

A mangánhiány hatása a fotoszintetikus apparátus szuperkomplex-szerveződésére *Marchantia polymorpha*-ban

Tudományos Diákköri Konferencia Dolgozat

37. OTDK Biológiai Szekció

Kovács Veronika

Biológia BSc. III. évfolyam

témavezető:

Dr. habil. Solti Ádám

egyetemi docens

Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítésjegyzék	3
Absztrakt.....	5
Irodalmi bevezető	6
Célkitűzés	10
Anyagok és módszerek.....	10
Eredmények	15
Diskusszió	31
Köszönetnyilvánítás	34
Irodalomjegyzék.....	35

Rövidítésjegyzék

AA	akrilamid
ACA	ϵ -aminokapronsav
AP	ammónium-perszulfát
BN	Blue Native
BSA	marha szérum albumin
CET	ciklikus elektrontranszportlánc
Chl	klorofill
cit	citokróm
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FNR	ferredoxin-NADP-oxidoreduktáz
Fd	ferredoxin
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil-) piperazin-etán-1-szulfonsav]
LC-MS/MS	folyadékkromatográfiával csatolt tandem tömegspektrometria
LET	lineáris elektrontranszportlánc
LHCI	az I. fotokémiai rendszer fénybegyűjtő komplexe
LHCII	a II. fotokémiai rendszer fénybegyűjtő komplexe
MS	tömegspektrometria
NDH	NAD(P)H-dehidrogenáz-szerű komplex
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PC	plasztocianin
PPFD	fotoszintetikus foton fluxus-denzitás

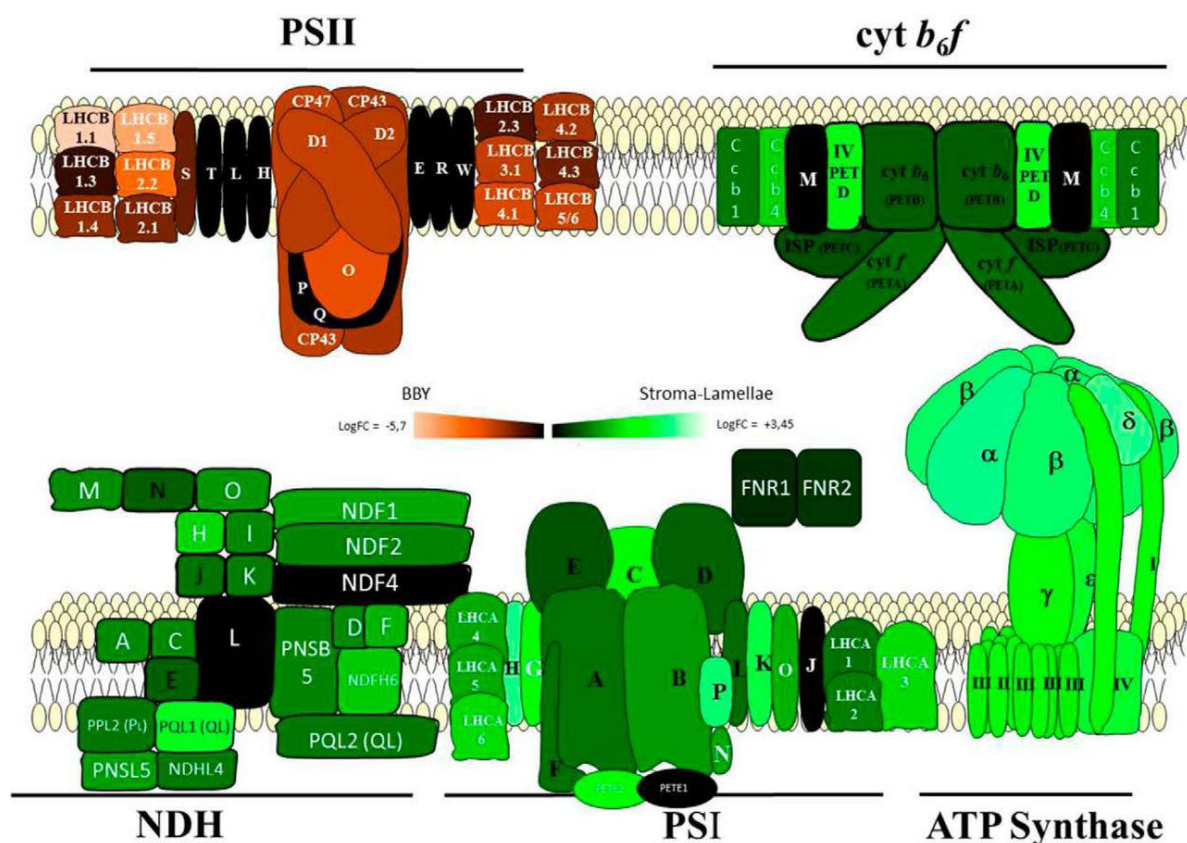
PQ	plasztokinon
PSI	I. fotokémiai rendszer
PSII	II. fotokémiai rendszer
SBG	Serva Blue G
SDS	Na-dodecil-szulfát
TEMED	tetrametil-etilén-diamin
TFA	trifluorecetsav
Tricin	N-trisz-(hidroxi-metil)-metil-glicin
XRF	röntgenfluoreszcencia
β -DM	<i>n</i> -dodecil- β -D-maltozid

Absztrakt

A mangán létfontosságú nyomelem a növények számára, többek között a fotoszintézisben betöltött szerepe miatt. A II. fotokémiai rendszer részeként, a mangántartalmú vízbontó komplex felel a víz oxidálásáért, az oxigéntermelésért és az elektronok biztosításáért az elektrontranszportlánc számára. Kimutatták, hogy Mn hiányában csökken a fotoszintetikus aktivitás, megváltozik a két fotokémiai rendszer aktivitás-megoszlása (előtérbe kerül a ciklikus elektrontranszport) és a tilakoidmembránok szervezettsége. A munkánkban *Marchantia polymorpha* modellen a tilakoidok strukturális változásait vizsgáltuk. Blue Native poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE) és második dimenziós Na-dodecil-szulfát PAGE-t alkalmazva kimutattuk, hogy a Mn-hiány nem változtatja meg a gélen megjelenő komplex mintázatot és a fotoszisztéma (PS)I/PSII arányt, de növeli a citokróm b_6/f komplex mennyiségét, és a nagyobb PSII szuperkomplexek stabilitását. *M. polymorpha*-ban a magasabbrendű növényekétől eltérő PSI szuperkomplexeket is találtunk, amelyek fehérjeösszetételének denaturáló PAGE-sel történő és tömegspektrometrián alapuló analízise alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a szuperkomplexek, eltérően a magasabbrendű növényekétől, a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgákéhoz hasonló duplasoros antennarendszerrel rendelkezhetnek. Eredményeink hozzájárulhatnak e növények fotoszintézis-optimalizálásban szerepet játszó adaptációs mechanizmusainak megértéséhez.

Irodalmi bevezető

A fotoszintézis a növények legalapvetőbb anyagcseretípusa, mely során a látható fény energiájának hasznosításával építik fel szerves anyagaikat szervesetlen építőkövekből. A fotoszintézis mechanizmusa két folyamat összehangolt működése: a napfény energiájának kémiai energiává és redukáló erővé alakítása (amelyet az ATP és NADPH molekulák közvetítenek), majd e kémiai energia és redukálóerő segítségével szerves anyag előállítása szén-dioxidból (Calvin-Benson-Bassham-ciklus). A fotoszintézis helyszíne zöld növényekben a kloroplasztizom, melyeknek tilakoidmembránjában találhatóak meg azok a membránkomplexek, amelyek az elektrontranszportláncban vesznek részt (Tomizioli és mtsai, 2014). Az elektrontranszport-láncban és az ezzel kapcsolt ATP-szintézisben résztvevő komplexek: a II. fotokémiai rendszer (PSII), a citokróm (cit) b_6/f komplex, az I. fotokémiai rendszer (PSI), a NAD(P)-dehidrogenáz-szerű (NDH-) komplex és az ATP-szintáz (1. ábra).



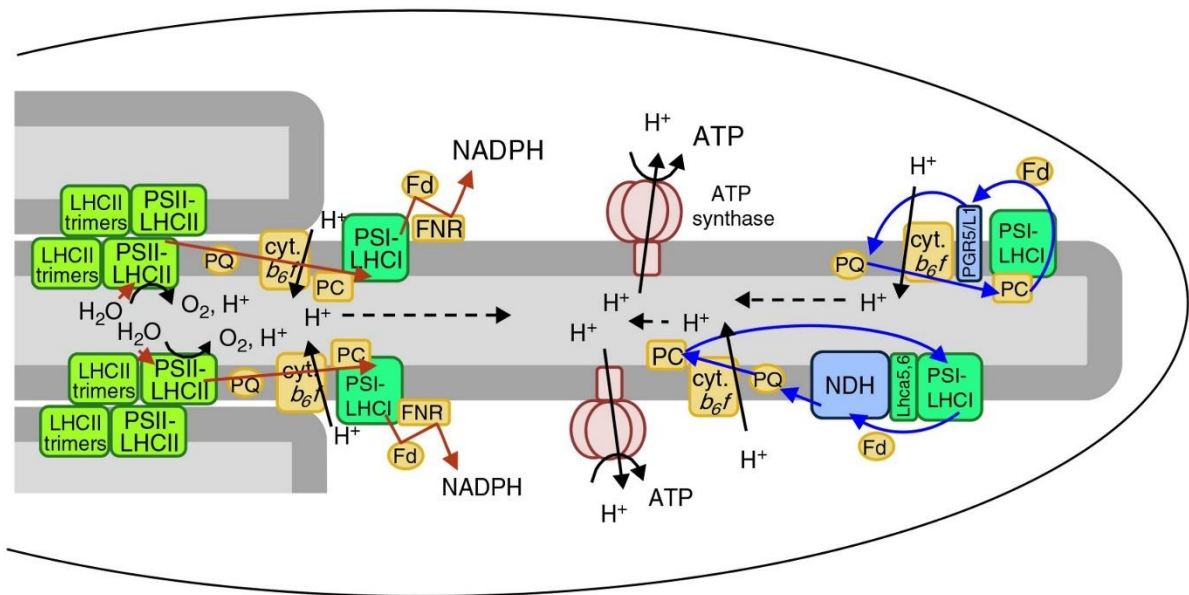
1. *ábra - A fotoszintetikus komplexek (PSII, cit b₆/f, PSI, NDH és ATP-szintáz) eloszlása a fő tilakoid-szubfrakciókban proteomikai elemzéssel meghatározva (Tomizioli és mtsai, 2014).*

A fotoszintetikus fényreakciók első lépése a fény elnyelése a fotokémiai rendszerek fénygyűjtő antennarendszerével, ami a gerjesztési energiát átadja a fotokémiai rendszerek reakciócentrumába. A két fotokémiai rendszerben különböző fehérjék látják el ezt a feladatot. A reakciócentrum a PSII esetében a belső antennákkal (CP47 = PsbB és CP43 = PsbC) komplexet alkot (*core*). A perifériás antennák (Light Harvesting Complex, LHC) az LHCII-trimerek, amelyeket az Lhcb1, Lhcb2 és Lhcb3 antennafehérjék építenek fel, és a kapcsoló antennákon (CP29 = Lhcb4, CP26 = Lhcb5 és CP24 = Lhcb6) kötött klorofillokon keresztül adják át az energiát a PSII *core* klorofilljaira, majd a reakciócentrumba.

A PSII-LHCII szuperkomplexek legjellemzőbb formája a C2S2M2, ahol „C” jelöli a *core*-t, az „S” (*strongly*) és „M” (*moderately*) pedig a különböző erősséggel kötődő LHCII-trimereket, amely kötéseiről a detergenssel szembeni ellenállóság alapján került meghatározásra. A PSI reakciócentruma egy PsaA/PsaB heterodimer, melyet annak fénygyűjtő komplexei (LHCI) vesznek körül. Ezek a fénybegyűjtő antennák Lhca1-4 klorofill-kötő proteinek tartalmazzák (Rantala és mtsai, 2020).

