

Organizacija i evolucija genoma kloroplasta

Davosir, Dino

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:183000>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Organizacija i evolucija genoma kloroplasta
Organisation and Evolution of Chloroplast Genome

SEMINARSKI RAD

Dino Davosir
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate study of Biology)
Mentorica: prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. POSTANAK KLOROPLASTA.....	3
2. 1. RAZVOJ ENDOSIMBIOTSKE TEORIJE.....	3
2. 2. DOKAZI ENDOSIMBIOTSKE TEORIJE.....	4
3. ORGANIZACIJA GENOMA KLOROPLASTA	6
4. EVOLUCIJA GENOMA KLOROPLASTA.....	10
4. 1. REPLIKACIJA I TRANSKRIPCija GENOMA KLOROPLASTA	11
4. 2. BIOSINTEZA PROTEINA U KLOROPLASTIMA.....	14
4. 3. PRIJENOS KLOROPLASTNIH GENA U JEZGRIN GENOM.....	15
4. 4. RAZLOZI ZADRŽAVANJA KLOROPLASTNOG GENOMA	18
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA.....	21
7. SAŽETAK	25
8. SUMMARY	26

1. UVOD

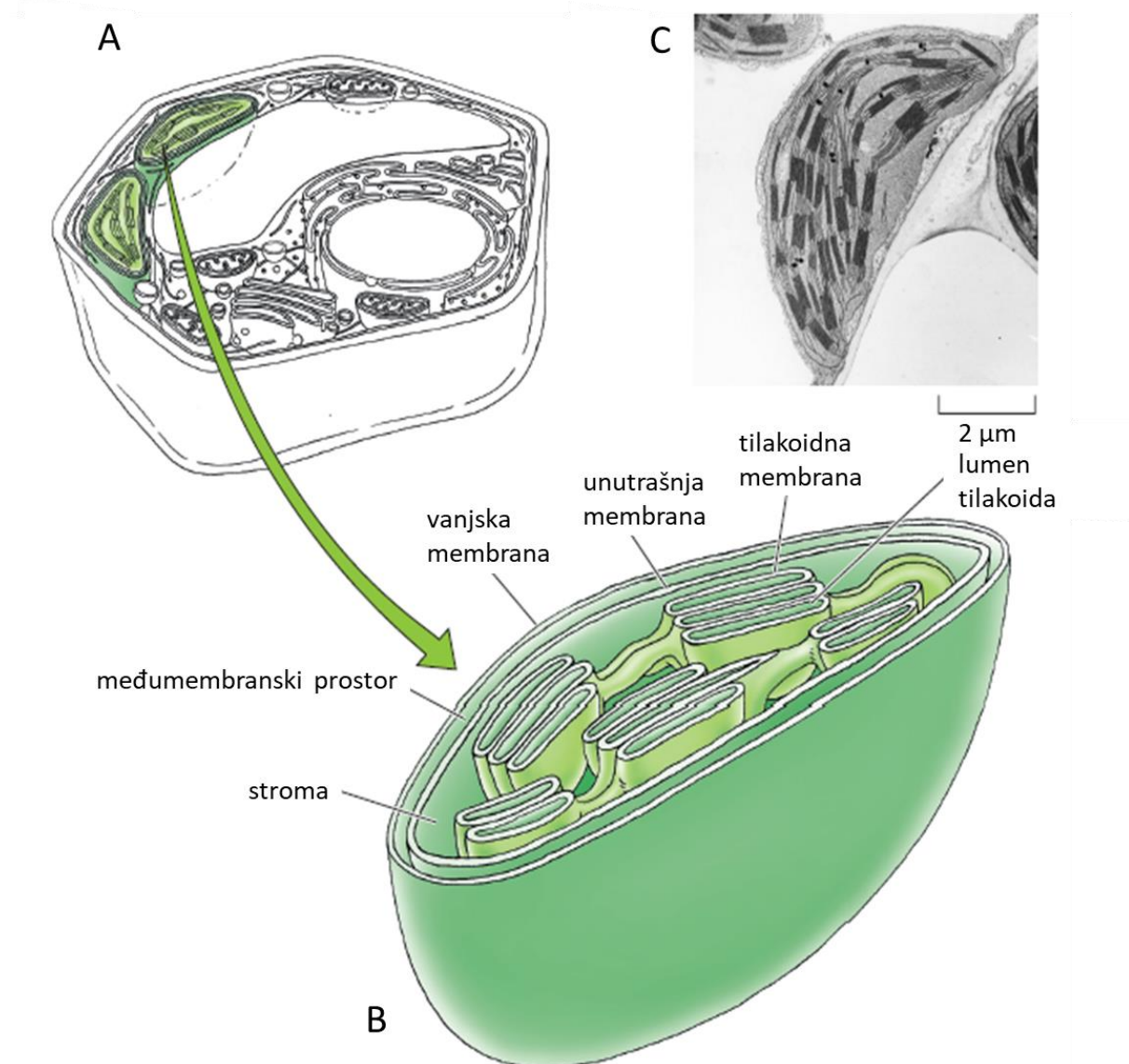
Biljke, alge i neke bakterije imaju sposobnost sinteze organskih spojeva procesom fotosinteze. Fotosinteza se u biljkama i algama provodi u posebnim organelima, kloroplastima. Biljke i alge kao glavni fotosintetski organizmi na Zemlji uz korištenje energije Sunčevog zračenja i vode preko transportnog lanca elektrona u membrani kloroplasta sintetiziraju NADPH i pumpanjem protona stvaraju gradijent protona koji se koristi za sintezu adenozin trifosfata (ATP). Uz pomoć ATP i NADPH kao izvora energije, fiksacijom ugljikovog dioksida iz atmosfere u organske spojeve sintetiziraju ugljikohidrate bogate energijom i u atmosferu otpuštaju kisik koji služi za stanično disanje. Tako dobiven kisik i ugljikohidrate onda u konačnici kao hranu koriste animalni organizmi za dobivanje energije. Smatra se da se fotosinteza na Zemlji pojavila prije nešto više od tri milijarde godina u predcima današnjih cijanobakterija. (Alberts, 2015; Cooper & Hausman, 2007)

Danas su kloroplasti semiautonomni organeli koji su prisutni u stanicama algi i biljaka, no preci kloroplasta bili su slobodno živeći prokariotski fotosintetski organizmi nalik današnjim cijanobakterijama koji su procesom endosimbioze s eukariotskom stanicom domaćinom postali ključan i jedan od najkarakterističnijih dijelova stanične organizacije suvremenih fotosintetskih eukariota. (Alberts, 2015) Kloroplasti su evolucijom održali osnovne biokemijske procese karakteristične za prokariote, ali sadrže samo ostatke ostataka genoma njihovog prokariotskog pretka koji su reducirani na veličinu plazmida. Organizacija genoma kloroplasta koja uvelike nalikuje organizaciji genoma tipične bakterije, jedan je od najbitnijih dokaza endosimbiotskog postanka kloroplasta. (Timmis i sur., 2004)

Zbog sličnog postanka iz bakterijskih stanica procesom endosimbioze i funkcije u stvaranju metaboličke energije, kloroplasti su po mnogočemu slični mitohondrijima. Međutim, kloroplasti su veći i složeniji organeli od mitohondrija jer se u njima odvija više procesa. Osim već prije opisanog procesa fotosinteze koji obuhvaća pretvorbu ugljikovog dioksida u ugljikohidrate, kloroplasti imaju ulogu u sintezi određenih aminokiselina, masnih kiselina i sastojaka lipida vlastitih membrana. (Wicke i sur., 2011) Nadalje, u kloroplastima se odvija i ključni korak u asimilaciji dušika u organske spojeve, redukcija nitrita u nitrate. (Cooper & Hausman, 2007)

Kloroplasti su ovijeni dvostrukom membranom, kao što je prikazano na Slici 1., a osim unutrašnje i vanjske membrane, za razliku od mitohondrija, imaju i poseban unutarnji membranski sustav tilakoidnih membrana koji sadrži komponente transportnog lanca elektrona i enzim ATP-sintazu. Tilakoidne membrane su često organizirane u nakupine tilakoida koji

čine tzv. grana-tilakoide, a unutar tilakoidne membrane nalazi se tilakoidni lumen. Tilakodne membrane nalaze se u stromi kloroplasta koja je analogna matriksu mitohondrija, a sadržava genetički sustav kloroplasta u obliku nukleoida i različite metaboličke enzime. (Alberts, 2015; Cooper & Hausman, 2007)



Slika 1. (A) Figuratívni prikaz tipične biljne stanice s označenim kloroplastima (zeleno). (B) Shematski prikaz ultrastrukture kloroplasta s naznačenim membranama i tri različita unutarnja odjeljka na koje ih te tri membrane dijele. (C) Slika kloroplasta dobivena transmisijским elektronskim mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno prema Cooper & Hausman, 2007.

