

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PROMJENE U PROTEOMU PLASTIDA TIJEKOM PRETVORBE  
KLOROPLASTA U KROMOPLASTE**

**CHANGES IN PLASTID PROTEOME DURING CHLOROPLAST-  
TO-CHROMOLAST TRANSITION**

**SEMINARSKI RAD**

Borna Puljko

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2015

# SADRŽAJ

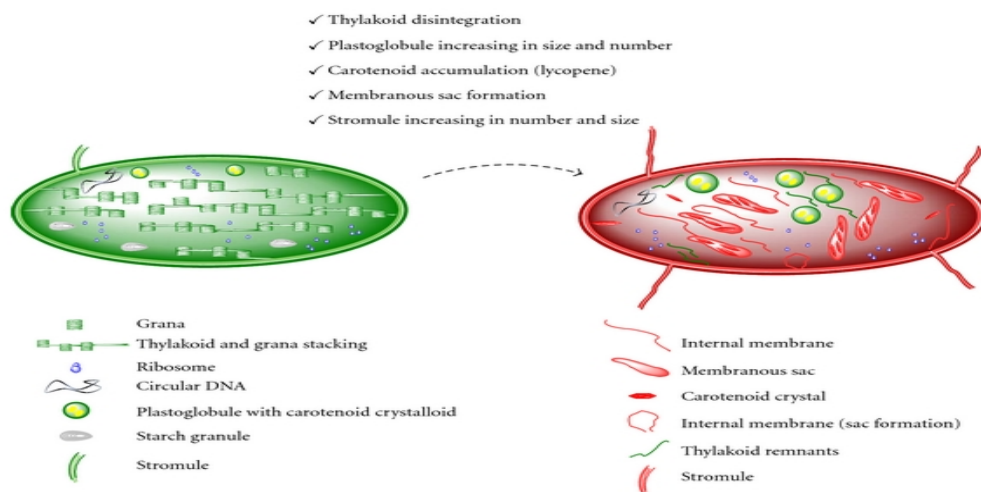
1. UVOD .....	2
2. PRETVORBA KLOROPLASTA U KROMOPLASTE .....	3
3. PROMJENE U PROTEOMU PLASTIDA PRI PRIJELAZU IZ KLOROPLASTA U KROMOPLASTE.....	8
3.1 Inventar proteina prisutnih u plastidima plodova tijekom pretvorbe kloroplasta u kromoplaste .....	8
3.2. Promjene u količini proteina tijekom pretvorbe kloroplasta u kromoplaste .....	9
3.3. Kinetičke promjene u funkcionalnim klasama proteina tijekom pretvorbe iz kloroplasta u kromoplaste .....	10
3.4.Pregled metaboličkih i regulatornih promjena tijekom pretvorbe kloroplasta u kromoplaste .....	12
4. LITERATURA.....	15
5. SADRŽAJ .....	17
6. SUMMARY .....	18

## UVOD

Kloroplasti i kromoplasti pripadaju u skupinu staničnih organela biljne stanice, plastida. Plastidi su organeli s brojnim esencijalnim funkcijama u biljnom metabolizmu. Izvode fotosintezu, biosintezu aminokiselina i masnih kiselina, te sintezu nekolicine sekundarnih metabolita. Svi plastidi potječu od nediferenciranih proplastida koji se nalaze u meristemskim tkivima (Wise, 2006). Kloroplasti su fotosintetski aktivni plastidi. Kromoplasti su plastidi koji akumuliraju pigmente u cvjetovima i plodovima, te time imaju važnu ulogu u reprodukciji i rasprostranjenju biljnih vrsta. Zrioba plodova vrlo je složen proces koji uključuje brojne strukturne i biokemijske promjene. Promjena boje plodova tijekom njihovog sazrijevanja jedna je od najvažnijih promjena. Zelena boja plodova prelazi u različite boje, ovisno o biljnoj vrsti. Promjena boje rezultat je smanjenja količine klorofila i akumulacije karotenoida. Navedene promjene posljedica su prijelaza iz kloroplasta u kromoplaste. Svi kromoplasti u stanici nastaju iz već postojećih kloroplasta (Waters i sur., 2004). Mikroskopske analize plastida u različitim stadijima diferencijacije potvrđuje nastanak kromoplasta iz jednog kloroplasta te da diferencijacija plastida tada prestaje. Na strukturnom nivou, diferencijacija kromoplasta sastoji se od razgradnje grana i stroma tilakoida (Spurr i Harris, 1968), ali uključuje i sintezu novih membrana iz unutarnje plastidne ovojnice, koje će služiti kao mjesta akumulacije karotenoida (Simkin i sur., 2007). Kvantitativna analiza proteoma plastida tijekom zriobe plodova daje bolji uvid u strukturne i metaboličke procese koji se događaju prilikom transformacije kloroplasta u kromoplaste.

