoplasto un numero di proteine comparabile a quello del cloroplasto.

Per la ricerca futura sembra di particolare importanza la descrizione della fosforilazione, come di altri tipi di modificazione proteica, possibile tramite approccio proteomico, che può fornire indicazioni circa la regolazione di attività metaboliche plastidiali durante la transizione cloroplasto/cromoplasto.

Un'altra area di incertezza è rappresentata dal ruolo degli ormoni nella regolazione del differenziamento plastidiale il cui meccanismo di base rimane poco chiaro, incluso il cross-talk ormonale.

È generalmente condiviso il concetto che l'espressione di molti geni, codificanti proteine destinate al plastidio, sia regolata attraverso un "dialogo" tra nucleo e plastidio. I segnali ambientali (come luce, temperatura ecc.) o di sviluppo, comprenderebbero le ROS, i carotenoidi, i carboidrati, gli ormoni. D'altra parte che esista un dialogo nucleo-plastidio è dimostrato dall'uso della "tagetitoxin", specifico inibitore della RNA polimerasi plastidiale, e della lincomicina, inibitore specifico della peptidil-transferasi plastidiale, nei cloroplasti con il risultato della riduzione dell'accumulo dei trascritti nucleari destinati al plastidio.

Rimane da accertare se questi segnali siano attivi in plastidi non fotosintetici, come i cromoplasti. Finché questo risultato non sarà ottenuto, il controllo da parte nostra dei processi di sviluppo come formazione del fiore e maturazione dei frutti, rimarrà assai problematico.

AMILOPLASTO

Gran parte delle considerazioni che vengono fatte di seguito sugli amiloplasti, derivano da una interessante rassegna che su questo argomento è stata pubblicata qualche anno fa (Balmer et al., 2006b). Sebbene questi organelli siano ritenuti, da diversi decenni, la sede della sintesi e di accumulo di amido nei