2. POSTANAK KLOROPLASTA

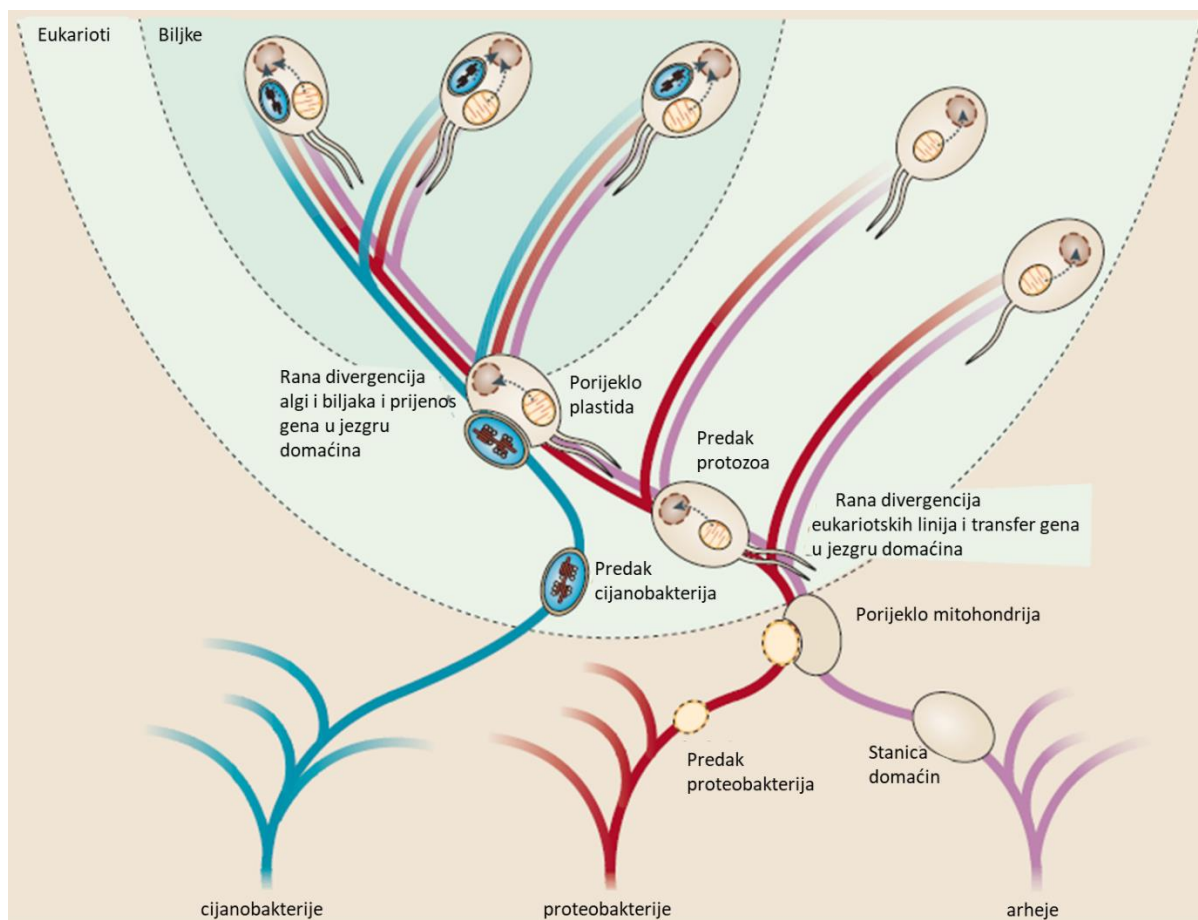
Do pojave fotosintetskih eukariotskih stanica došlo je endosimbiotskim događajem koji je uslijedio nakon što je heterotrofni eukariotski predak koji je već sadržavao mitohondrije koji su nastali endosimbiozom s proteobakterijom progutao prokariotski organizam nalik na današnje cijanobakterije, koji je dugotrajnim procesima pretvoren u kloroplast. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018) Taj primarni endosimbiotski događaj omogućio je eukariotima prelazak s heterotrofnog na autotrofni način života. (Wicke i sur., 2011)

2. 1. RAZVOJ ENDOSIMBIOTSKE TEORIJE

Prvu hipotezu koja opisuje endosimbiotsku teoriju dao je ruski botaničar Mereschkowsky, no njegove ideje nisu bile prihvaćene. On je još 1905. pretpostavio da su biljni „kromatofori“ rezultat unošenja cijanobakterije u eukariotski organizam. (Mereschkowsky, 1905) Tek je u 1970-tim godinama ovu hipotezu postanka mitohondrija i kloroplasta popularizirala Lynn Margulis. (Sagan, 1967) Ta teorija danas je općeprihvaćena i generalni koncept te teorije prikazan je na Slici 2. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018)

Porijeklo kloroplasta se na temelju fosilnih ostataka smješta na razdoblje prije otprilike 1,4-1,7 milijardi godina, dok se na temelju filogenetičkih pristupa smješta na vrijeme prije 0,9 milijardi godina. Danas se smatra da je primarni endosimbiont bio srodnik današnjih cijanobakterija koje fiksiraju dušik i pripadaju skupini Chroococcales kao što su *Nostoc* sp. i *Anabena* sp. (Deusch i sur., 2008; Falcón i sur., 2010) Prihvaćeno je da se primarni endosimbiotski događaj dogodio jednom (McFadden & Van Dooren, 2004; Zimorski i sur., 2014), ali i dalje nije posve jasno kako i koliko dugo je tekao proces konverzije endosimbionta u organel. Taj proces događao se u nekoliko koraka. Prvi korak uključuje gubitak bakterijske stijenke i prilagođavanje na prijenos proteina i metabolita iz citosola u kloroplast. Taj korak dosegnut je evolucijom sustava translokona vanjske membrane kloroplasta (engl. *translocon on the outer chloroplast membrane*, TOC) i translokona unutarnje membrane kloroplasta (engl. *translocon on the inner chloroplast membrane*, TIC), koji su prisutni u svim linijama fotosintetskih eukariota te su jedan od dokaza da se primarni endosimbiotski događaj dogodio jednom. Posljednji korak je prenošenje gena iz organela u jezgru, što je dovelo do postepenog smanjenja genoma kloroplasta i u konačnici do potpunog gubitka autonomnosti. (Timmis i sur., 2004) Zbog toga je samostalnost i dioba kloroplasta izvan stanice domaćina nemoguća. (Kusnetsov, 2018) Fotosintetski eukariotski organizmi i danas sadrže genom kloroplasta, još

nazvan i plastom, koji potječe od genoma endosimbionta koji je postepeno postao kloroplast. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018)



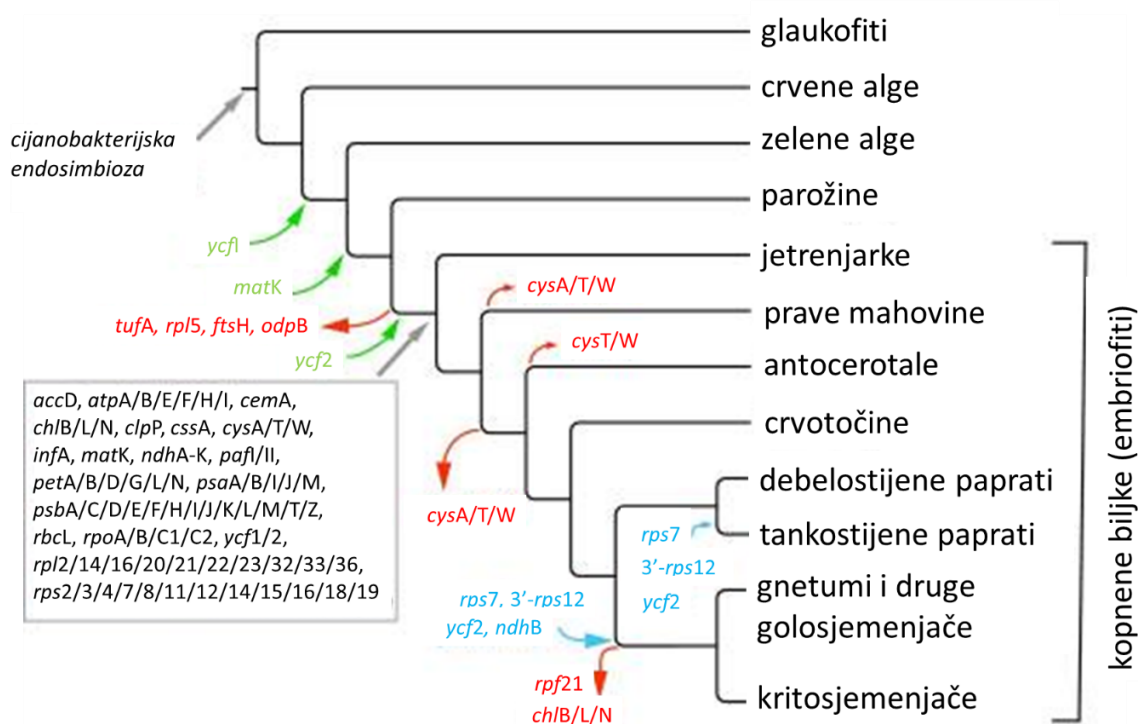
Slika 2. Shematski prikaz koji prikazuje endosimbiotske događaje koji su osnovica za razvoj današnjih algi i biljaka s naglašenom koevolucijom jezgrinog genoma i genoma organela. Na prikazu je označen endosimbiotski događaj između arheje i proteobakterije koji je rezultirao pojavom eukariotske stanice s mitohondrijima, te nakon toga ranu divergenciju glavnih evolucijskih linija eukariota i drugi endosimbiotski događaj između pretka današnjih biljaka i organizma sličnog današnjim cijanobakterijama, koji je doveo do postanka kloroplasta. Preuzeto i prilagođeno prema Timmis i sur., 2004.