A vízmolekulától a NADPH kialakulásáig zajló lineáris elektrontranszportban (LET) a PSII-*core* (mangán (Mn)-centrum, P680, feofitin, Q_A és a Q_B kinonok)), a cit *b₆f* komplex (Rieske-féle Fe-S centrum és a *b* és *f* típusú citokrómok) és a PSI-*core* (P700, Chl *a*, kinonok, F_x, F_A, F_B Fe-S centrumok) által kötött komponensek, valamint a membránban (plasztokinonok; PQ), a lumenben (plasztocianin; PC) és a sztrómában (ferredoxin: Fd, illetve FNR: Fd-NADP-oxidoreduktáz) mozgó elektronszállítók vesznek részt (2. ábra). Az elektrontranszport által létrehozott protongradienst (vízbontás, PQ-oxidáció) az ATP-szintáz használja fel ATP-szintézisre. A PSII és PSI-*core* komplexek számos kis proteint is kötnek, amelyek komplex stabilizáló, antennakötő és regulációs szerepet töltenek be (Tomizioli és mtsai, 2014; Rantala és mtsai, 2020).

A PSI regulációs szerepe is jelentős. Képes szuperkomplexeket formálni L (*loosely*, lazán kötődő) LHCII-komplexszel, mellyel a fénybegyűjtő kapacitását növelheti. Léteznek cit *b₆/f* és a NDH-komplexszel alakított szuperkomplexei is, amelyek ciklikus elektrontranszportban (CET) vesznek részt (2. ábra), stressz körülmények között fokozva a ATP termelődését (Yadav és mtsai, 2017).



2. ábra – Az elektrontranszportlánc elemei (PGR5- proton gradiens regulációs fehérje 5; PGRL-1 – PGR-szerű 1) (Munekage, 2016).

A Mn-centrum (Mn_4CaO_5) a PSII oxigénfejlesztő komplexének (OEC) eleme, a víz oxidálásában és az oxigéntermelésben játszik szerepet ($2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$). Az OEC összeszerelődése az ún. fotoaktiváció nevű folyamatban zajlik le, mely során a Mn-ionok oxidációs állapota fokozatosan emelkedik. A folyamat az új tilakoidmembránok szintézisekor és a károsodások helyreállításakor jelentkezik. A centrum felépülése során először Mn^{2+} kötődik a PSII-hez, majd fotooxidációval Mn(III) és Mn(IV) állapotok jönnek létre a már kötött centrumon. A sötét-átrendeződés során a fehérjemátrix konformációja optimalizálódik. Újabb Mn-ionok oxidálódása után az ionok között oxo-hidak alakulnak ki, a létrejött kuboid-szerű szerkezetet Ca^{2+} -ion stabilizálja. Végül külső fehérjék (PsbO, PsbP, PsbQ) kötődnek a vízbontó komplexhez (OEC), így a klaszter képessé válik a víz oxidációjára (Oliver és mtsai, 2022).

Környezeti stressz vagy fotoinhibíció eredményeként az OEC károsodáson megy keresztül. A fotoinhibíció első lépése a Mn-ionok kilépése a centrumból. A Mn-ionok elnyelik az UV- és látható fényt és elvesztik a kapcsolatukat a fehérjemátrixszal. Ennek következtében a P680^+ (fotokémiaailag aktív klorofill-*a* forma) felé történő elektron-donáció megszűnik és az erős oxidáló hatás miatt károsodik a PSII reakciócentrum. Ezen folyamat jelzi a Mn-centrum kiemelt szerepét a PSII és az elektrontranszportlánc egészének működésében (Hakala és mtsai, 2005; Takanashi és mtsa, 2008).

Zárwatermő növények, pl. spenót (*Spinaca oleracea*) és árpa (*Hordeum vulgare*) esetében a Mn-hiányos nevelés csökkentette a Chl *a/b* arányt és a PSII maximális kvantumhasznosítást, valamint a PSII szuperkomplexek mennyiségét (Simpson és mtsai, 1984; Schmidt és mtsai, 2015).

A Mn csak a divalens kation formájában (Mn^{2+}) felvehető a növények számára. A Mn-hiány magas pH-értékű, meszes területeken fordul elő, ahol a környezeti feltételek elősegítik a Mn-oxidok kialakulását, ami felvehetetlen a növények számára. Ilyen talajtípusok Európa északi részén, az Egyesült Királyságban, USA és Kanada északi részén a legjellemzőbbek. A Mn a lignin bioszintézisében is szerepet játszik, így a hiánya csökkenti a lignin koncentrációt, a gyökérben különösképp, ami által a növény fogékonyabbá válik a gombás megbetegedésekre, az ellenálló képessége csökken. A Mn-hiányos régiókban ezért csökken a növények növekedése és a terméshozam (Schmidt és mtsai, 2016; Schmidt és mtsai, 2019).

Kísérleteinkhez *Marchantia polymorpha* modellt használtunk. A májmohák a szárazföldi növények leszármazásának legelső elágazásához tartoznak, így vizsgálatukkal megérthetjük a különböző adaptációs mechanizmusok kialakulását, mint pl. a fényvédelem vagy a vízháztartás szabályozás (Bowman, 2022). Korábbi kutatásokban modellként szolgált többek között az evolúciós események tanulmányozásához, genetikai és genomikai kutatásokhoz, növényfejlődés alapvető folyamatait érintő vizsgálatokhoz, valamint molekuláris biológiai kutatásokhoz transzformációs technikák és génszerkesztési módszerek segítségével (Bowman és mtsai, 2016). Mint minden nem-edényes növény, e növényi modell esetében sem fényfüggő a Chl-ok, fotoszintetikus apparátus bioszintézise, így vizsgálatával jól vizsgálható a fotoszintetikus apparátus fém-kofaktorainak felvétele, beépülése.

A kevés fotoszintetikus aktivitásra vonatkozó vizsgálat elsősorban valamilyen stresszfaktorra (pl. Mn-hiány vagy toxikus Mn-koncentrációk) adott válasszal kapcsolatos. Chl-*a* fluoreszcencia indukcióval, PSI és PSII aktivitás mérésekkel és *in vivo* redox-változások vizsgálatával megfigyelték, hogy Mn-hiány esetén, feltehetően a tilakoid membránban végbemenő szerveződési változások hatására, a CET fokozódik; a LET kapacitása csökkent. (Messant és mtsai, 2023; Hani és Krieger-Liszkay, 2024).

A tilakoidszerkezetet és a tilakoid komplex-összetételt illetően is csak kevés vizsgálatot végeztek. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megállapították, hogy a *M. polymorpha*-t rövid

sztróma-tilakoidokkal összekötött nagy gránumok jellemzik (Aro, 1982), és hogy a gránumok kapcsoltsága Mn-hiány esetén nő (Messant és mtsai, 2023). Az izolált PSII részecskék elektronmikroszkópos képanalízise azt mutatta, hogy a PSII szuperkomplexek az edényes növényekhez hasonló felépítésűek, de a PSII komplexekhez szorosabban kötődnek a kapcsoló antennák és LHCII-trimerek (Harrer, 2003). Ueda és mtsai (2012) azt találták, hogy a *M. polymorpha* genomjából hiányoznak egyes *Arabidopsis thaliana* gének (pl. *Lhca5*, *Lhca6*) ortológjai, amelyek a NDH-PSI szuperkomplex kialakulásához szükségesek, NDH komplexe emiatt alacsonyabb molekulatömegű tartományban jelenik meg.

Célkitűzés

Az eddigi Mn-hiányos *M. polymorpha* vizsgálatok nem szolgáltatottak információt a tilakoidok komplex-szerveződésére vonatkozóan. Célkitűzésünk volt ezért annak a felderítése, hogy a Mn-hiány milyen hatást gyakorol a fotoszintetikus apparátusra, a fotoszintetikus komplexeket jelentősen érinti-e, valamint, hogy a májmoha modell tilakoid-komplexei megfeleltethetőek-e más növényi modelleknek?

Anyagok és módszerek

Növénynevelés

Növényi modellként májmoha (*Marchantia polymorpha* L. cv. Takaragake-1 [Tak-1]) rendszert használtunk. A gemmákról szaporított vonalat táptalajon, kontrollált környezeti feltételek mellett neveltük. Táptalajként hormonmentes, ½ töménységű Gamborg B5 médiumot használtunk 1% agarral szilárdítva. A Mn-hiányos kezelés esetén a táptalajból kihagytuk a 10 mg l⁻¹ MnSO₄ komponenst, és a táptalajt agar helyett 6% keményítővel (Sigma) szilárdítottuk. Az elkészített táptalajt sterilizáltuk (autoklávozás: 1,2 atm, 20 perc). A táptalajra helyezett gemmákat 2 hónapig 16 óra fény (22 °C, 120 μmol foton m⁻² s⁻¹ fotoszintetikus fotonfluxus-denzitás, PPFD, fényforrás: Osram Fluora fénycsövek), 8 óra sötét ciklusok mellett 20 °C-on növénynevelő kamrában neveltük. A telepek egy részét egy hónap nevelést követően

áthelyeztük Mn-hiányos táptalajra, majd tilakoidokat 1 hét múlva izoláltunk mind a Mn-hiányos, mind a Mn-nal ellátott (a továbbiakban: 'kontroll') telepekből.

Röntgenfluoreszcencia (XRF) térképezés

A 60 °C-on szárított telepek XRF alapú képalkotását Horiba XGT7200V asztali XRF leképező-rendszerrel végeztük (Rh röntgensugár, Si detektor, 100 µm átmérőjű röntgensugár, 50 kV, 1 mA, vákuumban). A gerjesztési röntgensugár egy keskeny berillium polimer ablakon keresztül jutott a minta felületére, majd a mintából kibocsátott $K\alpha$ fotonokat detektálva kaptuk meg a felületi elem eloszlást. A Mn eloszlását a hozzávetőlegesen 5,90 keV csúcson kibocsátott jellemző $K\alpha_1$ fotonok alapján elemeztük. A kiszáritott, azonos vastagságú telepeket Ultralene fóliára helyeztük, majd a detektortól egyforma távolságban végeztünk rajtuk leképezést 3 leképezési sor intenzitásának összegzésével. A szemikvantitatív kiértékeléshez a telepek idősebb részeiről gyűjtöttünk adatot, melyek átlagos jelintenzitási ($K\alpha_1$) adatai a Mn-tartalom szemikvantitatív jellemzésére alkalmasak.

PSII maximális kvantumhasznosítás meghatározása

A Chl-*a* fluoreszcencia indukciós méréseket PAM 100 fluorométerrel (Walz) végeztük. Intakt telepeket 15 percig sötétbe adaptáltuk. Az F_0 -szintet $PPFD < 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, modulációs frekvencia 1,6 kHz mérőfény mellett határoztuk meg. A maximális fluoreszcencia-intenzitást (F_m) 0,7 s, $PPFD: 3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fényforrás: KL 1500, Schott) fényfelvillanást követően mértük. A PSII maximális kvantumhasznosítás számítását a $YII = (F_m - F_0) / F_m$ egyenlet szerint végeztük.