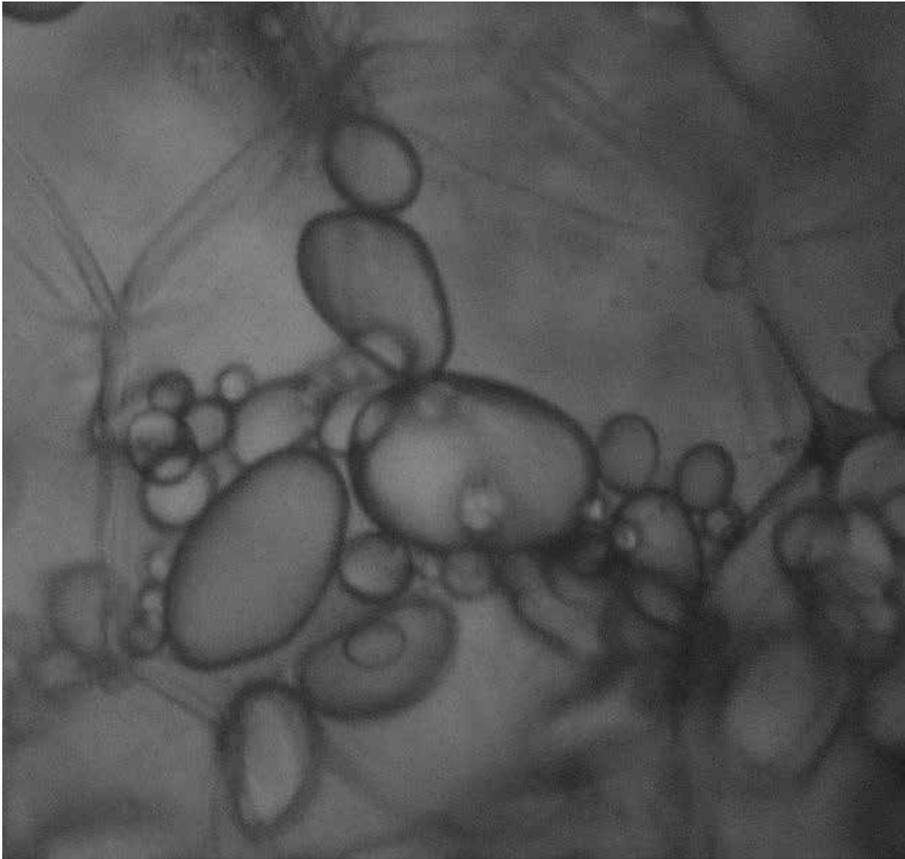


Fig. 11 *Amyloplasti di patata «Solanum tuberosum»*

tessuti eterotrofi delle piante, le nostre conoscenze su di essi rimangono frammentarie; cioè, oltre alla sintesi e degradazione dell'amido, tutte le altre attività biochimiche sono poco conosciute. D'altra parte, mentre nel cloroplasto l'amido è prodotto transitoriamente durante il giorno e degradato durante la notte, l'amiloplasto è la sede di accumulo di enormi quantità di questo carboidrato di riserva.

Gli studi di proteomica del cloroplasto sono molto progrediti, come detto, mentre la stessa cosa non si può dire per gli amiloplasti; il motivo principale per questa carenza di informazioni risiede nella particolare fragilità di questo organello difficile da isolare, perché i densi grani di amido tendono a forare la membrana organellare durante la procedura di isolamento. Come per tutti i plastidi, anche per l'amiloplasto la larga maggioranza delle sue proteine sono codificate dal nucleo e importate dal nucleo nell'organello tramite il ricono-