2. 2. DOKAZI ENDOSIMBIONTSKE TEORIJE

Čvrsti dokazi govore o endosimbiotskom postanku kloroplasta. Primaran dokaz je postojanje i organizacija genoma unutar organela kloroplasta, koji je ostatak genoma endosimbiontskog pretka. (Alberts, 2015) Nadalje, ribosomi kloroplasta slični su bakterijskim ribosomima, po strukturi i osjetljivosti na bakterijske antibiotike, kao što su streptomycin,

eritromicin i tetraciklin. Biosinteza proteina u kloroplastima započinje *N*-formilmetioninom, kao i u bakterija, a ne metioninom kao u citosolu eukariotskih stanica. (Wicke i sur., 2011)

Na temelju kristalografskih istraživanja reakcijskih centara koji služe u hvatanju fotona svjetlosti tijekom fotosinteze, dobiveni su rezultati koji govore o tome da su fotosustavi prisutni u današnjim biljkama gotovo jednaki onima prisutnima u fotosintetskim bakterijama. Kao rezultat toga, zaključuje se da su svi fotosustavi evoluirali iz jednog zajedničkog pretka i promijenili se vrlo malo. (Alberts, 2015) Jedinstveni endosimbiotski događaj potvrđen je i filogenetičkim analizama plastidnih gena i potvrđena je hipoteza da su plastidi svih kladija koji obuhvaćaju alge i biljke (Glaucophyta, Rodophyta, Chlorophyta i Streptophyta) porijeklom iz jednog primarnog endosimbiotskog događaja. Evolucijska veza glavnih grana današnjih fotosintetskih eukariota prikazana je na filogramu na Slici 3., zajedno sa sadržajem gena pojedinih skupina kopnenih biljaka. Teoriju o jednom simbiotskom događaju također podržavaju i biokemijska svojstva plastida, strukture molekula RNA, struktura membrane i sustavi za unos proteina. (Wicke i sur., 2011)



Slika 3. Filogenetski prikaz evolucije sadržaja genoma kloroplasta algi i kopnenih biljaka. Ancestralni sadržaj genoma kopnenih biljaka prikazan u sivom pravokutniku dobiven je metodama filogenetske analize. Crvenim strelicama prikazan je gubitak gena (zbog jednostavnosti izostavljen je gubitak gena koji se dogodio prije pojave kopnenih biljaka), zelene strelice pokazuju evoluciju novih gena prije prelaska na kopno, a plave strelice označavaju duplikacije gena. Preuzeto i prilagođeno prema Wicke i sur., 2011.

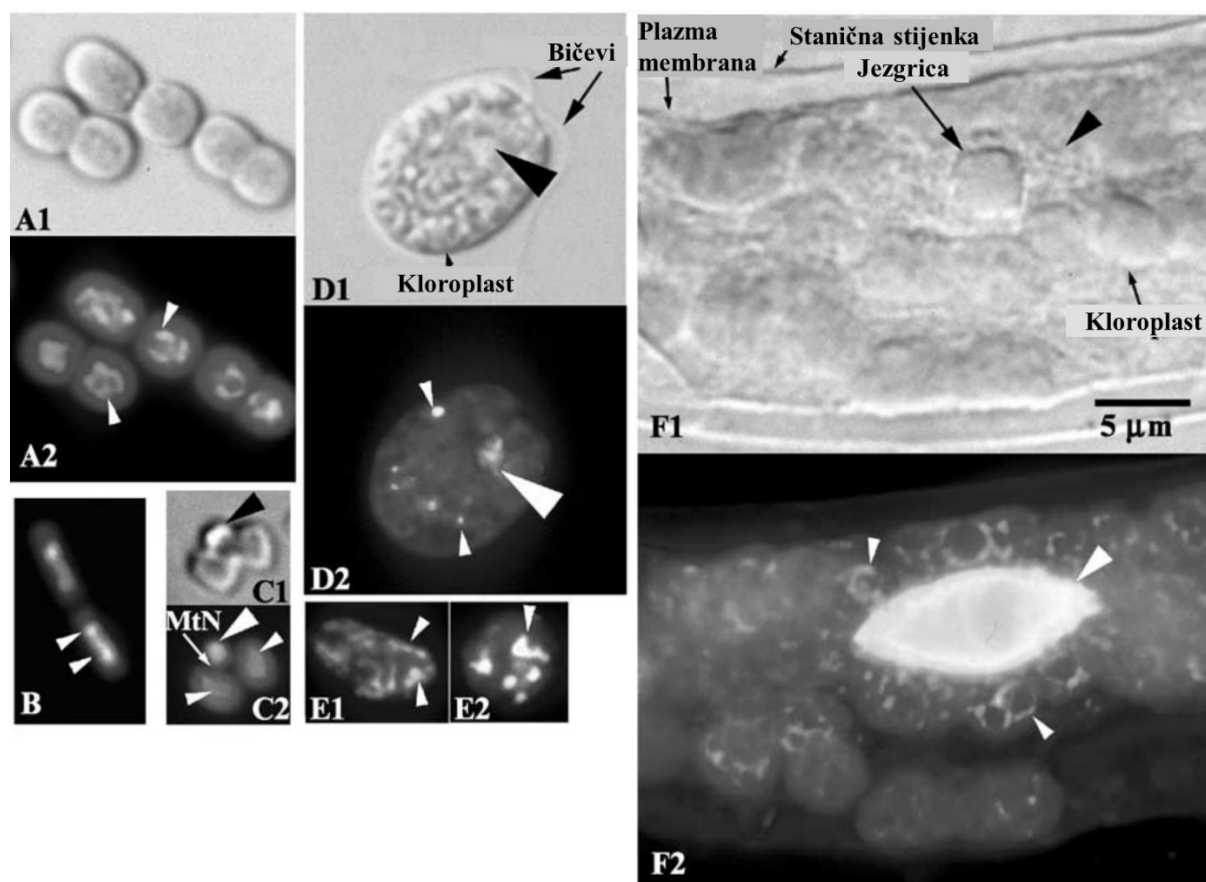
3. ORGANIZACIJA GENOMA KLOROPLASTA

Još 1962. godine Ris i Plaut dokazali su u svom radu postojanje kloroplastne DNA u algi *Chlamydomonas reinhardtii*. (Ris & Plaut, 1962) Sve većim napredovanjem tehnika sekvenciranja, došlo je do velikog pada cijene usluga sekvenciranja, što je dovelo do sekvenciranja genoma sve većeg broja organizama. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018) U bazi podataka NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) do 24. lipnja 2020. nalazi se 379496 sekvenci kloroplastne DNA (cpDNA) iz 5030 genoma različitih kopnenih biljaka, zelenih, crvenih, smeđih i ostalih skupina algi, dok je 2003. bila sekvencirana cpDNA tek tridesetak vrsta. (Sato i sur., 2003) Broj gena u cpDNA varira od 48 do maksimalno 250, a na temelju sekvenci cpDNA dobiveni su brojni zaključci o mehanizmima ekspresije gena u kloroplastima i evoluciji kloroplastnog genoma te povezanosti genoma kloroplasta s jezgrinim genomom. (Wise & Hooper, 2006)

Iako se prvo mislilo da se cpDNA pojavljuje isključivo kao kružna molekula, rezultati su pokazali da se velik udio cpDNA u nekih vrsta pojavljuje kao linearna molekula, a samo 3-4% kao kružna molekula. (Oldenburg & Bendich, 2004) Takve linearne molekule često tvore konkatemerne strukture, kopije cpDNA koje su međusobno povezane u seriju, no i dalje je nepoznato kako se takve konkatemerne strukture formiraju. (Wicke i sur., 2011) Kloroplasti sadrže puno kopija cpDNA, a razlog toga i dalje nije poznat. Broj kopija cpDNA razlikuje se ovisno o tipu tkiva i biljnoj vrsti. (Powikrowska i sur., 2014) Na primjer, u listovima vrste *Arabidopsis thaliana*, po organelu dolazi manje od 50 kopija cpDNA, dok se u pšenici i šećernoj repi taj broj se nalazi u rasponu od 330 do 900. Također, u nekim slučajevima, uočena je pozitivna korelacija između stupnja ploidije i broja kopija cpDNA po organelu. (Kusnetsov, 2018)

Kao i bakterijska DNA, i cpDNA organizirana je u nukleoide, komplekse prikazane na Slici 4. koji se sastoje od molekula DNA i RNA te proteina koji izvode različite enzimske aktivnosti i imaju ulogu u popravku oštećenja molekule DNA, rekombinaciji i drugim procesima vezanima za ekspresiju gena. Jedan nukleoid sadrži najčešće od 10 do 20 kopija cpDNA. (Kusnetsov, 2018) Nukleoidi sadrže DNA- i RNA-vezujuće proteine koji imaju funkciju u sazrijevanju ribosomske RNA (rRNA) i sklapanju ribosoma, a također su pronađene i DNA giraze i DNA polimeraze (Pol I), koje imaju ulogu u replikaciji cpDNA. Vrlo važna komponenta nukleoida su i proteini koji održavaju pravilnu konformaciju molekule DNA i strukturu nukleotida, a primjer takvog proteina je PEND (engl. *plastid envelope DNA-binding*

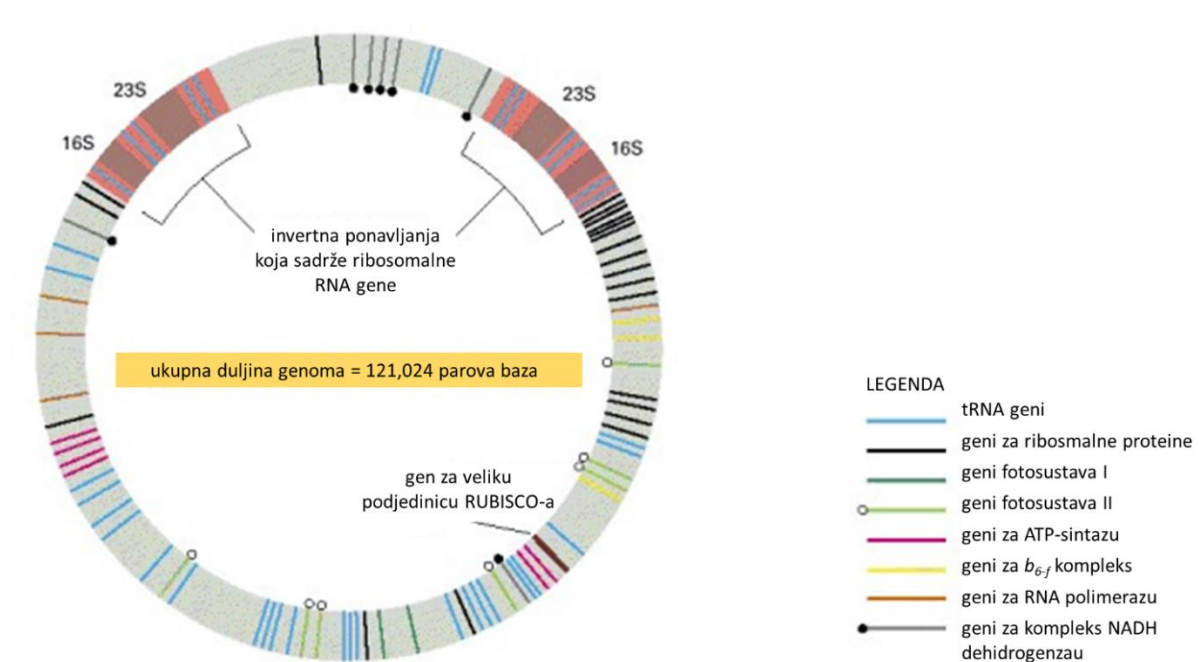
protein) koji se veže na regije bogate adeninom i timinom i omogućava vezanje nukleoida na unutarnju membranu kloroplasta. (Wise & Hooper, 2006)