Pigment-meghatározás

A telepek és az izolált tilakoidok Chl-koncentrációját 5 mM Tricin-KOH (pH 7,8) puffert tartalmazó 80% (V/V) acetonban nyertük ki és spektrofotometriai úton határoztuk meg (Porra és mtsai, 1989) a következő alapképletek alapján (figyelembe véve a mintatérfogatot, a hígítást és telepek esetében a friss tömegüket is):

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 12.25 A_{663.6} - 2.55 A_{646.6}$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 20.31 A_{646.6} - 4.91 A_{663.6}$$

Kloroplasztisz és tilakoidmembrán-izolálás

Az izolálást 4 °C-on/jégen végeztük (Frangedakis, 2019). A *M. polymorpha* telepeket izoláló pufferben (50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0,1% (w/V) BSA, 0,1% (w/V) Na-aszkorbát) háromszor 5 s-ig homogenizáltuk, majd szűrtük. Az alakos elemeket 3 perc, 100 ×g centrifugálással távolítottuk, majd a felülúszóból leülepítettük (7 perc, 1200 ×g) az ép és sérült kloroplasztiszokat. A csapadékot BSA és Na-aszkorbát nélküli izoláló pufferrel mostuk és ülepítettük (7 perc, 1500 ×g). A plasztisz csapadékot 10 mM Na₄P₂O₇ (pH 7,4), 2 mM MgCl₂ ozmotikus sokknak tettük ki, majd centrifugáltuk (7 perc, 5000 ×g). A tilakoidok felületén kötődő fehérjék mennyiségének csökkentése érdekében a tilakoid-csapadékot 5 mM [Tricin]-(CH₃)₄NOH (pH 7,5) és 0,1 M szorbitolt tartalmazó oldatban mostuk (Fuad és mtsai., 1983), majd 3 percig 100 ×g gyorsulással centrifugálva eltávolítottuk a keményítőt, és a felülúszót 10 percig 10000 ×g gyorsuláson centrifugálva a csapadékban mosott tilakoidokat kaptunk. A tilakoid-mintákat 2 mM Trisz-maleátban (pH 7,0), 35% (V/V) glicerinben felfuszpendálva több adagban folyékony nitrogénben tároltuk.

A tilakoid-komplexek és a fehérjék elválasztása

A natív (1. dimenzió) és denaturáló (2.D) fehérje elválasztások lényegében Sárvári és mtsai (2022) szerint történtek. A tilakoid-komplexek elválasztására BN-PAGE módszert használtunk. A tárolt mintákat 330 mM szorbitol, 250 µg ml⁻¹ Pefabloc, 50 mM BiszTrisz-HCl (pH 7,0) pufferrel mostuk (10 perc, 10000 ×g). Ezután a mosott tilakoidokat (500 µg Chl ml⁻¹) szoubilizáló pufferben (750 mM ε-aminokapronsav (ACA), 50 mM BiszTrisz, (pH 7.0), 0.5 mM EDTA, 1% (w/V) *n*-dodecil-β-D-maltozid (β-DM, Sigma) plusz 1% (w/V) digitonin) 30 percig jégen tartva szoubilizáltuk. A nem szoubilizálódott maradék eltávolítása után (15 perc, 18000 ×g, 4 °C) a felülúszóhoz 1/5 térfogat Coomassie festékeveréket (5 % (w/V) 'Sera Blue G' (SBG2), 750 mM ACA) adtunk, vortexeltük.

Az elválasztás Mini-Protean II Bio-Rad készülékkel történt 1,5 mm-es 4% (w/V) tömörítő, és 4,3–12% vagy 4,3–8% (w/V) gradiens szeparáló géleken (Sárvári és mtsai, 2022). A katódpuffer 15 mM BiszTrisz, 50 mM Tricin, valamint 0,02% (w/V) SBG-t; az anód puffer pedig 50 mM BiszTrisz-t (pH 7,0) tartalmazott. Mintahelyenként 10-20 µl szoubilizált anyagot vittünk fel a gélre. A futtatás körülbelül 2 óráig, gélenként 5 mA áramerősséggel, 50 V-ról induló feszültséggel zajlott, melyet fél óránként 50 V feszültséggel megemeltünk 150 V-ig, majd a kék katód puffert SBG nélkülire cserélve 2 órát még 200 V feszültségen futtattuk a gélt.

A polipeptidek SDS-PAGE történő elválasztásánál glicerinnel kiegészített denaturáló 5% (w/V) tömörítő, és 10–18% (w/V) gradiens szeparáló géleket használtunk (Laemmli és mtsai, 1970, Sárvári és mtsai, 2022 által módosítva). A katód- és anódpuffer összetétele 25 mM Trisz, 192 mM glicin, 0,1% (w/V) SDS (pH 8,3) volt. A BN-PAGE sávokból gélcsíkokat vágunk ki, 0,5% (w/V) agarózt tartalmazó szolubilizáló pufferben (62,5 mM Trisz-HCl (pH 6,8), 2% (w/V) SDS, 2% (w/V) ditiotritol (DTT), 8,7% (w/V) glicerin, 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Pefabloc, 0,001% (w/V) brómfenolkék) beágyaztuk, majd 20 mA állandó áramerősséggel elválasztottuk azokat.

Az elektroforézist követően a géleket Blue-Silver módszerrel festettük (Candiano és mtsai, 2004). A géleket Epson Perfection V750 PRO készülékkel szkenneltük és Phoretix programmal denzitometráltuk.

Tömegspektrometria

A fehérjefoltokat alacsony fehérjekötésű csőben (Protein LoBind Tube) 25 mM ammónium-bikarbonátot és 50% (V/V) acetonitrilt tartalmazó oldattal ötször mostuk, Eppendorf ThermoMixer C keverővel 10 percig rázatva, majd 10 mM DTT, 25 mM ammónium-bikarbonát közegben 30 perc 56 °C-on 300 rpm-en rázatva redukáltuk, ezt követően 55 mM jódiacetamid, 25 mM ammónium-bikarbonát közegben 30 percig sötétben alkiláltuk a fehérjéket. A fehérjéket két alkalommal 50 μl ammónium-bikarbonát, 50% (V/V) acetonitril közegben 10 percig rázatva mostuk, majd vákuumcentrifuga segítségével liofilizáltuk. A fehérjék hasításához száraz géldarabokat előbb 20 μl 5 ng μl^{-1} , majd a megduzzadásuk után további 10 μl tripszinnel kezeltük (37 °C, *overnight*). Az 5 perc szonikált peptideket Protein LoBind csőben, 0,5% (V/V) ecetsav, 50% acetonitril (V/V) oldatban mostuk, többször ismételve, végül vákuumcentrifugával beszárítottuk a peptideket.

A peptidmintákat Pierce C18-as Spin oszlopon tisztítottuk. Az aktivált oszlopokra 0,5% (V/V) TFA, 5% (V/V) acetonitril:vízben vittük fel és kétszer centrifugáltuk (1500 $\times g$) a peptidmintákat, melyeket, 2x100 μl mosóoldattal mostuk és eluáltuk két lépésben, 2x20 μl 70:30% (V/V) acetonitril:víz elúciós oldattal. A tisztított peptideket vákuumbepárlóval beszárítottuk.

A tripszines emésztéssel nyert peptideket folyadékkromatográfiával csatolt tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) méréssel vizsgáltuk (Waters Select Series Cyclic IMS). A mintákat 0,1% (V/V) hangyasav, 2% (V/V) acetonitril keverékben oldottuk. A peptidek elválasztása Waters Acquity Premier Peptide CSH C18, 1 mm $\times$ 150 mm UHPLC oszlopon

történt (áramlási sebesség 20 $\mu\text{l min}^{-1}$; eluens: 0,1% (V/V) hangyasav:víz (A eluens) és 0,1% (V/V) hangyasav:acetonitril (B eluens)).

Bioinformatikai analízis

A tömegspektrométerrel nyert adatok értékeléséhez adatbázis-keresést alkalmaztunk. A UniProt fehérje adatbázisból letöltöttük a *M. polymorpha* esetén elérhető összes fehérje szekvenciáját, valamint a lehetséges szennyező fehérjéket is (humán keratin, sertés tripszin). Az így összeállított fehérje adatbázisban végeztük el az azonosítást a Waters ProteinLynx szoftverrel. Az azonosítás során csak azokat a fehérjéket fogadtuk el találatként, amelyekben a beazonosított peptidek száma minimum 2 volt. A kapott fehérjéket listába rendezve az azonosítás minőségét pontszámmal jellemezzük.

Az azonosított Chl *a/b*-proteinek funkcionális azonosítására 'blast'-olást hajtottunk végre az UniProt adatbázisban szekvencia-hasonlóság keresésére. A proteomikai eredményekből a *M. polymorpha* fehérjék egyedi UniProt azonosítóit használtuk fel és a 'blast' keresés adatbázisát *Arabidopsis thaliana*-ra szűkítettük. A kapott eredmény-listából a legmagasabb szekvencia-egyezés (százalékban) és pontszám (*score*), valamint legkisebb E-érték adatokat szelektáltuk. Ha két találat rendkívül hasonló, úgy mindkettőt értékeltük. A legnagyobb egyezést mutató *A. thaliana* fehérjék neveit, azonosítóit feljegyeztük. Reverz-'blast'-olásnál az *A. thaliana* azonosítókkal indítottuk a keresést és *M. polymorpha*-ra szűkítettük. Felírtuk ugyanazokat a mutatókat, mint először és megfigyeltük, hogy legjobb találatnak visszakaptuk-e az eredeti keresett *M. polymorpha* fehérjét (és ha nem, akkor hányadik találat volt az).

Statisztika

A vizsgálatok duális adatsorainak analíziséhez Student-féle t-próbát használtam, $P < 0,05$, a több adatcsoportot tartalmazó adatsorok összevetéséhez egy-utas ANOVA próbát alkalmaztam, Tukey-Kramer *post-hoc* teszt segítségével, $P < 0,05$. A számolásokhoz InStat szoftver segítségével (v. 3.00; GraphPad Software, Inc., USA) alkalmaztam.

Mesterséges intelligencia

A ChatGPT mesterséges intelligencia-alapú rendszert (<https://chat.openai.com>, Verzió: ChatGPT, v2.0; tudásfrissítés: 2023. október) tudományos cikkekben információ keresésére használtam. Ellenőriztem, módosítottam az általa leírtakat.

Eredmények

I. Mn-hiány előidézése *M. polymorpha* telepekben

Az alkalmazott Mn-hiányos nevelés markáns változásokat eredményezett a telepek makroszkópos megjelenésében, ahol az idősebb teleprészek Chl-tartalma lecsökkent, szeneszencia-jellegű megjelenést okozva, miközben a telepek növekedése lelassult (3. ábra).



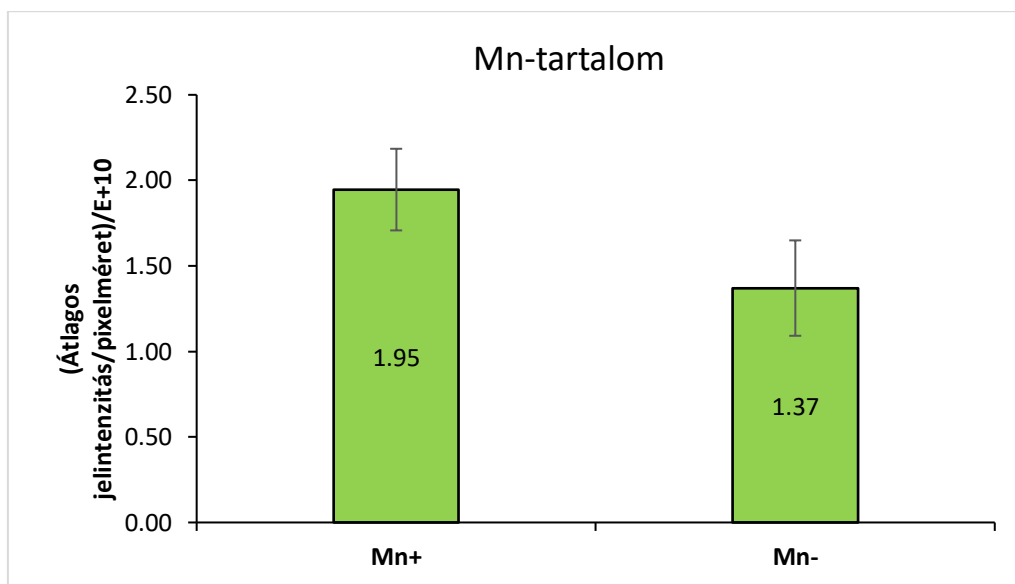
3. ábra - Mn-nal ellátott (a) és Mn-hiányos (b) *M. polymorpha* telepek. A négyzethálós rácsvonalainak távolsága: 5 mm.