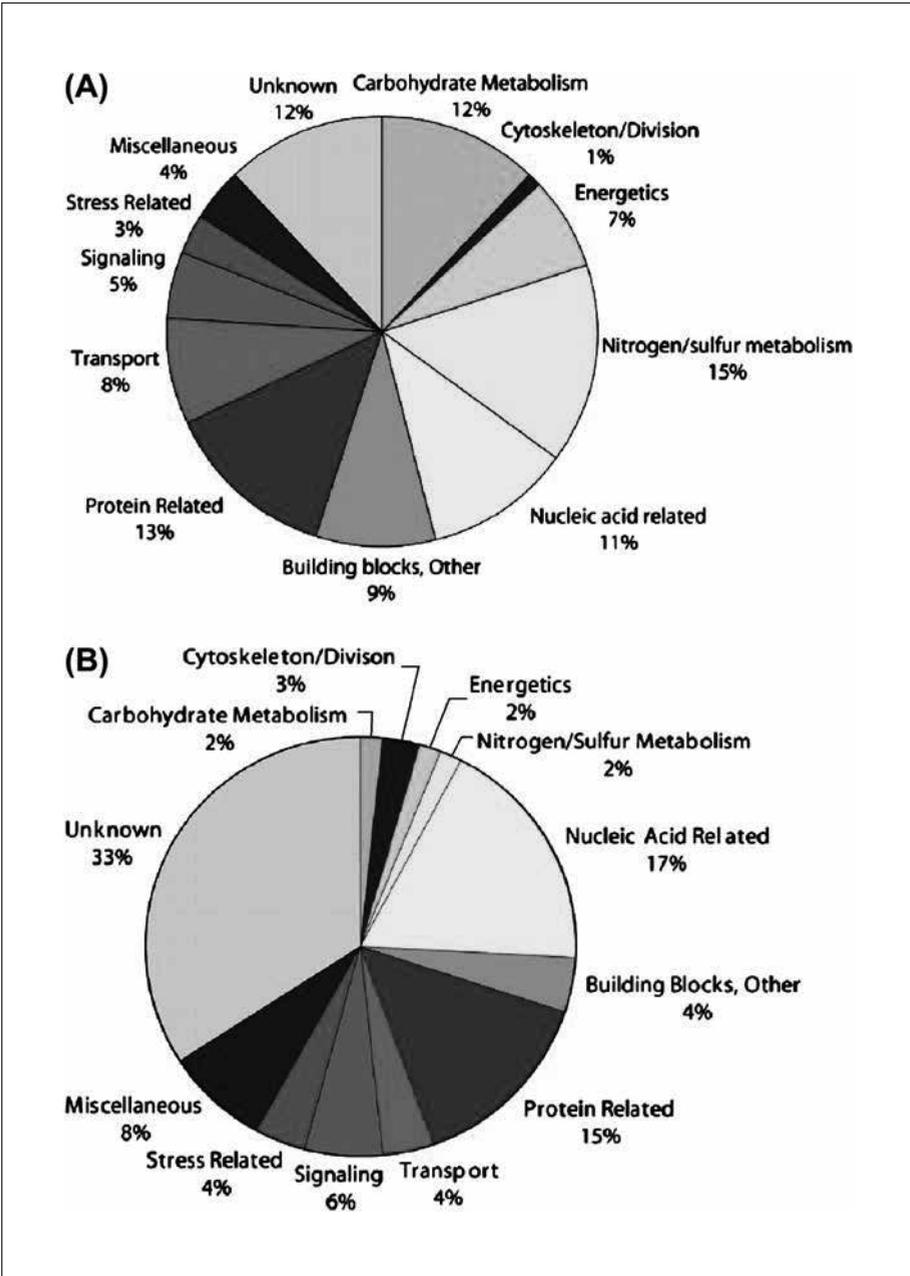


Fig. 12 Distribuzione funzionale di proteine in (A) amiloplasti di endosperma di grano (Balmer et al., 2006) e in (B) cloroplasti di «*A. thaliana* e *Zea mays*» (Friso et al., 2004)

scimento del “transit peptide”. Tuttavia potrebbero esserci delle differenze tra cloroplasto e amiloplasto; ad esempio nell’amiloplasto dovrebbe essere assente il tilacoide, ma nel suo stroma sono presenti varie vescicole e altre strutture membranose, per entrare nelle quali non si conosce il tipo di segnale di riconoscimento (Stensballe et al., 2008).

In un lavoro di analisi proteomica dell’amiloplasto di giovani carioidi di frumento (Andon et al., 2002) si riportava che il 24% delle proteine rinvenute appartenevano alla sintesi e accumulo dell’amido, 23% al metabolismo energetico, il 14% a fattori di trascrizione, recettori, proteine del “signaling”, proteine correlate alla difesa, ma ben 39% risultavano sconosciute su di un totale di 171 proteine identificate. Dovuto anche alle analogie con il cloroplasto si è pensato che le funzioni metaboliche di questo plastidio fossero più ampie di quanto descritto. Pertanto è stata effettuata una nuova indagine proteomica, riportata nella pubblicazione di Balmer et. al. precedentemente citata, e che descrive 289 proteine identificate da amiloplasti isolati; il 50 % di esse appartiene a funzioni metaboliche varie o fa parte del novero delle proteine di risposta allo stress. Molte proteine hanno attività enzimatica riportabile al metabolismo degli aminoacidi, degli acidi nucleici e dello zolfo. Le proteine sono state raggruppate nelle seguenti 10 maggiori categorie, a loro volta ulteriormente suddivisibili, come riportato: metabolismo dei carboidrati (amido, glicolisi, via del pentoso fosfato, ciclo dell’acido citrico), citoscheletro, metabolismo energetico (ATP/PP sintesi/trasformazione, trasporto elettronico), metabolismo dell’azoto/zolfo (amminoacidi, assimilazione dello zolfo), proteine correlate agli acidi nucleici (DNA/RNA, biosintesi nucleotidi), signaling (ormoni, fosforilazione, GTP), metabolismo proteico (folding, turnover, accumulo), proteine dello stress (legate a gruppi tiolici, legate ad acido ascorbico), proteine delle principali vie metaboliche (isoprenoidi, tetrapirroli, vitamine/cofattori, metabolismo lipidico), miscelanea e sconosciute.

Metabolismo dei carboidrati

Tra tutte le attività biochimiche dell’amiloplasto, la biosintesi dell’amido è in genere considerata l’attività principale, poiché il grano di amido finisce per occupare gran parte del volume organellare; coerentemente gli enzimi della biosintesi dell’amido sono stati identificati all’interno di esso. Semmai la sorpresa è stata l’identificazione di enzimi che presiedono alla degradazione e al riarrangiamento dell’amido, come l’alfa-1,4 glucano fosforilasi, oppure gli enzimi glicolitici, quelli della via del pentoso fosfato o della “malate valve”. Ciò suggerisce che una parte significativa del carbonio importato dall’amiloplasto viene

indirizzata alla produzione di potere riducente e di ATP per dare supporto alle numerose attività di biosintesi che hanno luogo nell'organello. Quindi, quanto meno nelle giovani cariossidi analizzate in questo studio (10 giorni dopo l'anestesi), i plastidi catalizzano, oltre alla biosintesi dell'amido, molti altri processi.