Slika 4. Slike dobivene fluorescencijskom mikroskopijom koje prikazuju lokalizaciju nukleoida unutar plastida biljnih stanica i cijanobakterija pomoću boje DAPI koja se veže za molekulu DNA. Velike strelice označavaju jezgru, a male strelice nukleoide. A1 i A2 - filamentozna cijanobakterija *Anabaena virabilis*; B - jednostanična cijanobakterije *Synechococcus* sp.; C1 i C2 - crvena alga *Cyanidioschyzon merolae*; D1 i D2 - crvena jednostanična alga *C. reinhardtii*; E1 i E2 - etioplast i kloroplast iz lista graška, F1 i F2 - stanice mahovine *Physcomitrella patens*. MtN označava mitohondrijski nukleoid. Preuzeto i prilagođeno prema Sato i sur., 2003.

cpDNA sastoji se od gena i ponavljajućih sekvenci, što je prikazano na Slici 5. Geni unutar cpDNA se mogu podijeliti u tri skupine: prva skupina koja obuhvaća gene koji kodiraju za komponente sustava za ekspresiju kloroplastnih gena (tri podjedinice RNA polimeraze, ribosomalni proteini, u nekim elongacijski faktor EF-Tu i inicijacijski faktor InfA te geni za molekule rRNA i transfer RNA (tRNA)). (Palmer, 1985) Za razliku od mitohondrija, koji kodira za manji broj tRNA, 37 ili više tipova molekula tRNA koje su kodirane genomom kloroplasta dovoljno je za translaciju svih kodona u skladu sa standardnim genetičkim kodom.

(Cooper & Hausman, 2007) Druga skupina gena obuhvaća gene koji kodiraju za komponente fotosintetskog aparata (fotosustav II, fotosustav I, citokrom *b₆f* kompleks, ATP sintaza, jedna od dvije podjedinice ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze – RUBISCO, itd.) Treća skupina gena obuhvaća gene koji kodiraju protein uključene u različite metaboličke procese. To su na primjer gen *accD* koji kodira za β -podjedinicu acetil-CoA-karboksilaze, gen *ccsA* koji kodira za protein uključen u sintezu citokroma *c* te gen *cemA* čiji produkt ima ulogu u kontroli unosa CO₂. Osim toga, identificirani su brojni otvoreni okviri čitanja nepoznate funkcije. Neki od njih su čak esencijalni za opstanak stanice, kao npr. geni *ycf1* i *ycf2*. (Wise & Hooper, 2006) Koncept operona, kao niza funkcionalno srodnih gena pod regulacijom zajedničkog promotora, je u kloroplastima uglavnom napušten. Policistronski transkripti su cijepani na manje fragmente, koji nakon toga zahtijevaju prekrajavanje ili doradu molekule glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) kako bi postali funkcionalni. (Alberts, 2015)



Slika 5. Organizacija genoma kloroplasta jetrenjarke (*Marchantia* sp.) s naznačenom veličinom genoma i označenim najvažnijim genima. Prikaz predstavlja model genoma kloroplasta većine kopnenih biljaka, unatoč razlikama u veličini između vrsta, koje proizlaze uglavnom zbog varijabilnosti u veličini regija oko gena koji kodiraju za 16S i 23S rRNA. Preuzeto i prilagođeno prema Alberts, 2002.

Genom kloroplasta generalno sadržava jako malo ponavljajućih sekvenci. Osim kratkih ponavljajućih sekvenci manjih od 100 pb, može se raspoznati pet obitelji ponavljajućih sekvenci u genomima kloroplasta. Jedna je organizirana kao invertna ponavljanja u dvije kopije, dvije kao tandemska ponavljanja, a dvije kao raspršeni elementi. Najučestalija je obitelj

invertnih ponavljanja pronađena u većini cpDNA biljaka i nekoliko skupina algi. Smatra se da su ponavljajuće sekvence bile tijekom evolucije podložne najvećim genomskim rearanžmanima te da je to primarni izvor razlika u redoslijedu gena između različitih skupina biljnog svijeta. (Palmer, 1985)

4. EVOLUCIJA GENOMA KLOROPLASTA

Zbog endosimbiontskog postanka kloroplasta, nije iznenađujuće da sustav za ekspresiju gena kloroplasta po mnogočemu sličí bakterijskom sustavu za ekspresiju gena, no niti da se zbog dugotrajne evolucije ti sustavi razlikuju. (Wise & Hooper, 2006) Jedna od najvažnijih razlika je da se u genima primarnog endosimbionta nisu nalazili introni, koji se pojavljuju u većini gena današnjih kloroplasta. Također, najveće razlike u odnosu na bakterijsku regulaciju ekspresije gena pojavljuju se u posttranskripcijskim procesima, koji su u kloroplastima puno složeniji nego u bakterijama. (Kusnetsov, 2018)

Općenito, genom kloroplasta sadrži puno manji broj gena nego što je sadržavao genom prokariotskog endosimbionta. Do toga je došlo vjerojatno gubitkom gena zbog već postojanosti proteina iste funkcije u genomu organizma domaćina i prijenosom gena kloroplasta u jezgru. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018) Gubitak gena može se dogoditi zbog smanjenja selektivnog ograničenja na kloroplastnu kopiju gena, jednom kada se kopija gena u jezgrinom genomu postane funkcionalna. To smanjenje selektivno ograničenja onda dovodi do povećanja *nonsense* mutacija i do konačnog gubitka funkcije kopije gena u cpDNA. (Magee i sur., 2010) Također, geni u kloroplastima mogu postati nefunkcionalni zbog gubitka sposobnosti pravilnog prekranja. (Keller i ostali, 2017) Usporedbom današnjih genoma cijanobakterija, kao najbližih srodnika primarnog endosimbionta, utvrđeno je da oni kodiraju za više od 2000 proteina, dok današnji genomi kloroplasta kodiraju samo za 80-200 proteina. (Martin i sur., 2002)

Današnje različite skupine fotosintetskih eukariota sadrže različit broj gena, vidljivo u Tablici 1. Tako Rhodophyta sadrže najviše gena, u prosjeku 237, dok Glaucophyta sadrže u prosjeku 195, Chlorophyta u prosjeku sadrže 118, a Streptophyta, u koje se ubrajaju i kopnene biljke, sadrže prosječno 129 gena, kada se izuzmu parazitske i vrste bez klorofila. Skupina algi Rhodophyta, čiji genom sadrži velik broj gena organiziranih u operone, filogenetski najviše odgovara pretku cijanobakterijskog genoma. (Allen, 2003) Tako je kao najveći kloroplastni genom zasad sekvenciran genom vrste *Corynoplastis japonica* iz skupine crvenih algi (Rhodophyta), čiji je genom veličine od 1 Mb i sadrži 209 gena. (Muñoz-Gómez i sur., 2017) Veći gubici cpDNA zabilježeni su u parazitskim biljkama zbog smanjenje potrebe za proteinima koji tvore fotosintetske komplekse. (Timmis i sur., 2004) No, zanimljivo, parazitske biljke pritom nisu izgubile samo gene ključne za proces fotosinteze, već i brojne gene koji kodiraju za komponente genetičkog aparata kloroplasta. (Wicke i sur., 2011) S druge strane, u određenim skupinama zabilježena su i povećanja cpDNA, uglavnom zbog višestrukih

duplikacija fragmenata cpDNA, povećanja broja introna i povećanja veličine invertiranih ponavljanja. (Chumley i sur., 2006) Pretpostavlja se da je povećanje veličine cpDNA uzrokovano manje učinkovitim mehanizama popravka DNA koji su prisutni u kloroplastima. (Guisinger i sur., 2008) U kloroplastima su uočeni mehanizmi popravka molekule DNA ovisni o homologu bakterijskog proteina RecA, važnog za popravak oštećenja molekule DNA u bakterija. (Cerutti i sur., 1993)

Tablica 1. Brojevi i karakteristike (srednja vrijednost veličine genoma, broj proteina i strukturnih RNA) plastoma pojedinih glavnih skupina Archaeplastida. Preuzeto i prilagođeno prema Rousseau-Gueutin i sur., 2018.