A Chl-tartalom változásait vizsgálva kiderült, hogy ennek következtében a Mn-hiányos növények telepei összességében kevesebb Chl-t tartalmaztak, ill. Chl *a/b* arányuk valamelyest csökkent (1. táblázat). Bár a kis mintaszám miatt ez utóbbi eredmény nem volt szignifikáns, viszont trendszerűen mindig ezt kaptuk.

1. táblázat – A *M. polymorpha* telepek pigment összetétele Mn-hiány hatására. A szignifikancia-szint jelölése: ** - erősen szignifikáns; ns – nem szignifikáns. Jelölés: $\mu\text{g g}^{-1}$ friss tömeg.

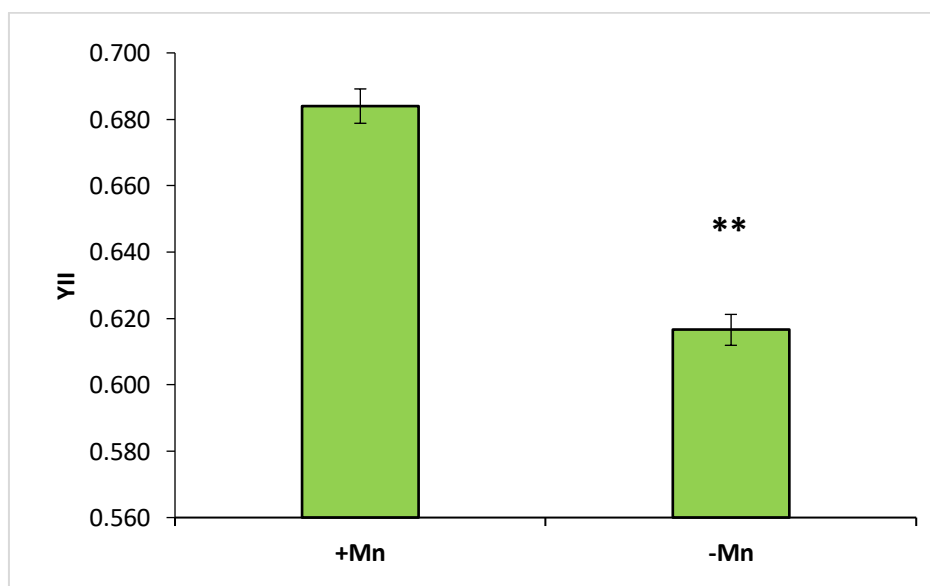
	Kontroll	Mn-hiányos
Chl <i>a+b</i> ⁺	394,0±8,2	333,1±3,8**
Chl <i>a/b</i>	2,48±0,07	2,40±0,09 ^{ns}
Car/Chl	0,29±0,00	0,29±0,01 ^{ns}

A telepek Mn-tartalmának felmérésére röntgenfluoreszcenciás képalkotást hajtottunk végre. A telepek átlagos jelintenzitás értékeit normáltuk a pixelméretre és azt kaptuk, hogy a Mn-hiányos telepek Mn-tartalma csökkent a kontrollhoz képest (4. ábra).



4. ábra – Mn-tartalom kontroll és Mn-hiányos telepek esetén.

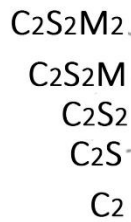
A telepek fotoszintetikus apparátusának vizsgálatához Chl-*a* fluoreszcencia indukciót alkalmaztunk, ahol a PSII maximális kvantumhatékonyságát vizsgálva annak jelentős csökkenését mértük Mn-hiányos telepekben (5. ábra).



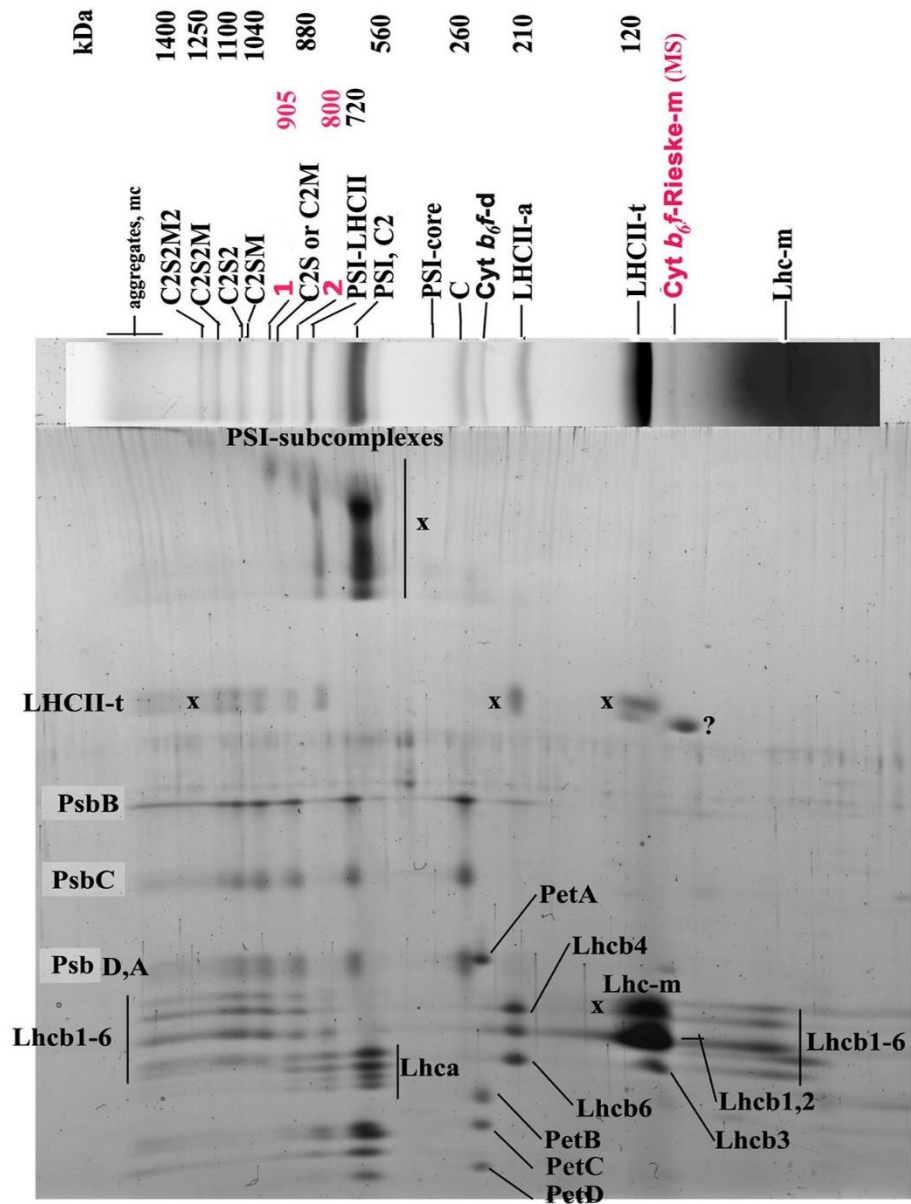
5. ábra - A PSII maximális kvantumhasznosítása. A szignifikancia-szint jelölése: ** - erősen szignifikáns.

II. Membránkomplexek *M. polymorpha* tilakoidokban

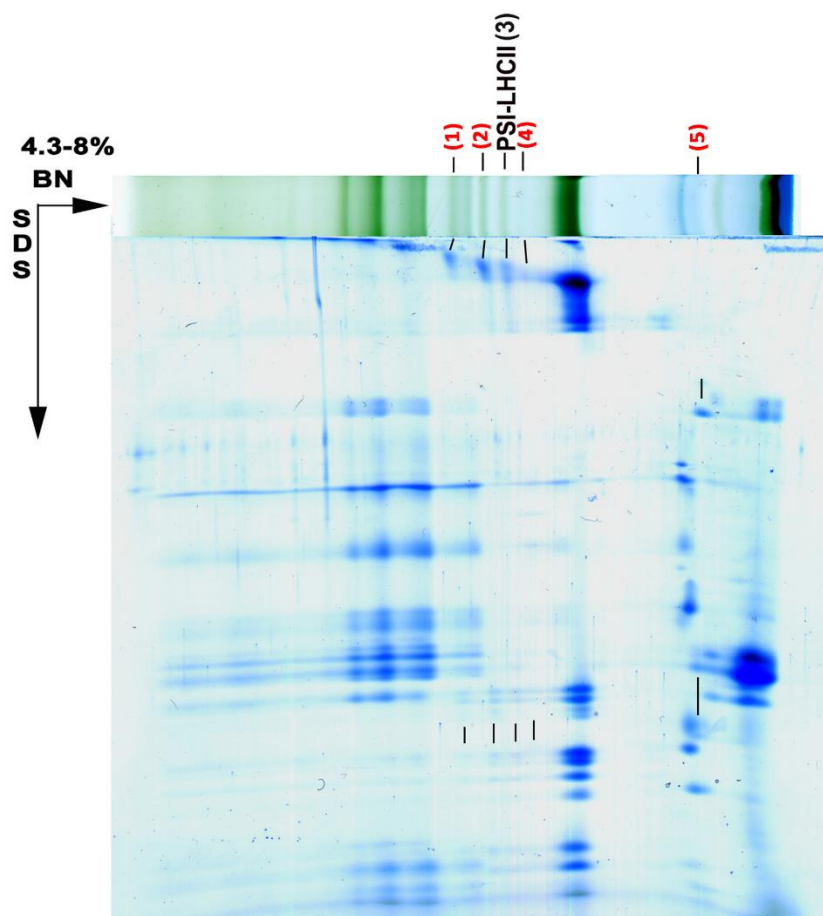
A tilakoid-komplexeket Schagger és mtsa (1991) mitokondriumok membránkomplexeire kidolgozott BN-PAGE segítségével választottuk szét (Järvi és mtsai, 2011). A BN-gélen látható sávok (6. ábra) azonosítása a második dimenziós (2D) fehérjemintázatuk alapján történt (7. ábra). A PSII szuperkomplexeit ($C_2S_2M_2$, C_2S_2M , C_2S_2 és C_2SM , valamint C_2S/C_2M), PSII dimer (C_2) monomer (C) komplexeket a PSII reakció centrum fehérjék (PsbA, PsbD), a belső antennák (PsbB, PsbC), valamint PSII antennafehérje sávjai (Lhcb1-6) alapján azonosítottuk. A PSI-sávok helyzetét (PSI-LHCII, PSI, PSI-core) a PSI alkomplexek és Lhca fehérjék, valamint az alattuk futó core proteinek jelezték. A cit *b₆f* komplexet a PetA, PetB, PetC és PetD proteinek révén tudtuk felismerni. A különböző oligomer (LHCII-a, LHCII-t) és monomer LHC sávok elsősorban Lhcb proteineket tartamaznak. A kontroll és a Mn-hiányos tilakoid mintázat hasonló volt, valamint *M. polymorpha*-ban két, edényes növények esetén nem tapasztalt, a 2D peptidmintázat alapján PSI-jellegű sc sáv (1-es, 2-es) van jelen (6. ábra). A nagyobb felbontású natív gélen ezen felül még egy új PSI-jellegű sáv (4-es), illetve új antennasáv (5-ös) volt látható (8. ábra).