Citoscheletro

Il meccanismo molecolare di divisione dei plastidi è derivato dai batteri endosimbionti; comunque, mentre nei batteri il processo di divisione cellulare è descritto in molti dettagli, così non si può dire per il plastidio, anche se alcune sue molecole di base sono state identificate e risultano sia di provenienza eucariotica che procariotica. Tra di esse figurano le proteine FtsZ, codificate nel nucleo, ma indirizzate al cloroplasto; queste proteine sono essenziali per la divisione del cloroplasto e si posizionano ad anello nella parte mediana del plastidio prima della divisione. I mutanti *arc* di *Arabidopsis*, manifestano varie anomalie nella forma, dimensione e numero dei cloroplasti e possono essere un ottimo strumento per individuare i geni della divisione plastidiale nelle piante. L'analisi genetica del mutante *arc* ha rivelato almeno 12 loci coinvolti nella replicazione plastidiale; analizzando specificatamente il mutante *arc6* si è trovato che nel tipo selvaggio la proteina ARC6 è una proteina indirizzata al plastidio del tipo "DNA-J like protein" (Vitha et al., 2003). Nel loro lavoro gli Autori ottengono dati a sostegno della funzione di ARC6 nella costruzione dell'anello Ftsz nei cloroplasti.

D'altra parte ci sono evidenze che amiloplasti di endosperma si dividono attivamente.

Bioenergetica

Negli amiloplasti sono state rinvenute proteine coinvolte nel trasporto degli elettroni e nella sintesi e modifica dell'ATP. La presenza di classici componenti del cloroplasto, come la "OEE protein" o la "chlorophyll a/b-binding protein", non ha spiegazione, ma la presenza di isoforme di ferredossina e di ferredossina/NADP riduttasi specifiche per i plastidi non fotosintetici, serve al trasferimento inverso di equivalenti riducenti dal NADPH alla ferredossina, utile per sostenere i processi che nel cloroplasto avvengono alla luce. Il rinvenimento iniziale negli amiloplasti della ferredossina/tiorredossina riduttasi suggeriva che in questo organello fosse presente il sistema ferredossina/tiorredossina descritto nei cloroplasti. Balmer et al. (2006a) hanno confermato la presenza della tiorredossina nell'amiloplasto.

Metabolismo azoto/zolfo

La scoperta nell'amiloplasto di un vasto gruppo di proteine (39) attive nella sintesi degli amminoacidi, è funzionale sia alla definizione dei plastidi non fotosintetici come siti di sintesi di questi "building blocks", ma anche alla centralità della loro funzione per l'assimilazione dell'azoto e dello zolfo. D'altra parte gli amminoacidi servono sia alla sintesi di enzimi che di proteine di riserva.

Proteine correlate agli acidi nucleici

A questa categoria appartengono due gruppi: un primo legato alla sintesi di DNA e RNA, alla trascrizione e alla traduzione. È da osservare che non è mai stata trovata la presenza di sub-unità dei ribosomi 70S; ciò è un'ulteriore conferma che gran parte delle proteine dell'amiloplasto è codificata dal nucleo e quindi la sintesi proteica *in organello* è assai limitata. L'altro gruppo è rappresentato dagli enzimi per la sintesi dei nucleotidi (purina e pirimidina); sembra proprio che nelle piante gran parte di queste reazioni sia localizzata nei plastidi.

Attività metaboliche varie

Nella fase iniziale di sviluppo gli amiloplasti sono organelli molto versatili che partecipano, come riportato sopra, alla sintesi di molte molecole fondamentali. È stato chiarito da tempo che le piante posseggono due vie di biosintesi per gli isoprenoidi, una citosolica e una plastidiale. Per la sintesi dei tetrapirroli anche gli amiloplasti sono attivi; occorre comunque tenere presente che gli amiloplasti non richiedono pigmenti fotosintetici; d'altra parte gli enzimi per la sintesi delle clorofille sono tutti sotto stretto controllo della luce. Infine sono stati identificati diversi enzimi della sintesi *de novo* degli acidi grassi che conferma l'importanza del plastidio per soddisfare le richieste della cellula anche per queste sostanze.

Quindi, nei primi stadi di sviluppo del seme, gli amiloplasti funzionano per produrre metaboliti essenziali per la pianta madre.