	Glaucomphyta	Rhodophyta	Chlorophyta	zelene alge Streptophyta	Marchantiidae Bryidae	Pteridophyta	Gymnospermae	Angiospermae zelene biljke (s klorofilom)	parazitske biljke (bez klorofila)
Broj plastoma	1	98	101	18	15	57	96	1 855	41
Srednja vrijednost veličine genoma (pb)	135 599	183 209	161 975	156 310	129 090	15 004	130 398	152 782	71 736
max/min veličina genoma (pb)		90,243 / 610,063	37,454 / 521,168	107,236 / 207,850	108,007 / 161,162	127,840 / 157,260	107,122 / 166,341	113,064 / 242,575	11,348 / 128,921
Srednja vrijednost broja proteina	149	202	83	97	80	86	82	84	33
Srednja vrijednost broja strukturnih RNA	43	35	35	40	45	42	39	45	30

4. 1. REPLIKACIJA I TRANSKRIPCIIJA GENOMA KLOROPLASTA

Dokazano je da je mitohondrijska DNA polimeraza jako slična kloroplastnoj te se smatra da je kloroplastna DNA polimeraza potekla iz mitohondrijske duplikacijom gena za mitohondrijsku DNA polimerazu. Ove obje DNA polimeraze su također dosta slične DNA polimerazi I iz bakterije *Escherichia coli*. U svim kloroplastnim genomima uočen je gubitak proteina DnaA i DNA polimeraze III, koji su neophodni za bakterijsku replikaciju. Ovi dokazi pokazuju da je replikacijski sustav kloroplasta preuzet od domaćina, i to duplikacijom mitohondrijskih gena za replikacijski sustav iz jezgrine DNA, a njegova evolucija shematski je prikazana na Slici 6. (Sato i sur., 2003)

Unutar genoma kloroplasta nalaze se geni koji kodiraju za čak dvije RNA polimeraze, što je prikazano na Slici 6. (A. M. Magee, 2002) Glavna plastidna RNA polimeraza koja ima ulogu uglavnom u transkripciji gena za fotosintetski aparat, a naziva se RNA polimeraza kodirana plastidnom DNA (engl. *plastid-encoded RNA polymerase*, PEP) i uvelike slični bakterijskoj RNA polimerazi od više podjedinica te se zbog toga često naziva RNA polimeraza bakterijskog tipa. Podjedinice α , β , β' i β'' kodirane su genima *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* i *rpoC2* iz cpDNA, dok je σ -podjedinica, ključna je za prepoznavanje promotora i inicijaciju transkripcije, kodirana jezgrinim genomom. Druga otkrivena RNA polimeraza naziva se polimeraza

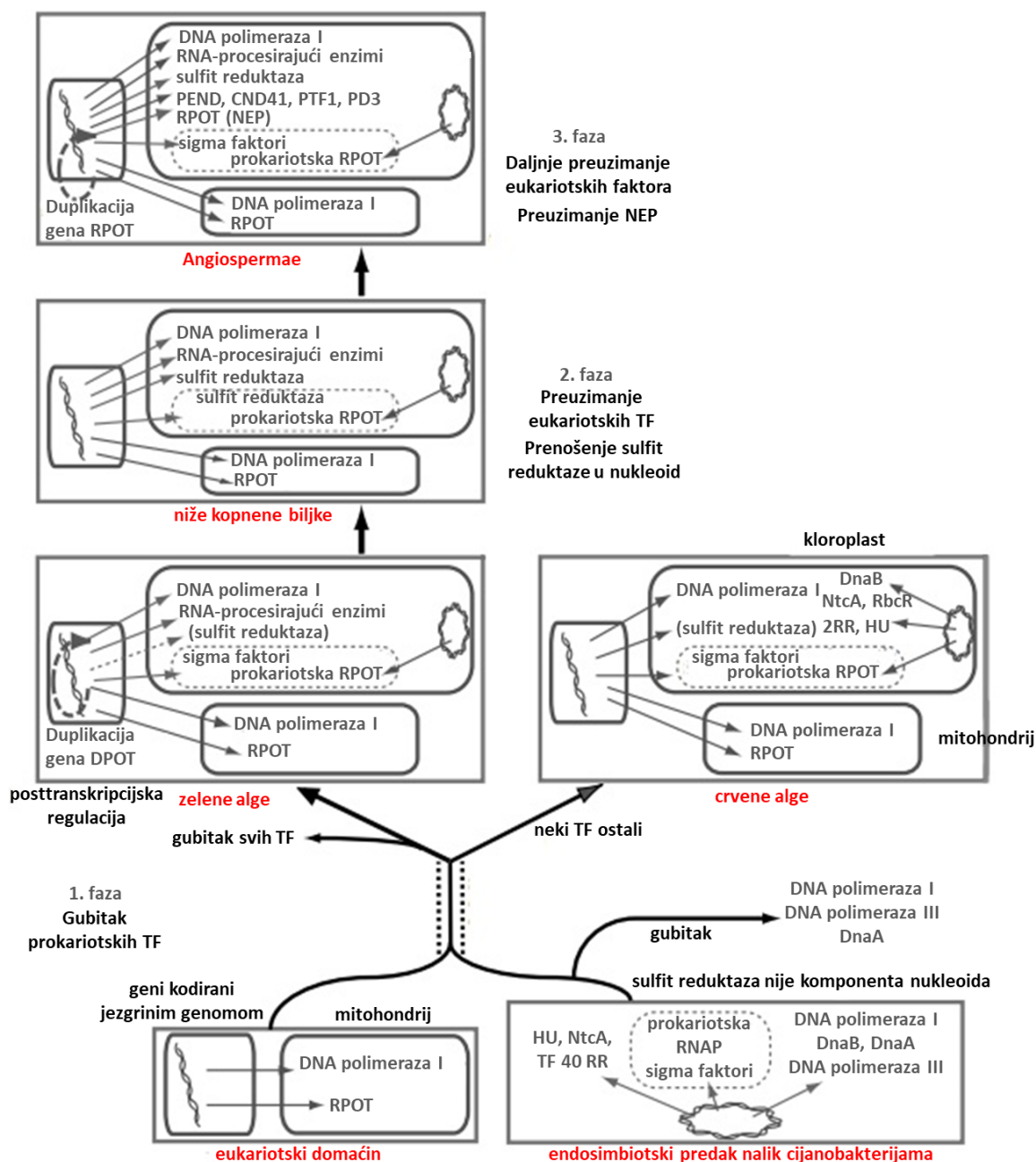
kodirana jezgrinom DNA (engl. *nucleus-encoded polymerase*, NEP) i sastoji se od jedne podjedinice od 110 kD koja podsjeća na RNA polimerazu faga T3 i T7. (Wise & Hooper, 2006) Gen *RpoT* koji kodira za NEP formiran je duplikacijom jezgrinog gena koji kodira za mitohondrijsku RNA-polimerazu. (Kusnetsov, 2018)

Promotori polimeraze PEP slični su bakterijskim σ^{70} promotorima i sadrže -35 (TTGACA) i -10 (ATTAAT) konsenzus elemente. S druge strane promotori polimeraze NEP često sadrže tzv. YRTA konsenzus sekvence. (Wise & Hooper, 2006) Kompliciranom regulacijom transkripcije kod plastida, do koje je došlo zbog velike kompleksnosti transkripcijskog aparata kloroplasta, omogućena je vrlo precizna regulacija ekspresije gena na transkripcijskoj razini. (Kusnetsov, 2018) Tako su geni razreda I (uglavnom fotosintetski geni) transkribirani isključivo polimerazom PEP, geni razreda II (kodiraju gene uključene u regulaciju ekspresije gena) transkribirani su aktivnošću polimeraza PEP i NEP, dok su geni razreda III transkribirani aktivnošću polimeraze NEP. (Sato i ostali, 2003) Većina transkripcijskih faktora (TF) uključenih u transkripciju iz primarnog endosimbionta je izgubljena, a kako bi se kompenzirao gubitak TF i velikog dijela prokariotskih regulacijskih sustava, od domaćina je preuzet sustav za modifikaciju molekule RNA. Prema Sato i sur. (2003) taj gubitak predstavlja prvu fazu evolucije plastidne genetičke mašinerije. Druga faza evolucije sastoji se od velikog uvoza proteinskih faktora iz stanice domaćina, te se kao najvažniji izdvaja sulfit reduktaza, najvažniji DNA-vezujući protein u kloroplastima, koji je funkcionalnu ulogu preuzeo od glavnog bakterijskog DNA-vezujućeg proteina HU (engl. *histone-like protein*, protein nalik histonima). (Sato i ostali, 2003)

No, zbog premještanja većine gena iz cpDNA u jezgrin genom i smanjenja transkripcije u kloroplastima, tijekom evolucije naglasak se stavio na posttranskripcijsku regulaciju ekspresije plastidnih gena. Na posttranskripcijskoj razini kontrola se događa na nivou stabilnosti transkripta, translaciji i stabilnosti proteina i aktivnosti. (Kusnetsov, 2018) Mehanizmi procesiranja mRNA također uvelike sliče mehanizmima koji su prisutni kod bakterija, a važni su jer se više od polovice plastidnih gena se nalazi u operonima. (Wise & Hooper, 2006) Razlikuju se tri glavne faze sazrijevanja molekule mRNA: prekrajanje, uređivanje i sazrijevanje 5'- i 3'-kraja. Neki plastidni geni u svojoj strukturi osim kodirajućih sekvenci sadrže i nekodirajuće dijelove, introne, koji se moraju izrezati mehanizmom prekrajanja (*splicing*) kako bi se dobila funkcionalna mRNA. U cpDNA pojavljuje se jedan intron grupe I i oko 20 introna grupe II. Intron grupe I nalazi se u genu *trnL-UAA* i predstavlja najstariji intron u genomu kloroplasta. Prekrojanje je omogućeno proteinima kodiranim u jezgri i kloroplastu koji kataliziraju reakcije prekrojanja i mogu imati funkciju kao RNA-

šaperoni. Kloroplasti također imaju mehanizam koji omogućuje mijenjanje sekvence transkripta, proces nazvan uređivanje RNA. U kloroplastima se događaju dvije vrste zamjena, odnosno tranzicije $C \rightarrow U$ i $U \rightarrow C$ i taj je mehanizam često ključan za pravilnu inicijaciju translacije ili popravak mjesta važnog za terminaciju translacije. Zadnji korak je sazrijevanje 5' i 3' krajeva RNA. Transkripti na 5' kraju budu najčešće cijepani 5'-3' egzonukleazama. Za razliku od bakterija, gdje se poliA-rep dodaje aktivnošću poli-A polimeraze, u plastidima tu funkciju vrši plastidna polinukleotid fosforilaza. (Kusnetsov, 2018) Ovakve molekule RNA nakon procesiranja su funkcionalno aktivne i mogu biti translatirane i sudjelovati u biosintezi proteina.