18



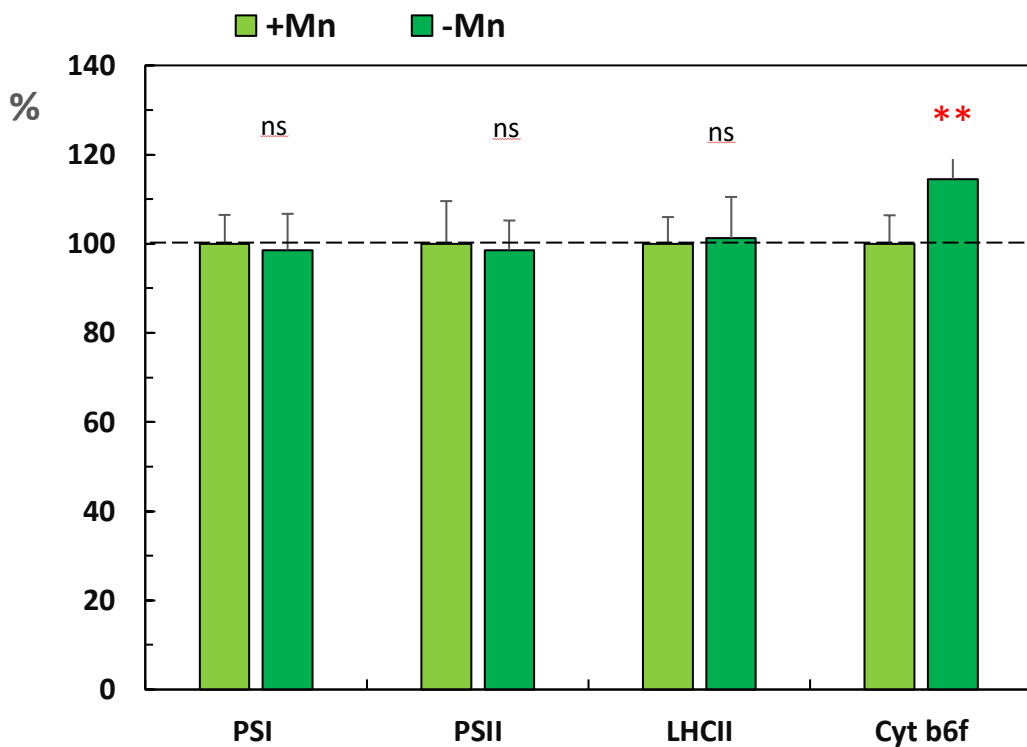
7. ábra -Tilakoid membránkomplexek *M. polymorpha*-ban. A BN sávok azonosítását elősegítő 2D (BN/SDS) gél.



8. ábra- A nagyobb felbontású (4,3-8,0%-os) natív gélen elválasztott PSI-jellegű sávok protein mintázata.

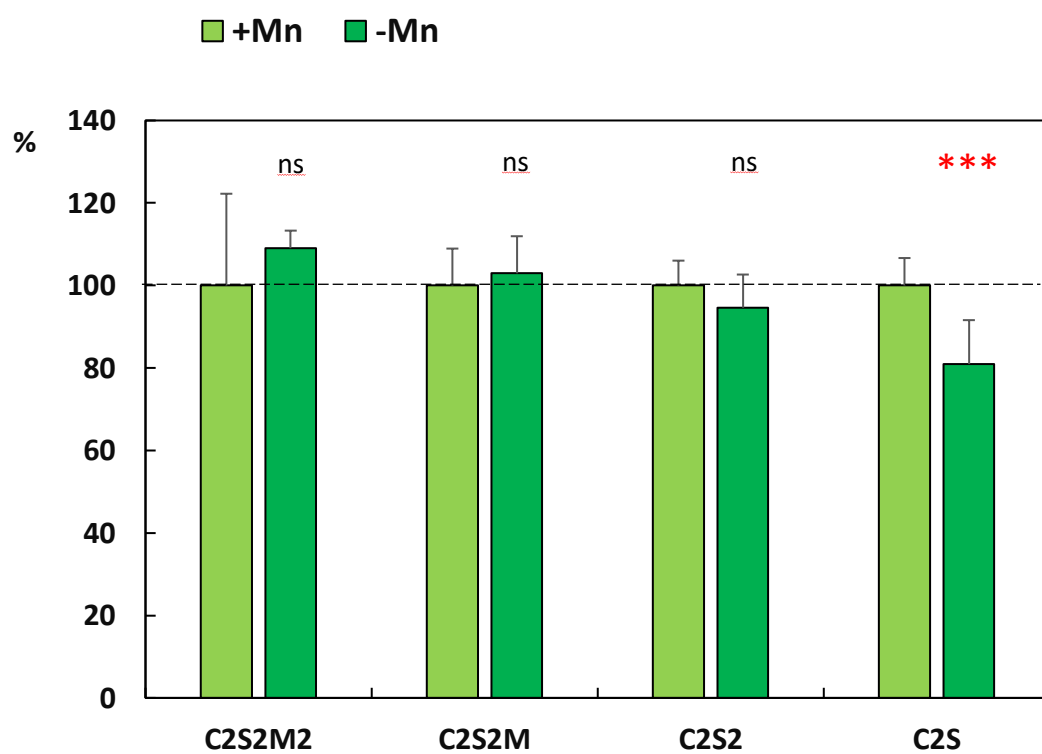
III. Mn-hiány hatása a *M. polymorpha* tilakoidszerkezetére

A Mn-hiányos növények komplex mintázatában alig látszik változás (6. ábra). Ezzel összhangban, a kvantitatív kiértékelés alapján a fő komplexek közül csak a cit *b₆f* komplex kismértékű mennyiségi növekedését figyeltük meg (9. ábra).

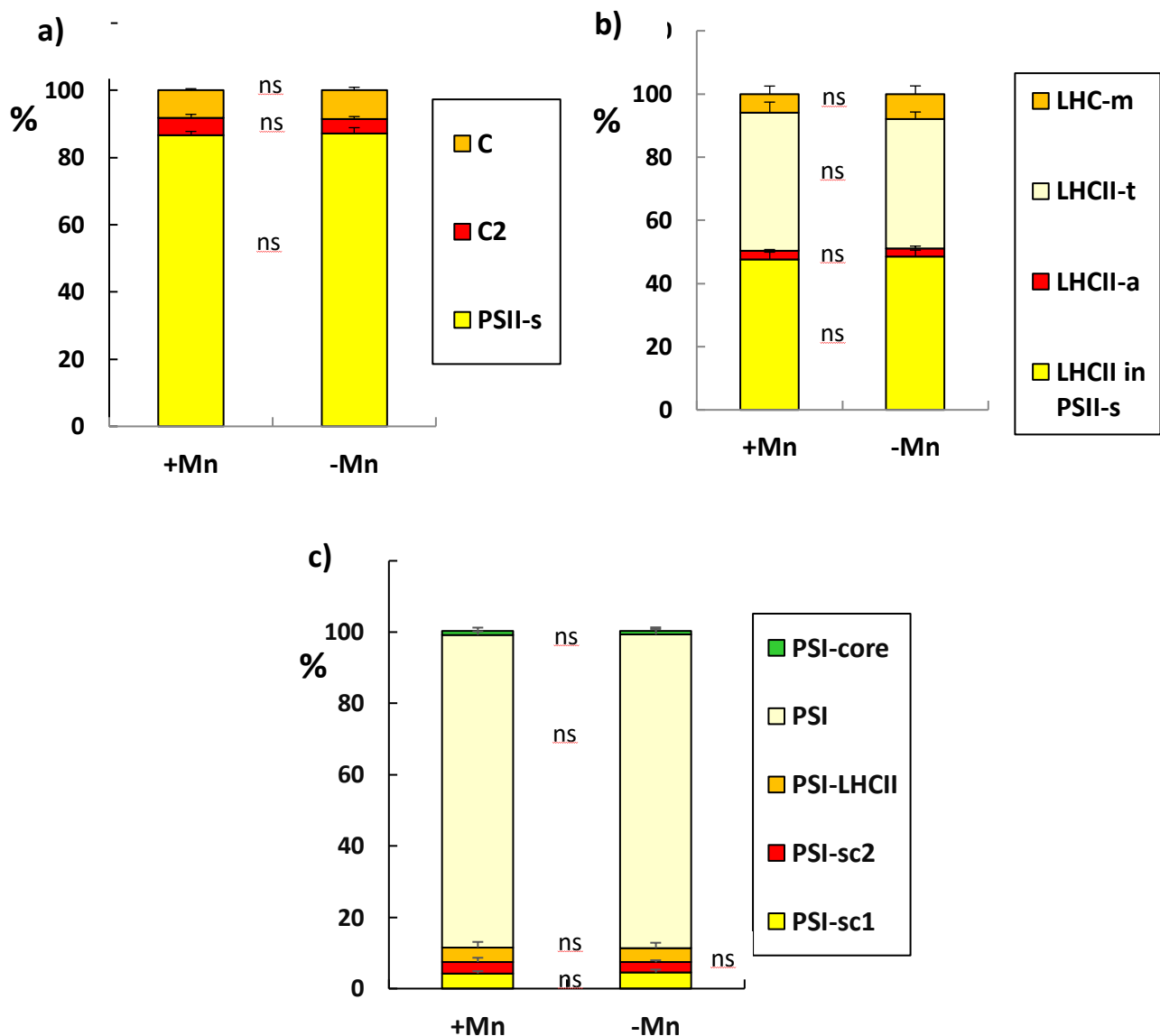


9. ábra- A fő proteinkomplexek megoszlásának változása Mn-hiány hatására. A szignifikancia-szint jelölése: ** - erősen szignifikáns, ns - nem szignifikáns.

Bár a két fotokémiai rendszerhez tartozó, valamint az antennák megjelenő komplex-formáinak arányai nem mutattak jelentős különbséget a Mn-hiányos és kontroll növények között (11. ábra), de érdekes módon Mn hiányában nagyobb arányban vannak jelen a nagyobb tömegű, nagyobb antennával rendelkező PSII szuperkomplexek (10. ábra).



10. ábra – A PSII szuperkomplex formák megoszlásának változása Mn-hiány hatására. A szignifikancia-szint jelölése: *** - rendkívül szignifikáns, ns - nem szignifikáns.



11. ábra - A PSII (a), az LHCII (b) és PSI (c) komplexformáinak megoszlásai. A szignifikancia-szint jelölése: ns - nem szignifikáns.

A fő proteinkomplexek, a PSII szuperkomplexek és a PSI komplexformák megoszlását az 1. dimenziós denzitogramokból, a PSII ill. LHC megoszlásokat a CP43 (PsbC) ill. LHC (Lhcb) apoproteinek 2. dimenziójú elválasztással kapott sávdenzitációjából számoltuk.

IV. A *M. polymorpha*-ban kimutatott új PSI-jellegű szuperkomplexek jellemzése

Először a komplexekben kötött antennákat próbáltuk azonosítani MS-sel. Kivágtuk analízisre a kérdéses sávokat a BN gélből, ahol a fehérjék meghatározására kerültek. A proteomikai adatok nem voltak elégségesek az azonosításukra, mivel egyes sávok (1-es) PSII-t is tartalmaztak, ill. a vizsgált sávokban mindig volt egy kicsi PSII szennyeződés, valamint az

adatbázisból kapott Chl *a/b* protein megnevezés nem adott információt arra vonatkozóan, hogy ezek az antennák melyik fotoszisztémához tartoznak *M. polymorpha*-ban. Emiatt 'blast'-olást hajtottunk végre, mely lehetővé tette, hogy a kérdéses fehérjék szekvenciájával leginkább azonos fehérjéket megkeressük (UniProt) adatbázisban, így jobban felmérve azok lehetséges funkcióit (2. táblázat).

2. táblázat – A Chl *a/b* kötő antennafehérjék 'blast'-olással kapott adatai. (*: reverz-'blast' során nem az eredeti fehérjét kaptuk vissza. Félkövérré formáztuk, amennyiben a reverz-'blast' legjobb találat az eredeti fehérje volt.)