Modifiche proteiche

Questa è una delle categorie proteiche più presenti nell'amiloplasto, comprendendo proteine attive nel folding, nell'assemblaggio, nel turn-over e

nell'accumulo di specie proteiche. D'altra parte sia l'elevato numero di proteasi identificate che l'analogo numero di "chaperones" suggerirebbero un rapido turn-over delle proteine plastidiali che, tra l'altro è coerente con quanto rinvenuto negli endospermi di grano (Vensel et al., 2005).

Trasporto

I trasportatori di membrana dell'amiloplasto sono rilevanti sia per importare metaboliti, ma anche per trasferirli all'interno della cellula. Oltre al traslocatore dell'ADP-glucosio, che importa l'ADP-glucosio fatto nel citosol, sono state scoperte altre 18 proteine attive nel trasporto. Ciò sottolinea quanto sia complessa l'attività dell'involucro plastidiale. Di elevato interesse è anche il movimento di ioni attraverso il plastidio.

Signaling

Sono proteine collegate agli ormoni, alla fosforilazione, al GTP e a varie pathway del signaling. In tutto sono state identificate 16 proteine probabilmente collegate alla regolazione dello sviluppo del plastidio e forse anche alla ripartizione del carbonio tra le diverse pathway. Si ritiene che l'amiloplasto sia connesso alla complessa rete di signaling per il suo importante ruolo nello sviluppo dell'endosperma dei cereali.

Proteine correlate allo stress

Sono state identificate catalasi e SOD (funzionali alla rimozione delle ROS), ma anche proteine collegate alla produzione di gruppi tiolici (perossiredossine ed enzimi della sintesi del glutatione) o all'ascorbato (con azione detossificante sulle ROS).

Conclusioni

Gli amiloplasti, organelli che accumulano amido in tessuti eterotrofi, mostrano una ampia capacità biosintetica che, probabilmente, non è richiesta solo per la crescita e lo sviluppo del plastidio, ma anche per l'intera cellula che

lo ospita. Molte delle attività biochimiche che avvengono nei cloroplasti, si ritrovano anche nell'amiloplasto (sintesi di amminoacidi, di isoprenoidi, di acidi grassi, di tetrapirroli, ecc.).

Mediante un confronto tra le proteine del cloroplasto, benché più conosciute e numerose, e dell'amiloplasto, si osserva che percentualmente l'amiloplasto ha più proteine per metabolismo dei carboidrati, per quello dell'N/S e per la bioenergetica. Nel cloroplasto sono maggiori le proteine dal significato sconosciuto. In entrambi i tipi di plastidio si rinvenivano attività fondamentali per costruire molecole di base ("building blocks") e quindi indipendentemente dal tipo di cellula che li ospita che può essere sia fotosintetica come eterotrofa. Rimane un interrogativo di fondo riguardante la regolazione: se nel cloroplasto molte attività biochimiche sono modulate dalla luce, come viene regolata l'attività dell'amiloplasto? Questo è l'aspetto sul quale le informazioni sono ancora frammentarie.

A conclusioni diverse si è giunti lavorando sui giovani tuberi di patata. In questi amiloplasti l'enzima dominante risulta l'amido fosforilasi L-1, ma insieme a questa erano presenti varie proteine del metabolismo dell'amido e del saccarosio, della via del pentoso fosfato, della glicolisi, del metabolismo amino acidico e infine altre proteine come, ad esempio, le chaperonine. Molte di queste proteine erano certamente entrate nell'organello tramite il transit peptide, ma alcune, come l'amido fosforilasi H non avevano tale TP. Oltre a questo fatto si è anche osservato che tutte le polifenolo ossidasi, le enolasi, una trasketolasi, la sulfito riduttasi e altre ancora possedevano una sequenza Sec (secretoria) che normalmente indirizza alle strutture tilacoide-simili. Siccome erano presenti anche proteine con le sequenze Tat (twin-arginine translocation) gli autori concludono che sia opportuna una rivalutazione delle funzioni metaboliche di varie proteine plastidiali e della loro localizzazione nell'amiloplasto (Stensballe et al., 2008).