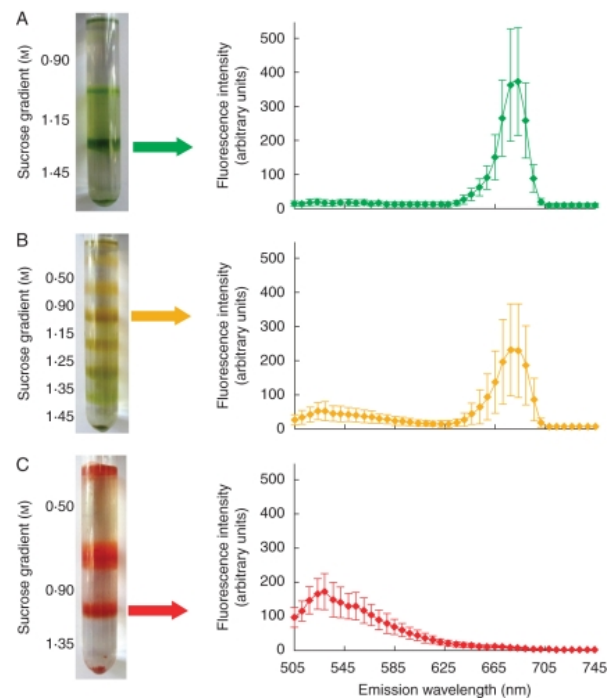
## 2. PRETVORBA KLOOROPLASTA U KROMOPLASTE

Zrioba plodova precizno je organiziran razvojni proces, karakterističan za biljke, a rezultira velikim fiziološkim i metaboličkim promjenama koje vode do truljenja plodova i rasprostranjivanja sjemena (Pirello, 2009). Plodovi omekšavaju, zalihe škroba se razgrađuju i u plodovima se nakupljaju različiti ugljikohidrati i pigmenti. Transformacija kloroplasta u kromoplaste događa se u vrijeme drugih promjena vezanih uz zriobu, ali za samu zriobu nije esencijalna (Dostal i Leopold, 1967). Diferencijacija kromoplasta uključuje važne strukturne, metaboličke i molekularne promjene (Bian i sur., 2011). Najvažnije promjene su razgradnja tilakoidnih membrana, razgradnja klorofila i biogeneza staničnih odjeljaka koji akumuliraju karotenoide (Slika 1). Mikroskopske analize pokazale su povećanje u broju i veličini plastoglobula tijekom tranzicije iz kloroplasta u kromoplaste, te promjene na grana i intergrana tilakoidima (Harris i Spurr, 1969). Plastoglobuli su lipoproteinske čestice koje akumuliraju karotenoide u obliku kristala ili fibrila (Devide i Ljubešić, 1977). Stromuli, produžetci plazmidne ovojnice koji omogućavaju komunikaciju između plastida i drugih staničnih odjeljaka, također se mijenjaju tijekom kromoplastogeneze (Köhler i Hanson, 2000). Zreli kromoplasti sadržavaju veći broj stromula u odnosu na kloroplaste, što znači da je izmjena metabolita između mreže plastida te plastida i citosola veća u kromoplasta u odnosu na kloroplaste.



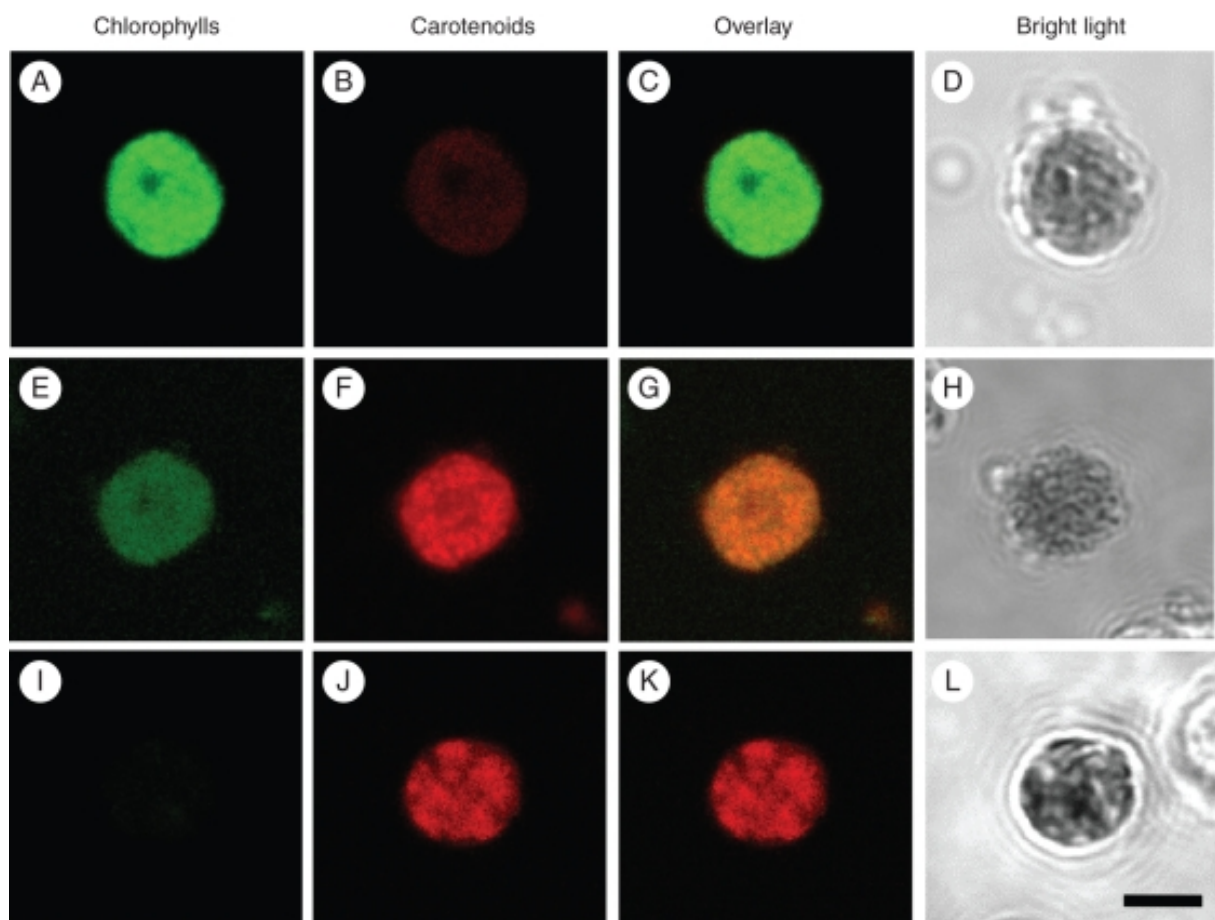
Slika 1. Shematski prikaz glavnih strukturnih promjena tijekom pretvorbe kloroplasta u kromoplaste. (Bian i sur., 2012)