Strogo kontrolirana regulacija ekspresije plastidnih gena važna je iz više razloga. Najvažniji razlog je usklađivanje ekspresije gena za podjedinice proteina koji sadrže podjedinice kodirane jezgrinim i plastidnim genomom. Kako je unutar kloroplasta cpDNA prisutna u velikom broju kopija, da se geni transkribiraju sa svake kloroplastne kopije, došlo bi do nesrazmjera u količini proteina u odnosu na proteine kodirane jezgrinim genomom, čiji geni najčešće dolaze samo u jednoj kopiji. Na primjer, enzim RUBISCO sastoji se od osam velikih i osam malih podjedinica. Postoje četiri gena koji kodiraju za malu podjedinicu enzima RUBISCO, a nalaze se u jezgrinom genomu, dok se geni koji kodiraju za veliku podjedinicu nalaze u cpDNA. cpDNA dolazi u velikom broju kopija i zbog toga geni koji kodiraju za male podjedinice RUBISCO-a u stanici imaju oko 10 000 kopija, dok geni koji kodiraju za veliku podjedinicu u stanici dolaze u samo četiri kopije, što dovodi do velikog nesrazmjera u broju gena koji će u konačnici kodirati za jedan kompleksni protein. Način na koji je postignuta razina kontrole koja omogućava normalnu ekspresiju gena u jezgri i kloroplastima i dalje nije razjašnjena. (Sato i sur., 2003)



Slika 6. Shematski prikaz evolucije sustava za regulaciju ekspresije gena u plastidima. Postanak pretka fotosintetskih eukariota dogodio se endosimbiozom između eukariota s mitohondrijem i endosimbiotskog pretka nalik današnjim cijanobakterijama (prikazano na dnu). Kao ključni DNA-vezujući protein u kloroplastima algi i nižih biljaka označena je sulfat reduktaza, koja je funkcionalno zamijenila protein HU, koji je tu funkciju izvodio u endosimbiotskom pretku. Preuzeto i prilagođeno prema Sato i sur. (2003).

4. 2. BIOSINTEZA PROTEINA U KLOROPLASTIMA

Kloroplastni 70S ribosomi sličje bakterijskim po veličini, sastavu molekula RNA i proteina i osjetljivosti na slične antibiotike. Većina homologa proteina koji grade ribosome

kloroplasta pronađeni su u bakterijama, ali nekoliko polipeptida su jedinstveni za kloroplaste. Na primjer, u špinatu (*Spinacia oleracea* L.), 30S ribosomska podjedinica sadrži 25 proteina, od kojih su 21 ortolozi ribosomskih proteina *E. coli*, a preostala četiri su proteini specifični za plastide. Ribosomska podjedinica 50S sadrži 33 proteina, od kojih su dva specifična za plastide. (Wise & Hooper, 2006) Čak trećina proteina koji grade ribosome kloroplasta kodirani su u kloroplastu, dok je ostatak kodiran jezgrinom DNA. (Cooper & Hausman, 2007) Geni koji kodiraju za molekule rRNA nalaze se unutar jednog operona koji se naziva *rrn* u sklopu cpDNA. Plastidne mRNA sadrže Shine-Dalgarno sekvencu na 5' regiji, a u inicijaciji translacije sudjeluju inicijacijski faktori IF1, IF2 i IF3 koji se razlikuju od prokariotskih. Plastidi, za razliku od mitohondrija, koriste standardni genetički kod. (Kusnetsov, 2018) Druge radikalne razlike između translacijskih sustava cijanobakterija i kloroplasta nisu uočene. (Sato i sur., 2003)

Iako je većina gena iz cpDNA tijekom evolucije premještena u jezgrin genom, spektar proteina potrebnih za funkcioniranje kloroplasta nije se uvelike promijenio tijekom evolucije, zbog toga što se kloroplastni proteini sintetizirani u citosolu vraćaju u kloroplast. Većina kloroplastnih proteina kodirani su jezgrirom genomom i translatirani na 80S ribosomima u citosolu te preneseni translokacijskim sustavom TOC/TIC u kloroplast, a dio je kodiran plastidnom mašinerijom za ekspresiju plastidnih gena. Fotosintetski kompleksi se onda sklapaju od proteina međusobno sintetiziranih u različitim staničnim odjeljcima i tvore funkcionalne komplekse. (Alberts, 2015)

Promet proteina između citosola i kloroplasta je najvjerojatnije jednosmjernan, odnosno proteini sintetizirani u citosolu prenose se u kloroplaste, međutim proteini sintetizirani u kloroplastu normalno se ne prenose u citosol. (Alberts, 2015) Iznimke se događaju u stresnim uvjetima, kada se proteini prenose iz plastida u jezgru kao brzi odgovor na stres uzrokovan napadom patogena. (Kabeya i sur., 2010)

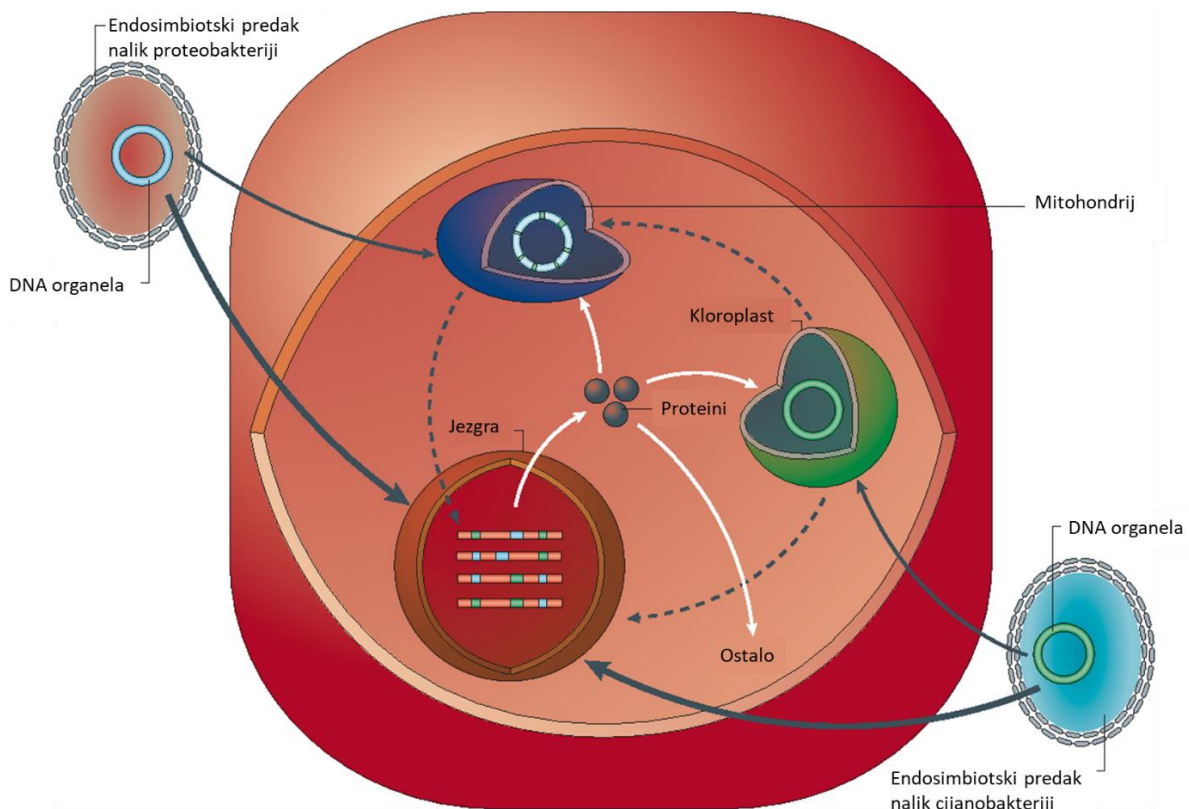
4. 3. PRIJENOS KOROPLASTNIH GENA U JEZGRIN GENOM

Kao što je već navedeno, tijekom evolucije došlo je do intenzivnog prijenosa gena iz organela u jezgrinu DNA. To je otkriveno puno prije nego što je sekvenciran prvi kloroplastni genom. Dokazi za prijenos DNA dobiveni su pomoću metode *southern blotting*, opažanjem sekvenci visoke homologije u kloroplastnom i jezgrinom genomu. (Scott & Timmis, 1984) Nalazi homolognih sekvenci doveli su do nastanka termina „promiskuitetna DNA“ za onu molekulu DNA koja se pojavljuje u više od jednog genetičkog kompartimenta eukariotske

stanice, kako bi se naglasila mobilnost molekule DNA između različitih genetičkih i staničnih odjeljaka. (Timmis i ostali, 2004) Takav uspješan prijenos gena iz kloroplasta u jezgrin genom je zapravo rijedak događaj, zato što se geni moraju prilagoditi na transkripciju u jezgri i translaciju u citoplazmi, procese za koje geni iz kloroplasta isprva nemaju predispozicije. (Alberts, 2015) Kako bi gen prenesen iz kloroplasta bio funkcionalan, treba dobiti različite regulatorne elemente, kao što je promotor kojeg prepoznaje jezgrina RNA polimeraza, signal za poliadenilaciju i slično. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018) Također, kako bi protein nakon sinteze u citosolu mogao biti usmjeren u kloroplast, mora sadržavati signalni peptid. (Alberts, 2015) No, nakon prenošenja u jezgru, geni ne moraju odmah poprimiti jezgrine regulatorne elemente. Oni mogu ostati u jezgrinom genomu više milijuna godina i dugotrajnom evolucijom i brojnim genomskim rearanžmanima postati funkcionalni geni. (Rousseau-Gueutin i sur., 2011) No, neki geni mogu biti transkribirani jezgrinom RNA-polimerazom čak i ako ne sadrže karakterističnu eukariotsku promotorsku sekvencu koju prepoznaje jezgrina RNA-polimeraza, već je uočeno da inicijacija transkripcije moguća i na nekim promotorima karakterističnima za gene u cpDNA koje normalno transkribiraju plastidne RNA-polimeraze. (Cornelissen & Vandewiele, 1989) Slično, utvrđeno je da su neki signalni peptidi vjerojatno porijeklom od cijankobakterija, odnosno nisu eukariotskog podrijetla, a omogućuju lokalizaciju proteina u kloroplast. (Bruce, 2000)