BIBLIOGRAFIA

- ANDON N.L., HOLLINGWORTH S., KOLLER A., GREENLAND A.J., YATES 3RD J.R., HAYNES P.A. (2002): *Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry*, «Proteomics», 2, pp. 1156-1168.
- ARMBRUSTER U., HERTLE A., MAKARENKO E., ZÜHLKE J., PRIBIL M., DIETZMANN A., SCHLIEBNER I., ASEVA E., FENINO E., SCHARFENBERG M., VOIGT C., LEISTER D. (2009): *Chloroplast Proteins without Cleavable Transit Peptides: Rare Exceptions or a Major Constituent of the Chloroplast Proteome?*, «Mol Plant», 2, pp. 1325-1335.

- ARMBRUSTER U., PESARESI P., PRIBIL M., HERTLE A., LEISTER D. (2011): *Update on Chloroplast Research: New Tools, New Topics, and New Trends*, «Mol Plant», 4, pp. 1-16.
- BALMER Y., VENSEL W.H., CAI N., MANIERI W., SCHURMANN P., HURKMAN W.J., BUCHANAN B.B. (2006a): *A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts*, «PNAS», 103, pp. 2988-2993.
- BALMER Y., VENSEL W.H., DUPONT F.M., BUCHANAN B.B., HURKMAN W.J. (2006b): *Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability*, «J Exp Bot.», 57, pp. 1591-1602.
- BAIER M., DIETZ K.-J. (2005): *Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology*, «J. Exp. Bot.», 56, pp. 1449-1462.
- BOUVIER F., BACKHAUS R.A., CAMARA B. (1998): *Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress*, «J. Biol. Chem.», 273, pp. 30651-30659.
- DIETZ K.J. (2008): *Redox signal integration: from stimulus to networks and genes*, «Physiol. Plant.», 133, pp. 2123-2137.
- EGEA I., BARSAN C., BIAN W., PURGATTO E., LATCHÉ A., CHERVIN C., BOUZAYEN M., PECH J.-C. (2010): *Chromoplast Differentiation: Current Status and Perspectives*, «Plant Cell Physiol.», 51, pp. 1601-1611.
- EGEA I., BIAN W., BARSAN C., JAUNEAU A., PECH J.-C., LATCHÉ A., LI Z., CHERVIN C. (2011): *Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue*, «Annals of Botany», 108, pp. 291-297.
- FERRO M., BRUGIÈRE S., SALVI D., SEIGNEURIN-BERNY D., COURT M., MOYET L., RAMUS C., MIRAS S., MELLAL M., LE GALL S., KIEFFER-JAQUINOD S., BRULEY C., GARIN J., JOYARD J., MASSELON C., ROLLAND N. (2010): *AT_CHLORO: a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins*, «Mol. Cell Proteomics», 9, pp. 1063-1084.
- GEIGENBERGER P., KOLBE A., TIESSEN A. (2005): *Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars*, «J. Exp. Bot.», 56, pp. 1469-1479.
- JOYARD J., FERRO M., MASSELON C., SEIGNEURIN-BERNY D., SALVI D., GARIN J., ROLLAND N. (2009): *Chloroplast Proteomics and the Compartmentation of Plastidial Isoprenoid Biosynthetic Pathways*, «Mol. Plant», 2, pp. 1154-1180.
- KAHLAU S., BOCK R. (2008): *Plastid transcriptomics and translaticomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein*, «The Plant Cell», 20, pp. 856-887.
- KEBEISH R., NIESSEN M., THIRUVEEDHI K., BARI R., HIRSCH H.J., ROSENKRANZ R., STÄBLER N., SCHÖNFELD B., KREUZALER F., PETERHÄNSEL C. (2007): *Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana*, «Nat Biotechnol.», 25, pp. 593-599.
- LI X.-P., BJÖRKMAN O., SHIH C., GROSSMAN A.R., ROSENQUIST M., JANSSON S., NIYOGI K.K. (2000): *A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting*, «Nature», 403, pp. 391-395.
- LU S., VAN ECK J., ZHOU., LOPEZ A.B., O'HALLORAN D.M., COSMAN K.M., CONLIN B. J., PAOLILLO D. J., GARVIN D.F., VREBALOV J., KOCHIAN L. V., KÜPPER H., EARLE E.D., CAO J., LI L. (2006): *The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich do-*