Bian i sur. (2011) promatrali su pretvorbu kloroplasta u kromoplaste u plodu rajčice *Solanum lycopersicum* spektralnom konfokalnom mikroskopskom analizom karotenoida i klorofila u izoliranim plastidima, te snimanjem netaknutog živog tkiva tehnikom *time-lapse*. Karakterizacija pretvorbe posebno je fokusirana na prijelazne stadije. Plastidi su izolirani tijekom različitih stadija razvoja plodova (zeleni, poluzreli i zreli stadij), te razdvojeni u diskontinuiranim gradijentima saharoze. U zelenom stadiju zeleni plastidi lokalizirani su u jednoj frakciji. Fluorescentnom konfokalnom analizom plastida iz frakcije utvrđena je prisutnost klorofila, koji je karakterističan za kloroplaste (Slika 2.A). Plastidi izolirani iz plodova u poluzrelom stadiju razdvojili su se u četiri frakcije u gradijentu saharoze. Prisustnost različitih frakcija plastida s različitim obojenjima, od zelene do žute, ukazuje na to da se proces diferencijacije ne događa sinkronizirano. Konfokalna analiza frakcija pokazala da je samo jedna sadržavala prijelazni oblik između kloroplasta i kromoplasta (Slika 2.B). Utvrđeno je da frakcija sadržava smanjenu količinu klorofila i značajnu količinu karotenoida. Plastidi izolirani iz zrelih plodova razdvojili su se u jednu frakciju u gradijentu saharoze i sadržavali su isključivo karotenoide, koji su karakteristični za kromoplaste (Slika 2.C).



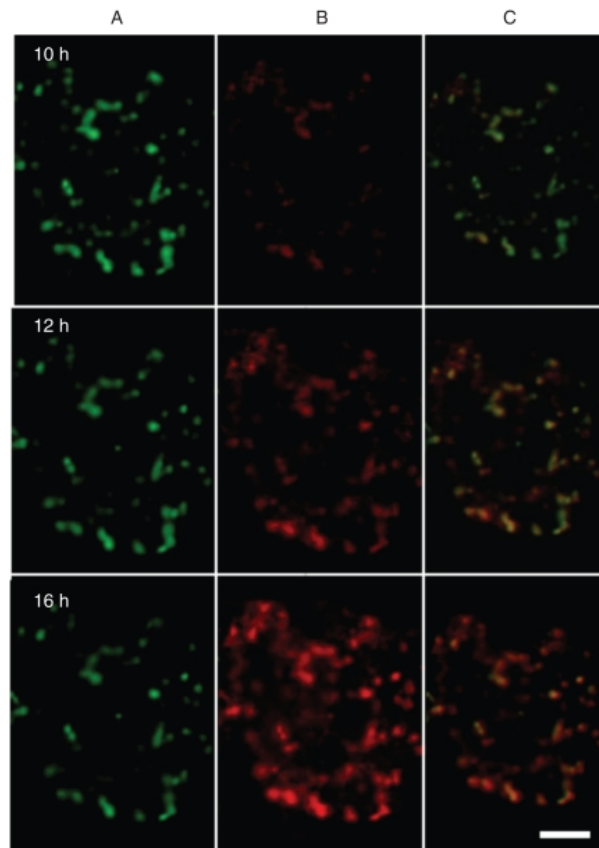
Slika 2. Razdvajanje plastida izoliranih iz plodova rajčice u tri stadija zriobe plodova, te pripadajući fluorescencijski emisijski spektri. Plastidne frakcije iz rajčica u zelenom, poluzrelom i zreлом stadiju analizirane su laserskim konfokalnim skenerom, kako bi se generirali fluorescencijski emisijski spektri pojedinih plastida. Pobudna valna duljina iznosila je 488 nm. Točke najviše emisije fluorescencije za karotenoide iznosile su 520 nm, dok su za klorofile iznosile 680 nm. (Egea i sur.,2011)

Promatranje pojedinih izoliranih plastida konfokalnim mikroskopom pružilo je bolji uvid u tranziciju na nivou pojedinačnog plastida (Slika 3.). Kloroplasti izolirani iz zelenih plodova (Slika 3.A-D), emitirali su fluorescenciju na valnim duljinama karakterističnim za klorofile. Plastid izoliran iz poluzrelog ploda (Slika 3.E-H), pokazuje fluorescencije na valnim duljinama karakterističnima i za klorofile i za karotenoide, dok su zreli kromoplasti izolirani iz zrelih plodova (Slika 3.I-L) emitirali fluorescenciju na valnim duljinama karakterističnima za karotenoide. Okrugli oblik plastida objašnjava nedostatak mikrofilamenata i mikrotubula, koji kontroliraju morfologiju plastida (Kwok i Hanson, 2003).



Slika 3. Slike plastida izoliranih iz tri stadija zriobe plodova rajčice dobivene konfokalnom mikroskopijom. Kloroplasti su izolirani iz zelenog, nezreli kromoplasti iz poluzrelog, a zreli kromoplasti iz zrelog ploda.(A), (E), i (I), odgovaraju fluorescenciji klorofila emitiranoj pri valnim duljinama od 650 do 750 nm.(B), (F), i (J) odgovaraju fluorescenciji karotenoida pri valnim duljinama od 500 do 600 nm.(C), (G), i (K) pokazuju preklapanje autofluorescencije karotenoida i klorofila. Fluorescencija klorofila prikazana je zeleno, dok je fluorescencija karotenoida prikazana crveno. (Egea i sur., 2011)

Kako bi se dobio potpuni uvid u slijed promjena tijekom promjene količine pigmenta, provedeno je snimanje tkiva mezokarpa rajčice *in situ* tehnikom *real-time* (Slika 4.) Tijekom tranzicije, fluorescencija karotenoida se konstantno povećavala tijekom 6 h (Slika 4.B). Proučavanjem tranzicije na staničnom nivou, u živom tkivu, vidljivo je da se tranzicija događa sinkronizirano, s većom sinkronijom između plastida jedne stanice, nego između stanica istog tkiva. Snimanjem tkiva utvrđeno je i da nije došlo do nastanka novih plastida, što potvrđuje nastanak kromoplasta iz već postojećih kloroplasta.