<i>M. polymorpha</i> azonosító	<i>A. thaliana</i> azonosító	Fehérje megnevezése	Gén	Azonosság (%)	Reverz blast eredmény	Sáv, amiben jelen van:
A0A176VXF1	Q9SHR7	Chlorophyll a-b binding protein 2.1	LHCB2.1	79.3%	* A0A176WAT8	1, PSI- LHCII,5
A0A176WAT8	Q9XF87	Chlorophyll a-b binding protein 2.4	LHCB2.4	81.1%	A0A176WAT8	1, 5
A0A176VFA6	Q9SHR7	Chlorophyll a-b binding protein 2.1	LHCB2.1	78.8%	* A0A176WAT8	1, 2, 5
A0A176WAU9	Q9SHR7	Chlorophyll a-b binding protein 2.1	LHCB2.1	79.5%	* A0A176WC50	1, 5
A0A2R6W0N7	Q9SHR7	Chlorophyll a-b binding protein 2.1	LHCB2.1	82.2%	* A0A176WC50	1, 2
A0A2R6WUA3	Q9XF87	Chlorophyll a-b binding protein 2.4	LHCB2.4	79.2%	* A0A176WAT8	1, 5
A0A176VRB8	Q07473	Chlorophyll a-b binding protein CP29.1	LHCB4.1	78.8%	A0A176VRB8	1, 2, PSI- LHCII,4,5
A0A176WA68	Q9XF89	Chlorophyll a-b binding protein CP26	LHCB5	71.2%	A0A176WA68	1, 5

A0A176WMR9	Q9XF87	Chlorophyll a-b binding protein 2.4	LHCB2.4	76.4%	* A0A176WAT8	1, PSI-LHCII,5
A0A176W6J9	Q9S7M0	Chlorophyll a-b binding protein 3	LHCB3	76.8%	A0A176W6J9	1
A0A176W9Q3	Q9SHR7	Chlorophyll a-b binding protein 2.1	LHCB2.1	81.4%	* A0A2R6W0N7	2
A0A176VZD6	Q9LMQ2	Chlorophyll a-b binding protein	LHCB6	73.3%	A0A176VZD6	1, 2, 5
A0A176VXC6	Q9XF87	Chlorophyll a-b binding protein 2.4	LHCB2.4	76%	* A0A2R6W0N7	2, PSI-LHCII
A0A176W9J5	Q9SHR7	Chlorophyll a-b binding protein 2.1	LHCB2.1	78.4%	* A0A2R6W0N7	PSI-LHCII
A0A2R6WPQ8	Q9S7M0	Chlorophyll a-b binding protein 3	LHCB3	75.5%	A0A2R6WPQ8	5
A0A176W1W6	P27521	Chlorophyll a-b binding protein 4	LHCA4	70.8%	A0A176W1W6	1, 2, PSI-LHCII,4
A0A176W799	Q9SYW8	Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 2	LHCA2	75.6%	A0A176W799	1, 2, PSI-LHCII,4
A0A176VHT1	Q9SY97	Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 3-1	LHCA3	79.4%	A0A176VHT1	1, 2, PSI-LHCII,4
A0A176WCV3	Q01667	Chlorophyll a-b binding protein 6	LHCA1	70.5%	* I7JWJ2	2, PSI-LHCII

Az MS-sel azonosított antennafehérjék 'blast'-olása során a keresést *A. thaliana*-ra szűkítettük. A fehérjék neve mellett, a fehérjét kódoló gén elnevezéséből tudtunk a funkcióra következtetni. Jelen voltak a sávokban a PSII kapcsolóantennái (Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6) és az LHCII-trimereket alkotó antennák (Lhcb2, Lhcb3), valamint a PSI perifériás LHCI övét létrehozó antennák (Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4). Az átlagos szekvenciahasonlóság az összes antennafehérje esetén $76,7 \pm 3,65\%$. A két fotokémiai rendszer antennafehérjei esetében a szekvenciahasonlóság-értékek nem térnek el szignifikánsan (az Lhcb antennafehérjék szekvenciahasonlósága $77,86 \pm 3,02\%$, míg az Lhca fehérjéké $73,78 \pm 3,65\%$), tehát egyoldalú tendencia figyelhető meg, ahol az értékek kb. 73 és 81% között mozognak. Ezek alapján nem jelenthető ki, hogy az egyik fotokémiai rendszer antennafehérjei konzerváltabbak lennének a másikonál. A fehérjeszekvenciák konzerváltsága azon peptidek esetében jelenthető ki magabiztosan, ahol a reverz-'blast'-olás során visszakaptuk az eredeti *M. polymorpha*

proteint. Ez jelzi a taxonok közötti evolúciós konzerváció mértékét, ami a funkcionális homológia fennállását is valószínűsíti, vagyis ezen *A. thaliana* fehérjék a *M. polymorpha* fehérjékkel erős homológiát mutatnak. A0A2R6W0N7, A0A2R6WUA3, A0A176W9J5 azonosítójú *M. polymorpha* fehérjék esetén a reverz-'blast'-olás során nem volt a találatok között az eredeti protein, így e fehérjéknél nem tudunk erős homológiát kimutatni, ám a magas szekvencia hasonlóság így sem hagyható figyelmen kívül. A többi fehérje esetén, ahol nem jelentkezett erős homológia, bár nem legjobb találatként, de visszakaptuk az eredeti proteint és az első találat minden esetben Chl *a/b*-kötő protein volt (3. táblázat). A sávokban a 17 Lhcb homológ 41%-a, a 4 Lhca homológ 75%-a mutatott erős homológiát.

3. táblázat - Reverz-'blast' eredményei azon fehérjék esetén, ahol nem az eredeti fehérjét kaptuk vissza legjobb találatként.

Eredeti <i>M. polymorpha</i> fehérje azonosító	Reverz-'blast' eredménye	Fehérje megnevezése	Azonosság (%)	Score
A0A176VXF1	A0A176WAT8	Chlorophyll a-b binding protein	81.8%	1144
A0A176VFA6	A0A176WAT8	Chlorophyll a-b binding protein	81.8%	1144
A0A176WAU9	A0A176WC50	Chlorophyll a-b binding protein	82.5%	1143
A0A2R6W0N7	A0A176WC50	Chlorophyll a-b binding protein	82%	1144
A0A2R6WUA3	A0A176WAT8	Chlorophyll a-b binding protein	81.1%	1148
A0A176WMR9	A0A176WAT8	Chlorophyll a-b binding protein	81.1%	1148
A0A176W9Q3	A0A2R6W0N7	Chlorophyll a-b binding protein	82.2%	1153
A0A176VXC6	A0A2R6W0N7	Chlorophyll a-b binding protein	81.1%	1152
A0A176W9J5	A0A2R6W0N7	Chlorophyll a-b binding protein	82.2%	1153

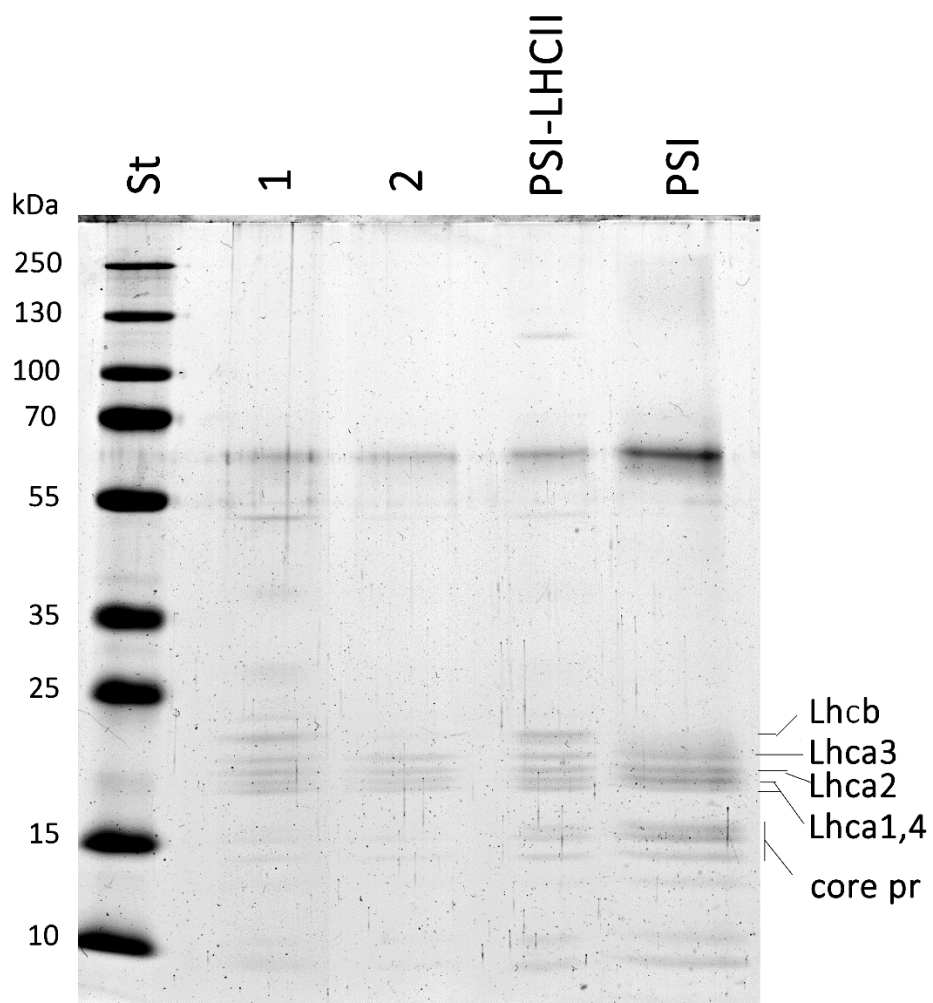
4. táblázat – A mintákban MS-val kimutatott fehérjék. Az MS során kapott antennafehérjéket 'blast'-olással azonosítottuk. A „+” jelöli, ha a sáv tartalmazta az adott fehérjét.

Fehérjék		1	2	PSI- LHCII	4	5
	Lhcb2	+	+	+		+
	Lhcb3	+				+
	Lhcb4	+	+	+	+	+
	Lhcb5	+				+
	Lhcb6	+	+			+
	Lhca1		+	+		
	Lhca2	+	+	+	+	
	Lhca3	+	+	+	+	
	Lhca4	+	+	+	+	
PSI reakciócentrum	PsaA	+	+	+	+	
	PsaB	+	+	+		
PSI core fehérjék	PsaC	+	+	+	+	
	PsaD	+	+	+	+	
	PsaF	+	+	+	+	
	PsaG	+	+	+		
	PsaH	+	+			
	PsaL	+	+	+	+	
PSII reakciócentrum	PsbA	+	+	+	+	+
	PsbD	+	+	+	+	+
PSII core fehérjék	PsbB	+	+	+	+	+
	PsbC	+	+			
	PsbE	+	+		+	
	PsbH			+		
cit b_6/f komplex fehérjék		+				+
ATP-szintáz fehérjék			+	+		+