Korištenjem različitih metoda, otkriveno je da jezgrin genom u različitim biljkama sadrži velike dijelove kloroplastne DNA, tzv. *nupts* (*nuclear integrant of plastid DNA*). na različitim lokacijama u jezgrinom genomu Ti dijelovi često su veliki kao cijeli genom kloroplasta, ali ne sadrže jednaku homologiju s homolognim sekvencama kloroplastne DNA, što znači da je kloroplastna DNA premještena u jezgru više puta tijekom evolucije. (Ayliffe & Timmis, 1992) Dokazano je da se integracija cpDNA u jezgrinu DNA događa mehanizmom nehomolognog spajanja krajeva (*non-homologous end joining*, NHEJ). Zbog velike učestalosti prijenosa cpDNA u jezgru, pretpostavlja se da zbog sprječavanja povećanja genoma, većina prenesenih dijelova cpDNA bude uklonjena iz jezgrinog genoma. Uistinu, pokusima je dokazano da je zbog genomske nestabilnosti već u nekoliko generacija došlo do gubitka dijelova integrirane cpDNA tijekom mitoze te su također dokazani gubitci integrirane cpDNA tijekom mejoze. (Sheppard & Timmis, 2009) Dosad je najveći fragment cpDNA prenesen u jezgru pronađen kod riže (*Oryza sativa* L.) i njegova veličina iznosi 131 kb, što gotovo u potpunosti odgovara veličini cpDNA riže (97,4%). (Matsuo i sur., 2005) Najviše je istraživanja ujedno napravljeno na riži kao modelnoj biljci te je utvrđeno da je najviše fragmenata cpDNA integrirano u pericentromernim regijama kromosoma. Također, otkriveno je da je tijekom

evolucije došlo do cijepanja, miješanja i eliminacije više od 80% fragmenata cpDNA koji su bili preneseni u jezgru u milijun godina nakon prvotne integracije cpDNA u jezgrin genom. Posljedično, najveći fragmenti cpDNA preneseni u jezgru su i evolucijski najmlađi, a najkraći su evolucijski najstariji. (Richly & Leister, 2004) Kod riže, poluvrijeme života fragmenata cpDNA prenesenih u jezgru procijenjeno je na 0,5 milijuna godina za fragmente čija je veličina veća od 1,6 kb te 2,2 milijuna godina za fragmente kraće od 1,6 kb. No, ti rezultati ne mogu se uzeti kao generalno pravilo jer se između različitih taksona pojavljuju brojne razlike. (Matsuo i sur., 2005)



Slika 7. Shematski prikaz mobilnosti molekule DNA između različitih organela. Označeno je prenošenje gena iz genoma pretka mitohondrija u jezgru i genoma pretka kloroplasta u jezgru što je dovelo do njihove ovisnosti o jezgrinom genomu. Iscrtkance strelice predstavljaju dijelove genoma koji se kontinuirano prenose u jezgrin genom. Također, unutar mitohondrijskog genoma pronađene su sekvence porijeklom iz kloroplasta i jezgre, no nije pronađeno da je mtDNA prenošena u kloroplast u većoj mjeri. Preuzeto i prilagođeno prema Timmis i sur., 2004.

Geni preneseni u jezgru iz kloroplasta mogu s druge strane dobiti novu funkciju i lokalizaciju. Dokazano je da za oko 18% gena iz vrste *A. thaliana* koji su porijeklom iz endosimbiotskog pretka, njihovi produkti nisu lokalizirani u kloroplastu, što sugerira da su

zadržali svoju funkciju, ali na nekoj drugoj lokaciji u stanici ili da su dobili novu funkciju, što je grafički može vidjeti na Slici 7. (Martin i sur., 2002) Iz toga se može zaključiti da je genom kloroplasta tijekom evolucije služio kao bogat izvor genetičkog materijala i da je endosimbioza dovela do mnogih funkcionalnih noviteta. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018)

4. 4. RAZLOZI ZADRŽAVANJA KLOROPLASTNOG GENOMA

Razlozi za održavanje relativno skupog sustava paralelnog zadržavanja kloroplastnog i jezgrinog genoma nisu posve jasni. Više od 90 proteina – kao što su ribosomski proteini, aminoacil-tRNA-sintetaze, DNA polimeraze, RNA polimeraze, proteini za doradu RNA – moraju biti sintetizirani u jezgri samo za svrhu održavanja ekspresije kloroplastnih gena. Činjenica je da je redukcija genoma kloroplasta još uvijek u tijeku, a za sada nema alternative za stanicu nego da održava različite genetičke sustave za jezgrine i kloroplastne genome, no istraživanja ipak pokazuju da selekcija podržava opstanak zasebnog kloroplastnog genoma. (Alberts, 2015; Wicke i sur., 2011) Moguće objašnjenje leži u vrlo hidrofobnoj prirodi neribosomskih proteina kodiranih genima kloroplasta. Taj razlog bi sintezu i unos iz citoplazme u organel učinio prekomplikiranim i vrlo energentski skupim za stanicu. (Alberts, 2015)

Druga teorija govori da je razlog zadržavanja genoma kloroplasta kao zasebnog genomskog elementa održavanje redoks potencijala organela. Ta teorija, poznata kao hipoteza CORR (engl. *co-location for redox regulation*) objašnjava kako individualni organeli zadržavaju sposobnost ekspresije gena koja ovisi o redoks potencijalu. (Timmis i sur., 2004) Svaki gen koji je pod redoks kontrolom je pod selekcijskim pritiskom da ostane eksprimiran samo unutar kloroplasta, a razlog tome su energetska učinkovitost i zaštita od potencijalnog prijenosa elektrona na pogrešnim supstratima do kojeg bi moglo doći ukoliko bi se ti proteini sintetizirali u citosolu. Obje strane za svoje teorije imaju dobre eksperimentalne dokaze, što dodatno dodaje kontroverziji ove tematike. (Allen, 2003)

Genomi kloroplasta su visoko konzervirani, s relativno malom učestalošću mutacija te posljedično evoluiraju desetak puta sporije od jezgrinog genoma. (Wolfe i sur., 1987) Zbog sporije evolucije genoma kloroplasta, s druge strane, neki geni su zadržani u kloroplastnom genomu i jezgrinom genomu, te ukoliko jezgrina kopija gena izgubi funkcionalnost zbog veće stope mutacija, postoji druga kopija gena u cpDNA koja se opet može ugraditi u jezgrin genom i tako spriječiti gubitak gena. To je potencijalno jedan od razloga zadržavanja kloroplastnog genoma. (Rousseau-Gueutin i sur., 2018)

Unatoč nejednoznačnom rješenju problema zadržavanja kloroplastnog genoma, kloroplasti predstavljaju sustav koji je ostao dosljedan svojim prokariotskim precima – to su vrlo adaptivni sustavi koji vrlo dobro odgovaraju na okolišne promjene i vjerojatno je upravo to razlog zadržavanja odvojenog genoma. (Allen, 2003)

5. ZAKLJUČAK

Otkriće kloroplastne DNA otvorilo je nova područja istraživanja evolucije živog svijeta i postanka eukariotske stanice. Porastom upotrebe tehnika sekvenciranja prije više od četrdeset godina, dokazano je da se u jezgrinim genomima nalaze sekvence homologne sekvencama iz genoma kloroplasta. To je dovelo do zaključka da je tijekom evolucije eukariota došlo do prijenosa gena iz genoma kloroplasta u jezgru, a mnogi od njih postali su funkcionalne kopije kloroplastnih gena u jezgri koje su kompetirale s genima iste funkcije u kloroplastima, što je u konačnici dovelo do redukcije veličine genoma kloroplasta i smanjenja njegove autonomnosti. No, prijenos gena iz primarnog endosimbionta imao je također velik učinak na povećanje kompleksnosti jezgrinog genoma, a danas tu kompleksnost vidimo u gotovo 400 000 vrsta algi i biljaka.

Postavljaju se pitanja je li prijenos gena iz endosimbionta proces koji je evolucijski značajan samo za neke evolucijske linije ili mehanizam koji je nepovratno oblikovao sve današnje eukariotske organizme. Kao dugotrajan, široko raširen i dalje aktualan proces koji je sve više istraživani i razvojem suvremenih metoda stanične i molekularne biologije postao direktno vidljiv, sve se više otvaraju vrata za daljnji razvoj i istraživanje evolucijskih mehanizama koji su omogućili pojavu biljaka i važnost tih mehanizama u stvaranju ovako heterogenog biokemijskog organizacijskog sustava kao što je kloroplast.

Danas nam kloroplastna DNA daje dobar uvid u evoluciju biljnog svijeta i omogućava bolje praćenje evolucijskih događaja koji su se događali tijekom milijuna godina prilikom kojih su divergirale glavne evolucijske grane biljaka. Također, tematika kloroplastne DNA i prijenosa gena iz kloroplasta u jezgru važna je i za istraživanja usmjerena na genetički modificirane (GM) biljke, što ovom području daje dodatan značaj. Istraživanja u ovom području su i dalje u tijeku i predstavljaju velik potencijal za šire korištenje GM biljaka i rješavanje problema gladi koje je jedno od primarnih zadataka biljne biologije. No, unatoč vrlo obećavajućim primjenama i fundamentalnim spoznajama koje proizlaze iz istraživanja DNA kloroplasta i povezanih procesa, i dalje se nedovoljno zna o toj tematici te su potrebni daljnji naponi da se ovo područje biologije sveobuhvatno istraži.