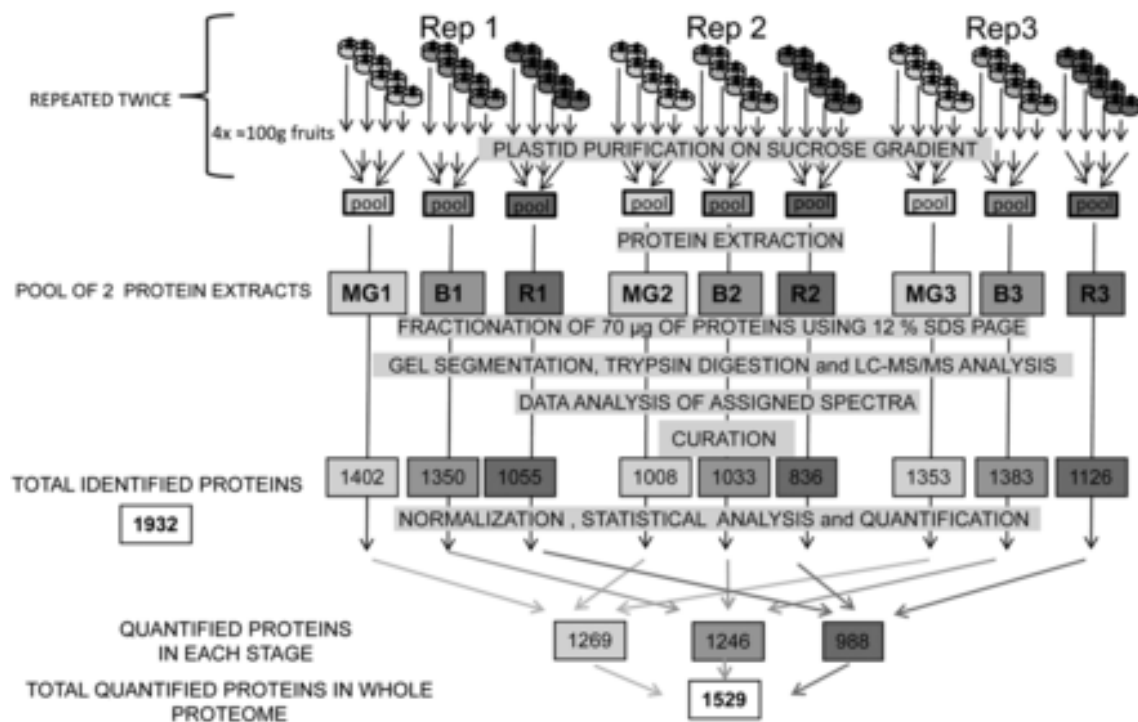


Slika 4. Prikazi promjena fluorescencije klorofila i karotenoida tehnikom *time-lapse*, dobiveni konfokalnom mikroskopijom plastida iz mezokarpa ploda rajčice tijekom ranih stadija tranzicije kloroplasta u kromoplaste. (A) fluorescencija klorofila, (B) fluorescencija karotenoida, (C) preklapanje slika tijekom 10, 12 i 16 h. Emitirana fluorescencija snimljena je u rasponu od 650 do 750 nm za klorofile i 500 do 600 nm za karotenoide. (Egea i sur., 2011)

### 3. PROMJENE U PROTEOMU PLASTIDA PRI PRIJELAZU IZ KLOROPLASTA U KROMOPLASTE

#### 3.1. Inventar proteina prisutnih u plastidima plodova tijekom pretvorbe kloroplasta u kromoplaste

Barsan i sur. (2012) proveli su kvantitativnu analizu proteoma kako bi proučili regulaciju metaboličkih i strukturnih promjena koje se događaju u plastidima plodova rajčice *Solanum lycopersicum*, pri pretvorbi kloroplasta u kromoplaste. Sažeti opis eksperimenta prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Sažeti opis eksperimenata korištenih u analizi proteoma. Plastidi iz četiri seta od četiri ploda izolirani su zasebno u tri neovisne replike (Rep1, Rep2, Rep3) za svaki razvojni stadij. Postupak je ponovljen dva puta i plastidi iz svakog stadija prikupljeni su za svaki eksperiment prije ekstrakcije proteina. Nakon normalizacije i statističke analize, broj proteina koji se može kvantificirati naveden je denominacijom ukupno kvantificiranih proteina. (Barsan i sur., 2012)

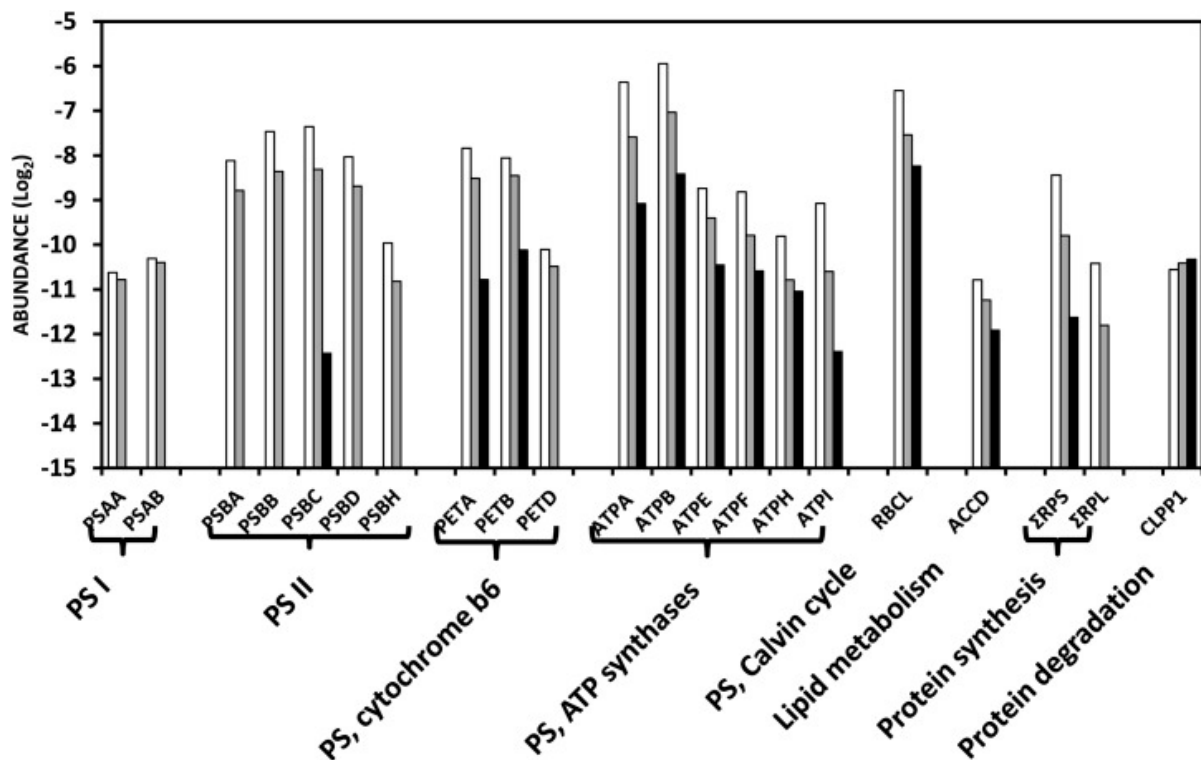
Provedena je analiza proteoma plastida izoliranih iz plodova rajčice, tijekom tri stupnja diferencijacije plastida. Prije normalizacije i statističke analize identificirana su 1932 proteina.