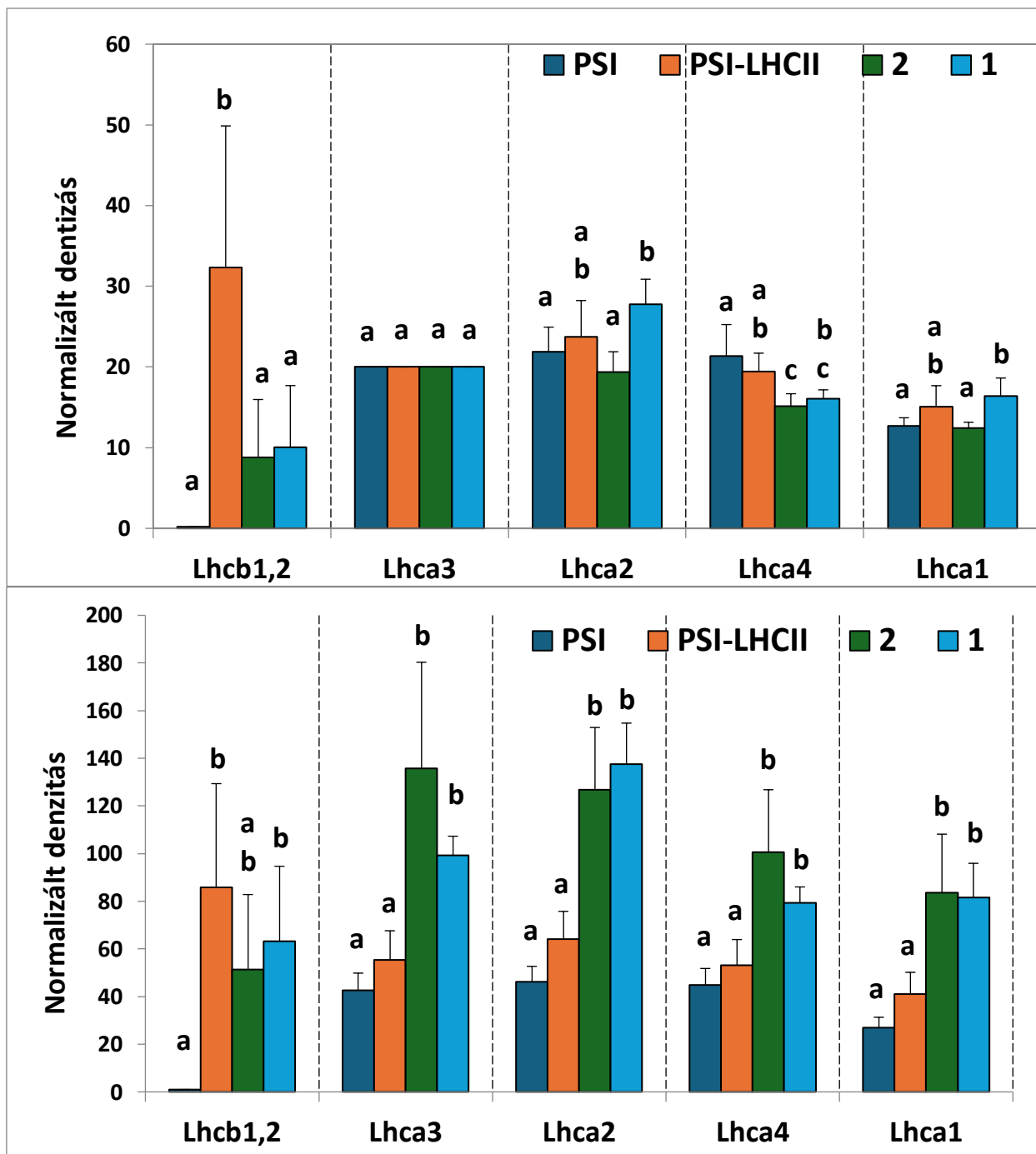
NDH-komplex alegységek				+	
------------------------	--	--	--	---	--

Az 1-es és 2-es sávban jelen voltak a vártaknak megfelelően a PSI reakciócentrum és *core* fehérjék, valamint az Lhca antennafehérjék. Ezek mellett viszont tartalmazott PSII reakciócentrum, *core* és Lhcb antennákat is. A PSI-LHCII sáv referenciaként szolgált. A 4. sáv hasonló fehérjetípusokat tartalmazott, mint a sc sávok, valamint NDH-komplex alegységei is jelen voltak. Az 5. sávban nem voltak jelen a PSI fehérjéi, viszont tartalmazott Lhcb fehérjét, amik a mellette futó LHCII-a sávból is származhatnak.

Megvizsgáltuk a PSI sávokat denaturáló SDS-PAGE-sel is (12. ábra). Ezek denzitogramjainak kiértékelésekor, a C₂S komplex és az adott PSI komplex PSII CP43 protein/Lhcb arányát figyelembe véve, levontuk a feltehetően PSII szennyeződésből származó Lhcb mennyiséget. A denzitometrálásból származó adatokat ábrázoltuk mind a Lhca3 (13/a. ábra), mind a *core* (13/b. ábra) fehérjékre normalva. Lhca3-ra történő normálás arról tanúskodik, hogy a vizsgált PSI komplexek nagyjából azonos arányban tartalmazták a különböző Lhca apoproteineket. Az új PSI-jellegű-sc-ekben az Lhcb mennyisége kevesebbnek adódott, mint a PSI-LHCII komplexben. A *core* fehérjékre való normálás azért volt szükséges, mert szerettünk volna a Lhca fehérjék arányaira fókuszálni a *core* proteinekhez viszonyítva. Ekkor az Lhca mennyisége az 1-es és 2-es sáv esetében nagyjából kétszerese volt a PSI-LHCII és PSI komplexhez tartozó értékeknek (13/b. ábra).



12. ábra – A PSI sávok antennaszerkezete: az első dimenzióban elvált PSI-tartalmú sávok fehérjéinek 2. dimenzióban történő SDS-PAGE elválasztása.



13. ábra - A PSI sávokban kimutatható antennásávok arányai az Lhca3-ra (a) ill. a jelölt core fehérjékre normálva (b). Szignifikancia-különbségek szerinti csoportba rendezés jelölései: a, ab, b, bc, c.

Diszkusszió

A Mn-hiányos állapotban a PSII maximális kvantumhatékonyság csökkenését (5. ábra) korábban Hani és Krieger-Liszkay (2024) is tapasztalták. Az általunk mért csökkenés mértéke egyezik a korábban mértekkel, így megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált rendszer ugyanazt az élettani státuszt képviselte. A csökkenés hátterében a PSII reakciócentrumok növekedő inaktivitása áll, hiszen Mn hiányában a PSII reakciócentrumok javítómechanizmusai és bioszintézise nem mehet végbe, illetve a nem-aktív reakciócentrumok részesedése növekedik.

A membránkomplexek elválasztása előtt a szolubilizáláshoz β -DM-et és digitonint használtunk, ami jobban megtartja a komplexeket alkotó komponensek kölcsönhatásait (Sárvári és mtsai, 2022). A *M. polymorpha* PSII komplexek – egyetértésben Harrer (2003) glicerín sűrűség-gradiens centrifugálással nyert eredményeivel és az eddigi egyetlen BN vizsgálattal (Ueda és mtsai, 2012) – hasonlóak voltak az edényes növényekben találtakéhoz (Sárvári és mtsai, 2022). Fontos megjegyezni, hogy kifejezett növényekben a megjelenő PSII szuperkomplexek arányát a környezeti hatásokon kívül a szolubilizálásra való érzékenyséjük is befolyásolhatja. A Mn-hiányos és kontroll tilakoidmintázat hasonlósága összefüggésben lehet azzal, hogy a telepek zöld részeiben, amiből a tilakoidokat izolálni tudjuk (3. ábra), elég Mn van a tilakoidrendszer normális kialakulásához, valamint a XRF térképezés alapján (4. ábra) sem állt fent súlyosan Mn-hiányos állapot. Ugyanakkor a más objektum és az enyhébb szolubilizálási feltételek miatt az edényes növényekhez képest új PSI-jellegű sávokat (1, 2, 4.) és egy új antenna sávot (5.) is találtunk (8. ábra).

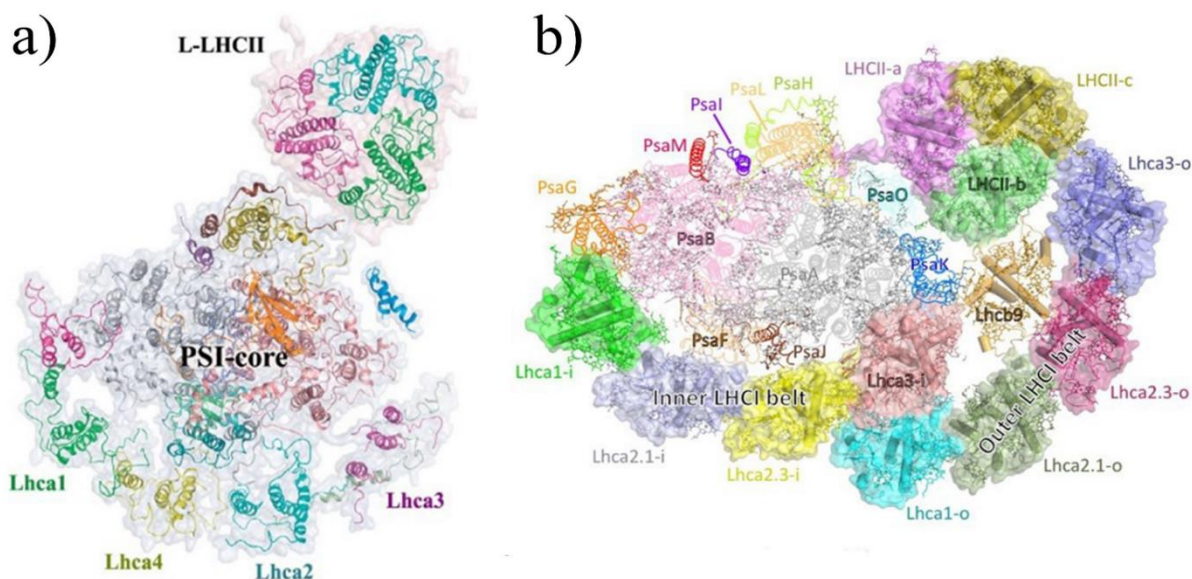
A kontroll és Mn-hiányos telepek tilakoidszerkezetét jobban megvizsgáltuk a denzitogramok kvantitatív kiértékelésével. A megnövekedett cit b_6/f komplex mennyiség (9. ábra) a Mn-hiányos növények esetében a CET aktivitás emelkedésével függhet össze (Messant és mtsai, 2023; Hani és Krieger-Liszkay, 2024). Bár a PSI mennyiségében nem láttunk változást, de lehetséges, hogy több PSI vesz részt a CET-ben, és ez igényli a cit b_6/f komplex mennyiségének növekedését. Gradiens centrifugálással izoláltak a CET-ben együttműködő PSI-cit b_6/f komplexet (Iwai és mtsai, 2010). Sajnos ilyen komplexet BN-PAGE-sel még nem sikerült kimutatni. Bár a Mn hiánya a külső morfológiát jelentősen befolyásolta, de a komplex és komplexformák megoszlásában nem láttunk változást (11. ábra). Ennek oka, hogy ezen

megoszlásokat a telep zöld részeiből kinyert mintáiban tudjuk vizsgálni, ahol elegendő klorofill van jelen és a tilakoidszerkezet Mn-hiány által kevésbé befolyásolt. A nagyobb antennával rendelkező PSII szuperkomplexek nagyobb arányú megjelenésének oka (10. ábra) a PSII és a külső antennáinak erősebb kötődése, nehezebb szolubilizálhatósága lehet. Kimutatták ugyanis, hogy Mn-hiány esetén *M. polymorpha*-ban nagyobb gránumok vannak jelen (Messant és mtsai, 2023), melyekben elképzelhető, hogy a PSII szuperkomplexekben a PSII és antennáinak kapcsolata is változik. Ennek megállapítása további vizsgálatokat igényel, azonban eredményeink a PSII szuperkomplexek szerveződésének Mn-hiány általi befolyásoltságát mutatják. Emellett magyarázza a megoszlásokat, hogy kontraszelektált populációt vizsgáltunk. Az erősebben kötődő antennával rendelkező PSII komplexek megtartották a szerkezetüket, míg egy részük szétesett, melyeket szuperkomplex-formájukban nem tudtunk vizsgálni.