- main-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation*, «Plant Cell», 18, pp. 3594-3605.
- MATILE P. (2000): *Biochemistry of indian summer: physiology of autumnal leaf coloration*, «Exp. Gerontol.», 35, pp. 145-158.
- MICHELET L., ZAFFAGNINI M., MARCHAND C., COLLIN V., DECOTTIGNIES P., TSAN P., LANCELIN J.-M., TROST, P., MIGINIAC-MASLOW M., NOCTOR G., LEMAIRE S.D. (2005): *Glutathionylation of Chloroplast Thioredoxin f1s a Redox Signaling Mechanism in Plants*, «PNAS», 102, pp. 16478-16483.
- MOULIN M., MCCORMAC A.C., TERRY M.J., SMITH A.G. (2008): *Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation*, «Proc. Natl Acad. Sci. U S A», 105, pp. 15178-15183.
- PESARESI P., PRIBIL M., WUNDER T., LEISTER D. (2011): *Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38*, «Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics», 8, pp. 887-96.
- PREBERG T., WRISHER M., FULGOSI H., LJUBESIC N. (2008): *Ultrastructural characterization of the reversible differentiation of chloroplasts in cucumber fruit*, «J. Plant Physiol.», 51, pp. 122-131.
- REILAND S., MESSERLI G., BAERENFALLER K., GERRITS B., ENDLER A., GROSSMANN J., GRUISSEM W., BAGINSKY S. (2009): *Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks*, «Plant Physiol.», 150, pp. 889-903.
- RUTSCHOW H., YTTERBERG A.J., FRISO G., NILSSON R., VAN WIJK K.J. (2008): *Quantitative proteomics of a chloroplast SRP54 sorting mutant and its genetic interactions with CLPC1 in Arabidopsis*, «Plant Physiol.», 148, pp. 156-175.
- SCHALLER S., LATOWSKI D., JEMIOŁA-RZEMIŃSKA M., WILHELM C., STRZAŁKA K., GOSS R. (2010): *The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII)*, «Biochim Biophys Acta», 1797, pp. 414-424.
- SERRATO A.J., PÉREZ-RUIZ J.M., SPÍNOLA M.C., CEJUDO F.J. (2004): *A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana*, «J. Biol. Chem.», 279, pp. 43821-43827.
- SIDDIQUE M.A., GROSSMANN J., GRUISSEM W., BAGINSKI S. (2006): *Proteome analysis of bell pepper (Capsicum annuum L.) chromoplasts*, «Plant and Cell Physiology», 47, pp. 1663-1673.
- SIRPIÖ S., ALLAHVERDIYEVA Y., HOLMSTRÖM M., KHROUCHTCHOVA A., HALDRUP A., BATTCHIKOVA N., ARO E.M. (2009): *Novel nuclear-encoded subunits of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex*, «J. Biol. Chem.», 284, pp. 905-912.
- STENSALLE A., HALD S., BAUW G., BLENNOW A., WELINDER K.G. (2008): *The amyloplast proteome of potato tuber*, «FEBS Journal», 275, pp. 1723-1741.
- STETTNER M., EICKE S., METTLER T., MESSERLI G., HÖRTENSTEINER S., ZEEMAN S.C. (2009): *Blocking the metabolism of starch breakdown products in Arabidopsis leaves triggers chloroplast degradation*, «Mol. Plant.», 2, pp. 1233-1246.
- VENSEL W.H., TANAKA C.K., CAI N., WONG J.H., BUCHANAN B.B., HURKMAN W.J. (2005): *Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm*, «Proteomics», 5, pp. 1594-1611.

- VITHA S., FROELICH J.E., KOKSHAROVA O., PYKE K.A., VAN ERP H., OSTERYOUNG K.W. (2003): *ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2*, «Plant Cell», 15, pp. 1918-1933.
- YU Q-B., JIANG Y., CHONG K., YAN Z-N. (2009): *AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript accD RNA editing and early chloroplast biogenesis in Arabidopsis thaliana*, «The Plant Journal», 59, pp. 1011-1023.
- ZYBAILOV B., RUTSCHOW H., FRISO G., RUDELLA A., EMANUELSSON O., SUN Q., VAN WIJK K.J. (2008): *Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast Proteome*, «PLoS ONE» 3, e1994.