Korištenjem programa za predviđanje substancične lokalizacije proteina, te nakon uspoređivanja sa bazama podataka, u plastidima je utvrđen inventar od 1529 proteina.

### 3.2. Promjene u količini proteina tijekom pretvorbe kloroplasta u kromoplaste

Analiza proteoma (Barsan i sur., 2012) pokazala je promjenu u količini pojedinih proteina, koja odgovara metaboličkim promjenama koje se događaju tijekom prelaska iz kloroplasta u kromoplaste. Te promjene uključuju smanjenje proteina uključenih u fotosintezu i povećanje proteina uključenih u sintezu karotenoida. Slika 6. prikazuje promjenu u količini proteina između zelenog, poluzrelog i zrelog stadija zriobe plodova.

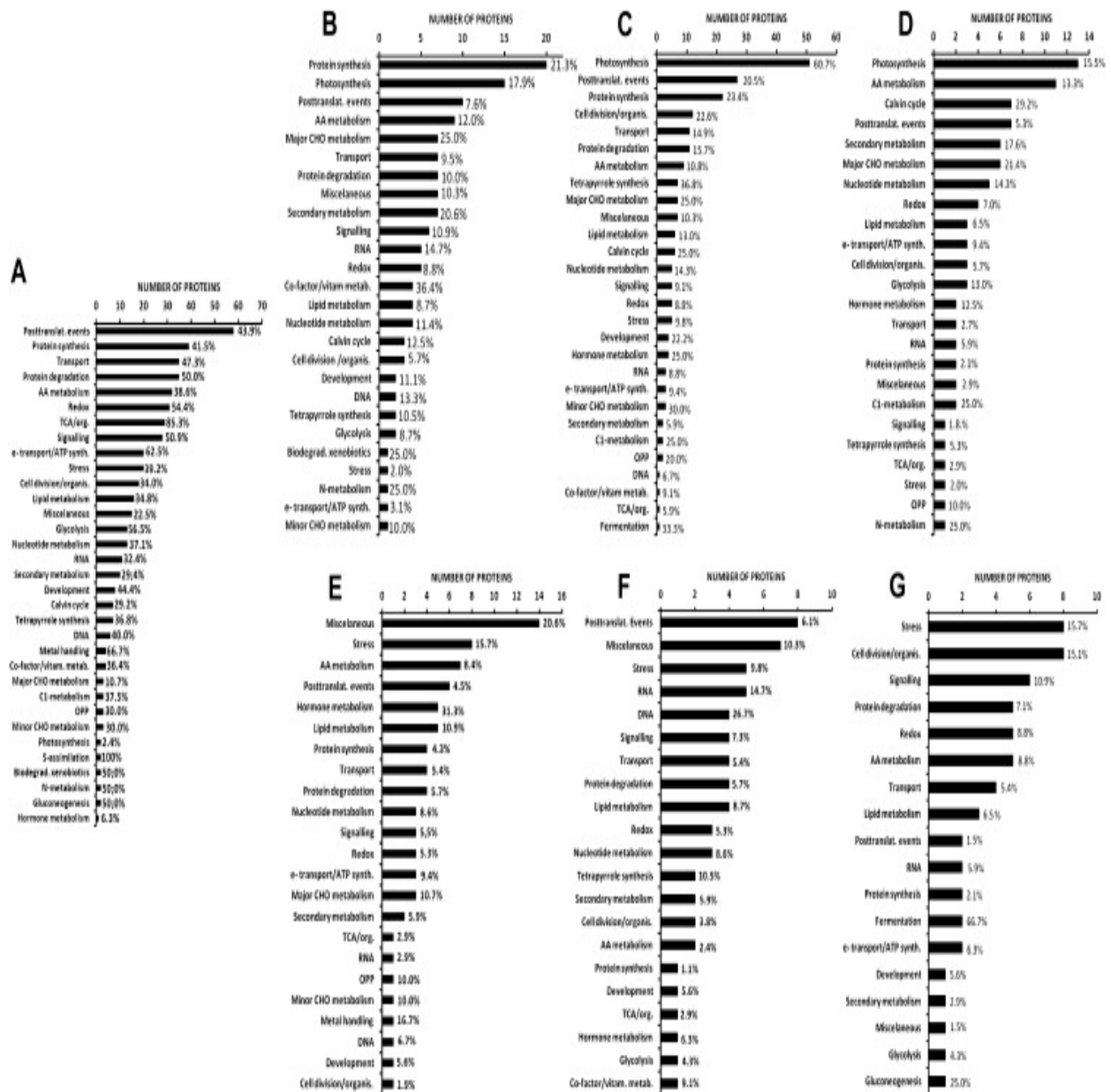


Slika 6. Prisutnost proteina kodiranih plastidnim genomom tijekom tri stadija razvoja proteina (zeleni - bijeli stupac; poluzreli - sivi stupac; zreli - crni stupac). Količina proteina prikazana je kao log<sub>2</sub>. PSA, PSB, PET i ATP odgovaraju podjedinicama proteina PSI, PSII, citokroma b6 i ATP sintaza. RBCL je velika podjedinica enzima RUBISCO. ACCD je podjedinica D enzima acetil CoA karboksilaze, a CLPP1 kazeinolitička proteaza P1. SRPS i SRPL predstavljaju sume proteina 30S i 50S ribosomskih podjedinica. (Barsan i sur., 2012)