6. LITERATURA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular biology of the cell. *Garland Science*. New York.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. *Garland Science*. New York.
- Allen, J. F. (2003). Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comparative and functional genomics*, 4(1), 31-36.
- Ayliffe, M. A., & Timmis, J. N. (1992). Tobacco nuclear DNA contains long tracts of homology to chloroplast DNA. *Theoretical and applied genetics*, 85(2-3), 229-238.
- Bruce, B. D. (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends in cell biology*, 10(10), 440-447.
- Cerutti, H., Ibrahim, H. Z., & Jagendorf, A. T. (1993). Treatment of pea (*Pisum sativum* L.) protoplasts with DNA-damaging agents induces a 39-kilodalton chloroplast protein immunologically related to *Escherichia coli* RecA. *Plant physiology*, 102(1), 155-163.
- Chumley, T. W., Palmer, J. D., Mower, J. P., Fourcade, H. M., Calie, P. J., Boore, J. L., & Jansen, R. K. (2006). The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium hortorum*: organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants. *Molecular biology and evolution*, 23(11), 2175-2190.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). The cell: A molecular approach. 2nd Edition. *Sinauer Associates*.
- Cornelissen, M., & Vandewiele, M. (1989). Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid psb A promoter. *Nucleic acids research*, 17(1), 19-29.
- Deusch, O., Landan, G., Roettger, M., Gruenheit, N., Kowallik, K. V., Allen, J. F., Martin, W., & Dagan, T. (2008). Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Molecular biology and evolution*. 25(4), 748-761.
- Falcón, L. I., Magallón, S., & Castillo, A. (2010). Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *The ISME journal*, 4(6), 777-783.
- Guisinger, M. M., Kuehl, J. V., Boore, J. L., & Jansen, R. K. (2008). Genome-wide analyses of Geraniaceae plastid DNA reveal unprecedented patterns of increased nucleotide substitutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), 18424-18429.
- Kabeya, Y., Nakanishi, H., Suzuki, K., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., & Miyagishima, S. Y. (2010). The YlmG protein has a conserved function related to the distribution of

- nucleoids in chloroplasts and cyanobacteria. *BMC plant biology*, 10(1), 57.
- Keller, J., Rousseau-Gueutin, M., Martin, G. E., Morice, J., Boutte, J., Coissac, E., Ourari, M., Aïnouche, M., Salmon, A., Cabello-Hurtado, F., & Aïnouche, A. (2017). The evolutionary fate of the chloroplast and nuclear rps16 genes as revealed through the sequencing and comparative analyses of four novel legume chloroplast genomes from *Lupinus*. *DNA research*, 24(4), 343-358.
- Kusnetsov, V. V. (2018). Chloroplasts: Structure and expression of the plastid genome. *Russian journal of plant physiology*, 65(4), 465–476.
- Magee, A. M. (2002). Plastid genes transcribed by the nucleus-encoded plastid RNA polymerase show increased transcript accumulation in transgenic plants expressing a chloroplast-localized phage T7 RNA polymerase. *Journal of experimental botany*, 53(379), 2341-2349.
- Magee, Alan M., Aspinall, S., Rice, D. W., Cusack, B. P., Sémon, M., Perry, A. S., Stefanović, S., Milbourne, D., Barth, S., Palmer, J. D., Gray, J. C., Kavanagh, T. A., & Wolfe, K. H. (2010). Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes. *Genome research*, 20(12), 1700-1710.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., & Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12246–12251.
- Matsuo, M., Ito, Y., Yamauchi, R., & Obokata, J. (2005). The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *Plant cell*, 17(3), 665-675.
- McFadden, G. I., & van Dooren, G. G. (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Current biology*, 14(13), R514-R516.
- Mereschkowsky, K. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches centralblatt*, 25, 293-604.
- Muñoz-Gómez, S. A., Mejía-Franco, F. G., Durnin, K., Colp, M., Grisdale, C. J., Archibald, J. M., & Slamovits, C. H. (2017). The new red algal subphylum Proteorhodophytina comprises the largest and most divergent plastid genomes known. *Current biology*, 27(11), 1677-1684.
- Oldenburg, D. J., & Bendich, A. J. (2004). Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *Journal of molecular biology*, 335(4),

953-970.

- Palmer, J. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual review of genetics*, 19(1), 325–354.
- Powikrowska, M., Oetke, S., Jensen, P. E., & Krupinska, K. (2014). Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids. *Frontiers in plant science*, 5, 424.
- Richly, E., & Leister, D. (2004). NUPTs in sequenced eukaryotes and their genomic organization in relation to NUMTs. *Molecular biology and evolution*, 21(10), 1972-1980.
- Ris, H., & Plaut, W. (1962). Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *The Journal of cell biology*, 13(3), 383-391.
- Rousseau-Gueutin, M., Ayliffe, M. A., & Timmis, J. N. (2011). Conservation of plastid sequences in the plant nuclear genome for millions of years facilitates endosymbiotic evolution. *Plant physiology*, 157(4), 2181-2193.
- Rousseau-Gueutin, M., Keller, J., Ferreira de Carvalho, J., Ainouche, A., & Martin, G. (2018). The intertwined chloroplast and nuclear genome coevolution in plants. *Plant growth and regulation - Alterations to sustain unfavorable conditions*. IntechOpen.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology*, 14(3), 225-262.
- Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K., & Kabeya, Y. (2003). Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *International review of cytology*, 232, 217–262.
- Scott, N. S., & Timmis, J. N. (1984). Homologies between nuclear and plastid DNA in spinach. *Theoretical and applied genetics*, 67(2-3), 279-288.
- Sheppard, A. E., & Timmis, J. N. (2009). Instability of plastid DNA in the nuclear genome. *PLoS genetics*, 5(1), e1000323.
- Timmis, J. N., Ayliff, M. A., Huang, C. Y., & Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature reviews genetics*, 5(2), 123–135.
- Wicke, S., Schneeweiss, G. M., dePamphilis, C. W., Müller, K. F., & Quandt, D. (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function. *Plant molecular biology*, 76(3–5), 273–297.
- Wise, R. R., & Hooper, J. K. (Eds.) (2007). The structure and function of plastids (Vol. 23). *Springer Science & Business Media*.
- Wolfe, K. H., Li, W. H., & Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 84(24), 9054-9058.

Zimorski, V., Ku, C., Martin, W. F., & Gould, S. B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current opinion in microbiology*, 22, 38-48.

7. SAŽETAK

Kloroplasti su organeli biljnih stanica čija je glavna uloga provođenje fotosintetskih procesa, a nastali su endosimbiotskim događajem između autotrofne bakterije i eukariotskog pretka koji je sadržavao mitohondrij. Zbog svog prokariotskog porijekla, kloroplasti i danas sadrže brojne osobine karakteristične za prokariotske organizme, a među najbitnijima je genom kloroplasta. U ovom seminarskom radu predstavljen je sadržaj genoma kloroplasta i osnovni genetički mehanizmi koji se događaju u kloroplastima. Struktura gena i regulacija ekspresije gena kloroplasta uvelike slični onoj kod prokariota, ali tijekom evolucije je kloroplastni genom dobio i brojne karakteristike eukariotskog genoma, zbog čega predstavlja kimerni genetički sustav. Tijekom evolucije, kloroplastni genom pretrpio je veliku redukciju u veličini i danas je sveden na veličinu plazmida. Redukcija sadržaja kloroplastnog genoma posljedica je prijenosa gena iz kloroplasta u jezgri genoma, prilikom čega je jezgrina kopija gena zamijenila kloroplastnu koja je vremenom postala nefunkcionalna. Posljedično, kloroplastni proteini sintetizirani u citosolu usmjeravaju se u kloroplast specifičnim signalnim sekvencama ili dobivaju nove funkcije koje mogu obavljati u citosolu ili mitohondriju. Time je kloroplastni genom povećao kompleksnost eukariotskih stanica i doveo do funkcionalnih noviteta koji su omogućili bolja selekcijska svojstva. U algama i nižim biljkama sadržaj kloroplastnog genoma je velik i odmicanjem prema odvedenijim linijama biljaka bilježi se sve veća redukcija kloroplastnog genoma. No, postavlja se pitanje zašto nije došlo do potpune redukcije kloroplastnog genoma, što pokušavaju objasniti brojne teorije, od kojih nijedna zasad u potpunosti nije uspjela razjasniti fenomen zadržavanja više odvojenih genetičkih sustava u jednoj stanici, što ostavlja prostor za daljnja istraživanja koja će bolje rasvijetliti evolucijski značaj kloroplastnog genoma.

8. SUMMARY

Chloroplasts are plant cell organelles whose main role is carrying out photosynthetic processes that originated by an endosymbiotic event between autotrophic bacteria and a eukaryotic ancestor that already possessed mitochondria. Due to their prokaryotic origin, chloroplasts still contain numerous characteristics of their ancestors, and one of the most important is the chloroplast genome. This seminar presents the chloroplast genome content and fundamental genetic mechanisms that take place in chloroplasts. Gene structure and regulation of gene expression in chloroplasts closely resembles that of prokaryotes, but during evolution chloroplast genome also acquired numerous eukaryotic characteristics, which is why it is a chimeric genetic system. During the evolution, the chloroplast genome suffered a large reduction in size. The reduction of its content is the result of gene transfer from chloroplast to the nucleus genome and consequent functional replacement of chloroplast copy by the nuclear one. Consequently, chloroplast proteins synthesized in cytosol are routed into chloroplast by specific signalling sequences or acquire new functions in cytosol or mitochondria. This process increased the complexity of eukaryotic genome and led to functional novelties that enabled better selection advantages. In algae and lower plants, the chloroplast genome content is large and by moving towards the more advanced plant lineages, increasing reduction in chloroplast genome is observed. However, the question arises to why there has not been a complete reduction in chloroplast genome, which is explained by a number of theories, but none of which was able to fully clarify the phenomenon of retaining multiple separate genetic systems in a single cell, which leaves room for further research that will shed light on the evolutionary significance of the chloroplast genome.