Végül a *M. polymorpha*-ban kimutatott új sávokat és PSI-jellegű szuperkomplexeket karakterizáltuk. A BN géleken kapott új sc sávok máshol jelentek meg a géljeinken (6. ábra), mint az edényes növényeknél (Sárvári és mtsai, 2022). A 2D fehérjemintázat (7. és 8. ábra) az 1-es és 2-es sc sáv, valamint a 4-es sáv PSI-jellegét sejtette, mivel tartalmaztak PSI *core* fehérjét. Ezek a komplexek molekulatömegük alapján nem tekinthetők az 560 kDa tömegű PSI komplex oligomerjeinek, azaz a kapott komplexek feltehetően inkább antennaméretükben különbözhetnek. Ez volt az oka, hogy először az antennafehérjét próbáltuk meg azonosítani (2. táblázat). Az antennafehérje-tartalom felmérésére 'blast'-olást alkalmaztunk. Alboresi és mtsai munkája (2008) alapján elmondható, hogy a reakciócentrum fehérjék a különböző taxonok között konzerváltak, az Lhc fehérjék viszont nagyobb variabilitást mutatnak, öt antennafehérjében ennek ellenére mégis csekély mértékű szekvenciális eltérések vannak jelen: az Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhcb4 és Lhcb5 fehérjében. Ezen fehérjék tehát szekvenciájukban erősen konzerváltak, a mi vizsgáltunkban az Lhca1 fehérjét leszámítva az összes erős homológiát mutatott *M. polymorpha* az *A. thaliana* között (2. táblázat) és a funkciójuk is több, mint valószínű, hogy megegyezik. Az átlagos szekvenciahasonlóság a két faj között magasnak mondható ($76,7 \pm 3,65\%$), hiszen köztük az evolúciós távolság nagy, a közös ősük több százmillió évvel ezelőtt élt. *A. thaliana*-ban a PSI-NDH szuperkomplex képződéséhez Lhca5 és/vagy Lhca6 antennafehérje szükséges (Kouřil és mtsai, 2014). A 4. sávban (az NDH fehérje tartalma ellenére) feltehetőleg nem egy PSI-NDH szuperkomplex fut, hanem csak egy

kisebb méretű NDH komplex, mivel nem valószínű, hogy modellnövényünk genomja kódolja az említett antennafehérjét, így a szuperkomplex létrejötte nem lehetséges (Ueda és mtsai, 2012). Az MS és a 'blast' együttes eredményei alapján tehát az 1-es, a 2-es és 4-es sávot PSI-sávnak mondhatjuk, hiszen tartalmazott PSI *core*, reakciócentrum és Lhca fehérjét, viszont mindegyikben volt PSII-hez tartozó fehérje is. Az 5-ös sáv nem PSI sáv, mivel csak PSII-hez tartozó proteinek voltak benne jelen, főképp Lhcb antennák. Nem eldönthető, hogy a PSI sávokban kimutatott Lhcb antennafehérjék a PSI-szuperkomplexhez tartoznak-e vagy szennyeződésként vannak jelen, ill. az 5. (új) antennasáv nem volt azonosítható.

A PSI sávok SDS-PAGE-sel történt elválasztása után, a gél kiértékelése során azt tapasztaltuk, hogy az Lhca3-ra történő normálás eredményeképpen a vizsgált PSI komplexek nagyjából azonos arányban tartalmazták a különböző Lhca apoproteineket (13/a. ábra), hasonlóan az edényes növényeknél megfigyeltékhez (14/a. ábra). A PSI-LHCII komplexben az edényes növényeknél egy LHCII trimer van jelen (Pan és mtsai, 2013), viszont az új PSI-sc-ekben kevesebb Lhcb fehérje volt jelen. Az Lhcb mennyiségekben nem igazán tudtunk különbséget tenni, tehát ennek alapján nem zárhatjuk ki, hogy az 1-es és 2-es sc LHCII-t is tartalmaz, bár az előbbinél a PSII szennyeződés miatt ez nehezen dönthető el, az utóbbi 2. dimenzióban elvált sávmintázata alapján ez kevésbé valószínű. Biztosabb eredményekhez nagyobb mennyiségű tisztább komplexek vizsgálatára van szükség. Eddigi eredményeink alapján tehát, szemben a zárvatermő, és más virágos növények PSI-szuperkomplexeihez (14/a. ábra), az új PSI szuperkomplexek valószínűleg olyan jellegűek, melyeket megfigyeltek már a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában (Huang és mtsai, 2021) és a *Physcomitrium patens* lombosmoha esetében egy preprint tanulmányban is (Sun és mtsai, 2023), ahol az LHCI fehérjék egy második övként is körbeveszik a PSI szuperkomplexet (14/b. ábra), ezzel elősegítve a maximális PSI aktivitást, mely feltehetően különösen fontos egy olyan élőlény számára, amely a vízi-szárazföldi élet határán igyekszik alkalmazkodni a változó fényviszonyokhoz (Gerotto és mtsai, 2022).



14. ábra - Egy virágos növény, a *Pisum sativum* (borsó) PSI komplexe (Pan és mtsai, 2013), ahol a PSI-hez LHCII trimer kötődik (a). *Physcomitrium patens* PSI komplexe (Sun és mtsai, 2023), melyben a Lhca antennák dupla övként veszik körbe a PSI reakciócentrumát (b).

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük, hogy kutatásainkhoz Dr. Anja Krieger-Liszky (CEA-CNRS-I2BC, Franciaország) eljuttatta számunkra a *M. polymorpha* modellt. Köszönjük Dr. Umama Hani (CEA-CNRS-I2BC) segítségét a *M. polymorpha* telepek nevelésének, valamint a Mn-hiány előidézésének optimalizációjában. Köszönjük Dr. Sébastien Thomine (CNRS-I2BC) segítségét az izolált tilakoid-minták cseréjében, összevetésében, valamint a növénynevelő kamrarendszer beállításainak optimalizációjában.

Köszönjük Dr. Schlosser Gitta és laboratóriuma segítségét a tömegspektrometriás analízis elvégzésében, ill. köszönet a módszertanba való betekintés lehetőségéért.

Köszönöm Dr. Sárvári Évának, hogy megtanította nekem a fehérjeelválasztás módszerét és annak kiértékelését. Hálával tartozom a dolgozatom összeállításában nyújtott támogatásáért is.

És természetesen köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Solti Ádámnak, aki nélkül ez a kutatómunka nem jöhetett volna létre.

A kutatásokat a Magyar Tudományos Akadémia és a Francia Nemzeti Tudományos Kutatási Központ (Centre National de la Recherche Scientifique) közös bilaterális Projektalapú kutatói mobilitási programja támogatta (NKM2022-14).

Irodalomjegyzék

Alboresi, A., Caffarri, S., Nogue, F., Bassi, R., & Morosinotto, T. (2008) In silico and biochemical analysis of *Physcomitrella patens* photosynthetic antenna: identification of subunits which evolved upon land adaptation. *PLOS One*, 3, e2033.

Aro, E. M. (1982) A comparison of the chlorophyll-protein composition and chloroplast ultrastructure in two bryophytes and two higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 108, 97-105.

Bowman, J. L. (2022) The liverwort *Marchantia polymorpha*, a model for all ages. *Current Topics in Developmental Biology* 147, 1-32.

Bowman, J. L., Araki, T., & Kohchi, T. (2016) *Marchantia*: past, present and future. *Plant and Cell Physiology*, 57, 205-209.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., ... & Righetti, P. G. (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25, 1327-1333.

Eftychis Frangedakis 2019. *Marchantia* chloroplast isolation. protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4x6gxre>

Fuad, N., Day, D. A., Ryrie, I. J., & Thorne, S. W. (1983) A photosystem II light-harvesting chlorophyll-protein complex with a high fluorescence emission at 736 nm. *Photobiochemistry and Photobiophysics*, 5, 255-262.

- Gerotto, C., Trotta, A., Bajwa, A. A., Morosinotto, T., & Aro, E. M. (2022) Role of serine/threonine protein kinase STN7 in the formation of two distinct photosystem I supercomplexes in *Physcomitrium patens*. *Plant Physiology*, 190, 698-713.
- Hakala, M., Tuominen, I., Keränen, M., Tyystjärvi, T., & Tyystjärvi, E. (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706, 68-80.
- Hani, U., & Krieger-Liszkay, A. (2024) Manganese deficiency alters photosynthetic electron transport in *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 215, 109042.
- Harrer, R. (2003) Associations between light-harvesting complexes and Photosystem II from *Marchantia polymorpha* L. determined by two-and three-dimensional electron microscopy. *Photosynthesis Research*, 75, 249-258.
- Huang, Z., Shen, L., Wang, W., Mao, Z., Yi, X., Kuang, T., ... & Han, G. (2021) Structure of photosystem I-LHCI-LHCII from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in State 2. *Nature Communications*, 12, 1100.
- Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi, Y., & Minagawa, J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature*, 464, 1210-1213.
- Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V., & Aro, E. M. (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and megacomplexes. *Biochemical Journal*, 439, 207-214.
- Kouřil, R., Strouhal, O., Nosek, L., Lenobel, R., Chamrád, I., Boekema, E. J., ... & Ilík, P. (2014) Structural characterization of a plant photosystem I and NAD (P) H dehydrogenase supercomplex. *The Plant Journal*, 77, 568-576.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Messant, M., Hani, U., Hennebelle, T., Guérard, F., Gakière, B., Gall, A., ... & Krieger-Liszkay, A. (2023) Manganese concentration affects chloroplast structure and the photosynthetic apparatus in *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiology*, 192, 356-369.

Munekage, Y. N. (2016) Light harvesting and chloroplast electron transport in NADP-malic enzyme type C₄ plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, 9-15.

Oliver, N., Avramov, A. P., Nürnberg, D. J., Dau, H., & Burnap, R. L. (2022) From manganese oxidation to water oxidation: assembly and evolution of the water-splitting complex in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 152, 107-133.

Pan, X., Liu, Z., Li, M., & Chang, W. (2013) Architecture and function of plant light-harvesting complexes II. *Current Opinion in Structural Biology*, 23, 515-525.

Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975, 384-394.

Rantala, M., Rantala, S., & Aro, E. M. (2020) Composition, phosphorylation and dynamic organization of photosynthetic protein complexes in plant thylakoid membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19, 604-619.

Schägger, H., & von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199, 223-231.

Sárvári, É., Gellén, G., Sági-Kazár, M., Schlosser, G., Solymosi, K., & Solti, Á. (2022) Qualitative and quantitative evaluation of thylakoid complexes separated by Blue Native PAGE. *Plant Methods*, 18, 23.

Schmidt, S. B., & Husted, S. (2019) The biochemical properties of manganese in plants. *Plants*, 8, 381.

Schmidt, S. B., Jensen, P. E., & Husted, S. (2016) Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. *Trends in Plant Science*, 21, 622-632.

Schmidt, S. B., Persson, D. P., Powikrowska, M., Frydenvang, J., Schjoerring, J. K., Jensen, P. E., & Husted, S. (2015) Metal binding in photosystem II super- and subcomplexes from barley thylakoids. *Plant Physiology*, 168, 1490-1502.

Simpson, D. J., & Robinson, S. P. (1984) Freeze-fracture ultrastructure of thylakoid membranes in chloroplasts from manganese-deficient plants. *Plant physiology*, 74, 735-741.

Sun, H., Shang, H., Pan, X., & Li, M. (2023) Lhcb9-dependent photosystem I structure in moss reveals evolutionary adaptation to changing light conditions during aquatic-terrestrial transition. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.01.18.524345>

Takahashi, S., & Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition?. *Trends in Plant Science*, 13, 178-182.

Tomizioli, M., Lazar, C., Brugière, S., Burger, T., Salvi, D., Gatto, L., ... & Ferro, M. (2014) Deciphering thylakoid sub-compartments using a mass spectrometry-based approach. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 2147-2167.

Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, H., Sugimoto, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., ... & Shikanai, T. (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *The Plant Journal*, 72, 683-693.

Yadav, K. S., Semchonok, D. A., Nosek, L., Kouřil, R., Fucile, G., Boekema, E. J., & Eichacker, L. A. (2017) Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome *b6f*, light-harvesting complex II and NDH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1858, 12-20.