Proteini fotosustava I (PSI), fotosustava II (PSII), citokrom b6 i adenzin trifosfat (ATP) sintaza uključeni su u fotosintezu, te je njihova količina prilično stabilna između poluzrelog i zrelog stadija, a opada ili nestaje u zreloj stadiju. To je znak da je u zreloj stadiju fotosintetski aparat razgrađen. Samo jedan protein PSII te dva proteina citokroma b6 prisutni su u zreloj stadiju u značajnim količinama. Svih šest protein ATP sinteze pokazuje kontinuirani pad u količini, ali su i u zreloj stadiju prisutni u značajnim količinama. Sintaza ATP-a aktivna je tijekom razvoja kromoplasta jer omogućava dobivanje energije za sve metaboličke procese. Količina proteina velike podjedinice enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza (RUBISCO) konstantno opada, ali je prisutna i u zreloj stadiju. Smanjivanjem količine enzima RUBISCO smanjuje se i aktivnost Calvinovog ciklusa. Opada i ukupna količina proteina koji grade veliku i malu ribosomsku podjedinicu. Proteini velike ribosomske podjedinice u zreloj stadiju nisu prisutni. Tijekom razvoja kromoplasta, dolazi do smanjenja translacije u plastidu (Khalau i Bock, 2008). Kazeinolitička proteaza P1 sudjeluje u razgradnji proteina. Njezina visoka prisutnost tijekom razvoja kromoplasta ukazuje na visoku razinu proteolize. Acetil CoA karboksilaza uključena je u biosintezu masnih kiselina. Njezina količina tijekom razvoja kromoplasta ne mijenja se značajno. Akumulacijom acetil CoA karboksilaze stvara se preduvjet za izgradnju skladišnog matriksa u kojemu će se akumulirati karotenoidi.

### ***3.3. Kinetičke promjene u funkcionalnim klasama proteina tijekom prelaska iz kloroplasta u kromoplaste***

Barsan i sur. (2012) kinetičke su promjene u funkcionalnim skupinama proteina (Slika 7.) klasificirali u sedam kategorija: stabilna, rano padajuća, kasno padajuća, konstantno padajuća, rano rastuća, kasno rastuća i konstantno rastuća.



Slika 7. Broj i postotak proteina različitih funkcionalnih skupina, u sedam kategorija. A, Stabilna. B, Rano padajuća. C, Kasno padajuća. D, Konstantno padajuća. E, Rano rastuća. F, Kasno rastuća. G, Konstantno rastuća. Broj u % predstavlja postotak proteina u pojedinoj funkcionalnoj klasi. (Barsan i sur., 2012)

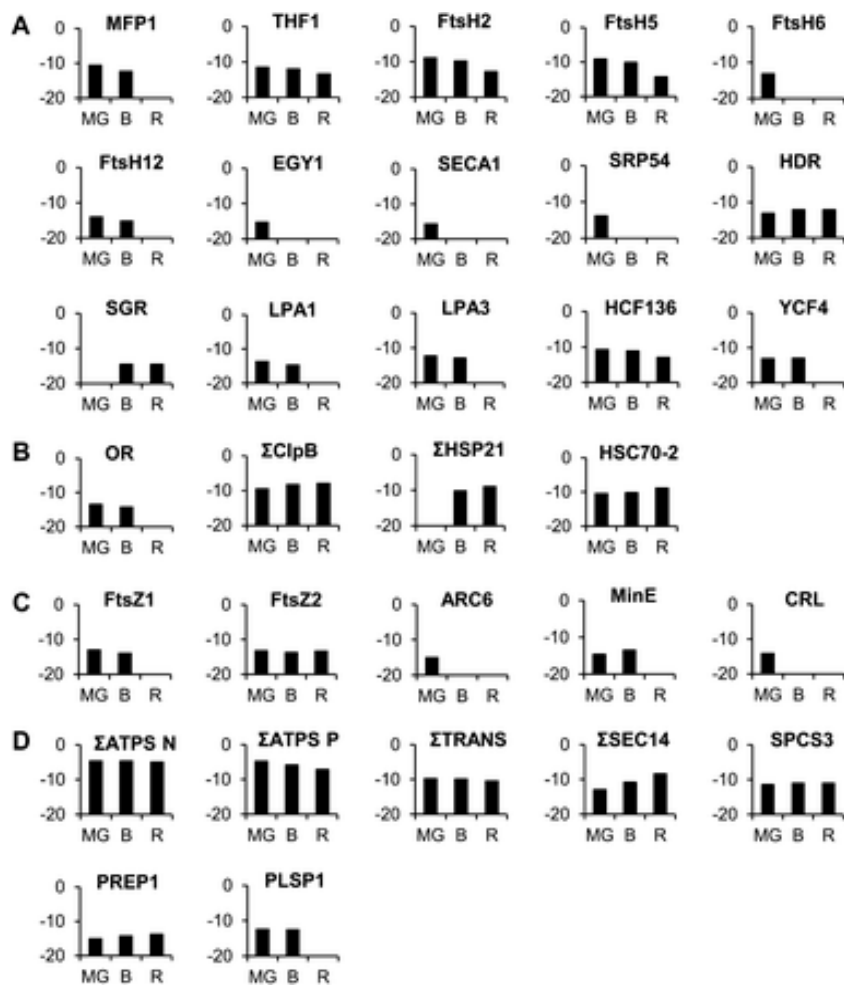
Broj proteina čija je količina statistički konstantna veći je od broja proteina čiji broj raste. Brojni su proteini čija se količina kasno mijenja što ukazuje na važne promjene koje se događaju između poluzrelog i zrelog stadija. Funkcionalne klase čija je količina konstantna (Slika 7.A) uključuju proteine koji sudjeluju u asimilaciji sumpora, sintezi trikarboksilnih kiselina, metabolizmu metala, transportu elektrona i sintezu ATP-a. Manji udio proteina sa stabilnom količinom imaju klase proteina za metabolizam aminokiselina, sintezu proteina, Calvinov ciklus i oksidativni put pentozna fosfata. Vrlo mali postotak proteina sa stabilnom

količinom imaju proteini uključeni u metabolizam ugljikohidrata, fotosinteze i metabolizma hormona. Funkcionalne klase proteina važne za fotosintezu pokazuju smanjenje u količini, s većim postotkom proteina čija se količina smanjuje kasnije, između zrelog i poluzrelog stadija (Slika 8.C), nego ranije (Slika 8.D). Iste promjene u količini pokazuju i proteini uključeni u sintezu tetrapirola i posttranslacijsku doradu (Slika 8.C). Skupine proteina čija se količina rano smanjuje uključuje skupine proteine metabolizma dušika, kofaktora i vitamina te degradacije ksenobiotika (Slika 8.B). U kategorijama s rastućim količinama proteina je znatno manje. Konstantno se povećava količina proteina uključenih u fermentaciju (Slika 8.G). Najveći porast u količini imaju proteini stresa čija se količina povećava kontinuirano (Slika 8.G), rano (Slika 8.E) i kasno (Slika 8.F). Kontinuirano se povećava količina proteina uključenih u diobu i organizaciju stanice (Slika 8.G), budući da se tijekom razvoja kromoplasta događaju brojne strukturne promjene. Povećava se i koncentracija ugljičnih anhidraza. Porast proteina uključenih u metabolizam hormona u kasnijim fazama povezan je sa sintezom hormona apscizinske kiseline i jasmonata prilikom zriobe plodova (Zhang i sur., 2009). Povećava se i količina proteina uključenih u biosintezu voćnih aroma, poput lipoksigenaze 3 (Chen i sur., 2004).

### ***3.4 Pregled metaboličkih i regulatornih promjena tijekom prelaska iz kloroplasta u kromoplaste.***

Proteomske analize pokazale su da je broj proteina koji sudjeluju u reakcijama na svjetlu, uključujući fotosintezu, Calvinov ciklus i fotorespiraciju, kao i proteina metabolizma ugljikohidrata, veći u plastidima zelenih plodova, u odnosu na poluzrele i zrele. Njihov broj opada tijekom kromoplastogeneze. Velik broj proteina uključen u proizvodnju energije ne mijenja svoju količinu tijekom razvoja kromoplasta. Količina nekih proteina, poput ugljičnih anhidraza, proteina uključenih u metabolizam terpenoida i lipida, se povećava. Prisutnost ugljične anhidraze u zrelih plodovima omogućava aktivnost enzima RUBISCO (Jebanathirajah i Coleman, 1998), koji je prisutan i u zreloj stadiju. Količina *heat-shock* proteina i proteina abiotičkog stresa raste tijekom razvoja kromoplasta. Pojedini *heat-shock* proteini sudjeluju u promoviranju promjene boje plodova tijekom zriobe (Neta-Sharir i sur., 2005). Kvantitativne promjene proteina koji sudjeluju u odgovoru na hormone ili u njihovoj biosintezi idu u prilog ulozi hormona, poput jasmonata, koji ima ulogu u biosintezi karotenoida u prisustvu etilena (Fan i sur., 1998). Veliki broj proteina koji sudjeluju u

izgradnji tilakoidnih membrana pokazuje pad u količini tijekom prelaska iz kloroplasta u kromoplaste (Slika 8.A), što je uzrok razgradnji tilakoidnih membrana tijekom kromoplastogeneze. Proteom plastida sadržava i proteine koji sudjeluju u diferencijaciji plastida. Protein *dnaJ-like chaperon* produkt je gena *Or* koji kontrolira diferencijaciju kromoplasta i akumulaciju karotenoida (Li i Van Eck, 2007). Protein *Or* prisutan je u zelenom i poluzrelom, ali ne i u zreom stadiju, kad je količina karotenoida maksimalna (Slika 8.B). ATP-ovisne kazein litičke proteaze koje se nalaze u stromi, sudjeluju u razvoju kromoplasta (Lee i sur., 2007). Količina ovih proteina je prilično stabilna tijekom svih stadija, što ukazuje na njihovu važnu ulogu tijekom diferencijacije kromoplasta (Slika 8.B). Proteini uključeni u diobu plastida nestaju ili im se količina znatno smanjuje u zreome stadiju (Slika 8.C). To ide u prilog činjenici da tijekom kromoplastogeneze nema nastanka novih plastida (Egea i sur., 2011). Proteini uključeni u proizvodnju energije, ATP sintaze, pokazuju stabilnu količinu tijekom diferencijacije kromoplasta (Slika 8.D). Proizvodnja energije važna je tijekom cijelog procesa diferencijacije. Za proizvodnju energije u plastidima važni su sustavi za dovođenje hranjivih tvari. Plastidi mogu uvesti citosolni glukoza 6-fosfat pomoću glukoza 6-fosfat/fosfat translokaze. Uvezeni glukoza 6-fosfat koristi se za sintezu škroba i masnih kiselina, kao i za oksidativni put pentoza fosfata (Emes i Neuhauhs, 1997). Postoje i translokatori drugih energetski važnih komponenti, poput fosfenolpiruvata i trioza fosfata. Broj translokatora smanjuje se vrlo malo tijekom kromoplastogeneze (Slika 8.D), što omogućava proizvodnju energije i prekursora za sintezu masnih kiselina i saharoze u plastidu. U plastidima su detektirani i proteini za direktan unos lipidnih čestica. Njihov se broj tijekom kromoplastogeneze povećava (Slika 8.D). Količina proteina uključenih u transport proteina i peptida tijekom kromoplastogeneze ostaje prilično stabilan (Slika 8.D), iako je sama translacija u plastidu smanjena.



Slika 8. Količina proteina uključenih u strukturne modifikacije plastida, proizvodnju energije, i translokaciju prekursora tijekom prelaska iz kloroplasta u kromoplaste. A, proteini uključeni u izgradnju tilakoida. B, Proteini uključeni u diferencijaciju plastida. C, Proteini uključeni u diobu plastida. D, proteini uključeni u proizvodnju energije i translokaciju prekursora. Količina proteina prikazana je kao  $\log_2$ . (Barsan i sur., 2012)

## 4. LITERATURA

- Barsan C, Zouine M, Maza E, Bian W, Egea I, Rossignol M, Bouyssie D, Pichereaux C, Purgatto E, Bouzayen M, Latché A, Pech JC, 2012. Proteomic analysis of chloroplast-to-chromoplast transition in tomato reveals metabolic shifts coupled with disrupted thylakoid biogenesis machinery and elevated energy-production components. *Plant Physiology* 160: 708-721.
- Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z, Grierson D, 2004. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology* 136: 2641–2651.
- Egea I, Bian W, Barsan C, Jauneau A, Pech JC, Latché A, Li ZG, 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: 291–297.
- Emes MJ, Neuhaus HE, 1997. Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids. *Journal of Experimental Botany* 48: 1995–2005.
- Fan X, Mattheis JP, Fellman JK, 1998. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta* 204: 444–449.
- Jebanathirajah JA, Coleman JR, 1998. Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 204: 177–182.
- Kahlau S, Bock R, 2008. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *The Plant Cell* 20: 856–874.
- Kwok EY, Hanson MR, 2003. Microfilaments and microtubules control the morphology and movement of non-green plastids and stromules in *Nicotiana tabacum*. *The Plant Journal* 35: 16–26.
- Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER, Vierling E, 2007. The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *The Plant Journal* 49: 115-127.
- Li L, Van Eck J, 2007. Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. *Transgenic Research* 16: 581–585.
- Ljubešić N, Wrisher M, Devidé Z, 1991. Chromoplasts - the last stages in plastid development. *The International Journal of Developmental Biology* 35: 251–258.
- Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, Weiss D, 2005. Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell* 17: 1829–1838.
- Kohler RH and Hanson MR, 2000. Plastid tubules of higher plants are tissue specific and developmentally regulated. *Journal of Cell Science* 113: 81–89.

Pirrello J, Regad F, Latché A, Pech JC, Bouzayen M, 2009. Regulation of tomato fruit ripening. CAB Reviews 51: 1–14.

Simkin AJ, Gaffé J, Alcaraz JP, Carde JP, Bramley PM, Fraser PD, Kuntz M, 2007. Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. Phytochemistry 68: 1545–1556.

Spurr AR, Harris WM, 1968. Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum annuum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. American Journal of Botany 55: 1210–1224.

Waters MT, Pyke KA, 2004. Plastid development and differentiation. The Plant Journal 39: 655–667

Wise RR, 2006. The diversity of plastid form and function. Wise RR, JK Hooper, eds, The Structure and Function of Plastids 23: 3–26.

Zhang M, Yuan B, Leng P, 2009. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. Journal of Experimental Botany 60: 1579–1588.



## SAŽETAK

Transformacija kloroplasta u kromoplaste važan je biološki proces tijekom zriobe plodova. Događaju se važne strukturne i metaboličke promjene. Spektralna konfokalna mikroskopska analiza karotenoida i klorofila u plastidima izoliranih iz plodova pokazala je da kromoplasti nastaju iz već postojećih kloroplasta te da se nakon kromoplastogeneze proces diferencijacije završava. Snimanje živog tkiva *in situ* tehnikom *real-time* pokazalo je da je proces sinkroniziran na nivou jedne stanice, ali ne i na nivou čitavog tkiva. Proteomske analize dale su bolji uvid u metaboličke promjene tijekom kromoplastogeneze. Promjene u metabolizmu sastoje se od smanjenja količine proteina svjetlosnih reakcija, uključujući proteine uključene u fotosintezu, Calvinov ciklus i fotorespiraciju. Smanjuje se i količina proteina uključenih u metabolizam ugljikohidrata. Raste količina proteina stresa, kao i proteina uključenih u biosintezu terpenoida, uključujući karotenoide. Zanimljiva je činjenica velike prisutnosti podjedinica enzima RUBISCO u kromoplastima, iako se enzim prvenstveno nalazi u fotosintetski aktivnim plastidima. Navedenim metaboličkim promjenama prethodi akumulacija acetil-CoA karboksilaze koja je važna za formiranje spremišnog matriksa u kojemu će se akumulirati karotenoidi. Metaboličke promjene praćene su strukturnim promjenama. Poremećena je biogeneza tilakoida i fotosistema, a dolazi i do povećane proizvodnje energije i gubitka sposobnosti diobe plastida.

## SUMMARY

Transition from chloroplasts to chromoplasts is an important biological process in fruit ripening. Many significant structural and metabolic shifts occur. Spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated fruit plastids showed that chromoplasts arise from already existing chloroplasts, and that no further differentiation process occur. Real-time in-situ recording of intact live tissue showed that the process is synchronized within a cell, but with less synchrony within the whole tissue. Proteomic analyses gave better insight into metabolic shifts during chromoplastogenesis. Major shifts included decrease in abundance of proteins involved in light reactions, including photosynthesis, Calvin cycle and photorespiration. Proteins involved in carbohydrate metabolism also decrease in abundance. Proteins whose abundance increases during chromoplastogenesis include stress proteins, and proteins related to terpenoid biosynthesis. One interesting feature is that the large subunit of the RUBISCO enzyme, an enzyme typically abundant in photosynthetic plastids, although continuously decreasing in abundance, is present in fully developed chromoplasts. These metabolic shifts are preceded by the accumulation of acetyl CoA carboxylase, which accounts for the generation of a storage matrix that will accumulate carotenoids. Metabolic shifts are followed by structural changes. The biogenesis of the machinery for building up of thylakoid and photosystems is disrupted, coupled with elevated energy production components and loss of plastid division machinery.