

A vas kompartmentalizációjának változásai levelekben

36. OTDK Biológia Szekció

Biológia BSc. II. évfolyam

készítette: Radics Nóra

témavezetők:

Sági-Kazár Máté

PhD-hallgató

és

Dr. habil. Solti Ádám

egyetemi docens

Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Abszrakt	2
Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés	5
Célkitűzés	9
Anyagok és módszerek	10
Eredmények	13
Diskusszió	19
Köszönetnyilvánítás.....	23
Irodalomjegyzék	23

Absztrakt

A vas egy esszenciális mikroelem, amely kiemelkedően fontos katalitikus szerepet tölt be a redox-folyamatokkal járó, így a reaktív oxigénformákat elimináló enzimreakciókban. Kiemelkedő szerepe van a fotoszintetikus és légzési elektrontranszport-láncok működésében. Haszonnövények esetén a vasellátás romlása terméshozam-csökkenéshez vezethet, de a termesztett növények vashiánya hozzájárul az emberi vashiány kialakulásához is. A vas szervezetben belüli többlete szintén fokozza az oxidatív károsodások mértékét, így a növényi anyagcsere útvonalak optimális működését, elsősorban Fenton-reakciókon keresztül. A levelek vas-homeosztázisának megőrzésében a gyökér vasfelvételi rendszer és a hosszútávú vastranszport szabályozásának esszenciális szerepe van. E folyamatban a mezofillum-sejtek vasérzékelése és az ebből kiinduló hosszútávú szignalizációs rendszer lehet felelős. A kutatásokban *Arabidopsis thaliana* modellen vizsgáltuk levélsejtek, és kompartmentjei (mitokondriumok, kloroplasztiszok, vakuólum) vastartalmának, illetve levelek vaseloszlásának változását különböző vasellátásokra adott válaszként. A kapott eredmények alapján össze tudjuk vetni, hogy a vasellátás milyen hatással van az egyes kompartmentek vaseloszlásának változására.

Rövidítésjegyzék

ATM3: ATP-binding Cassette Transporter of Mitochondria 3 (ABC transzporter)

bHLH: basic-Helix-Loop-Helix transzkripció faktor

BSA: szarvasmarha szérum albumin

BTS: BRUTUS

BTL: BRUTUS-Like

CIA: Cytosolic Iron-Sulfur Assembly

DDT: dithiotreitol

EDTA: etilén-diámin-tetraacetát

FER1/3: Ferritin

FIT: Fer-Like Iron Deficiency Induced Transcription Factor

FPN3: Ferroportin 3

FRO: Ferric Reductase Oxidase (vas-kelát-reduktáz)

HRZ: Hemerythrin motif-containing Really Interesting New Gene-and Zinc-finger protein

IDT1: Iron Deficiency Tolerant 1

ILR3: IAA-Leucine Resistant 3

ISC: Iron-Sulfur Cluster system

MFL: Mitoferrin-Like

MIT: Mitochondrial Iron Transporter

NEET: Asp-Glu-Glu-Thr motívummal rendelkező fehérje

NiCo: Nikkel-kobalt transzport protein

NRAMP: Natural Resistance-Associated Macrophage Protein

OPT: Oligopeptide Transzporter (floém-specifikus vas transzporter)

PIC: Permease In Chloroplasts

PS: fotokémiai rendszer (Photosystem)

PVP: polivinilpirrolidon

PYE: POPEYE

ROS: reaktív oxigén formák (Reactive Oxygen Species)

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SUF: Sulfur Utilization Factor

URI: Upstream Regulator of IRT1

VOZ1/2: Vascular Plant One-Zing Finger 1/2

VTL: Vacuolar Iron Transporter-Like

XRF: röntgenfluoreszcencia

YSL: Yellow Stripe-Like

Bevezetés

A vas (Fe) kiemelt fontosságú esszenciális mikroelem növényekben. Kiemelkedő szerepe van a fotoszintetikus és légzési elektron transzportláncok működésében, valamint ROS-elimináló és klorofill bioszintetikus enzimek kofaktora (Vigani és Hanikenne, 2018; Schmidt és mtsai., 2020). Ezek közül a legnagyobb Fe igénye a fotoszintetikus elektron transzport lánc komplexeinek van, melynek működtetéséhez 22 Fe szükséges, elsősorban Fe-S centrumok (I. fotokémiai rendszer; PSI, Citokróm; Cyt *b₆/f* komplex, ferredoxin), illetve hem-csoportok (Cyt *b₆/f*, PSII) és szabad nem-hem Fe (PSII) formájában (Schmidt és mtsai., 2020), így a növények Fe tartalmának túlnyomó része a hajtásban, azon belül is a mezofillum-sejtek kloroplasztiszaiban található (Briat és mtsai., 2015; Hantzis és mtsai., 2018).

A földkéregben a Fe az egyik leggyakoribb elem mégis környezeti hatások miatt, mint például a magas talaj pH, szárazság, vagy meszes talajok, a növények számára nehezen elérhető. Éppen ezért a vashiány a modern mezőgazdasági növénytermesztés egyik legnagyobb kihívása (Schmidt és mtsai., 2019). A növényi szervezetben a Fe elégtelen mennyisége a sejtek biokémiai folyamatainak zavaraihoz vezet, többek között esszenciális redox-folyamatok sérülhetnek. Szervezet szinten így vashiány hatására a fotoszintetikus aktivitás és biomasszaprodukció visszaesik, valamint gátlás alá kerül a klorofill-bioszintézis, melynek fenotípusos megjelenése a levelek sárgasága, az úgynevezett vas-klorózis. A Fe felvételi és hosszútávú transzportrendszerének működésnek zavara szintén hiány tüneteket vált ki a levelekben, míg a Fe többlete és esetleges felhalmozódás a mezofillum-sejtekben hozzájárul a reaktív oxigénformák (ROS) megemelkedett mennyiségéhez, és oxidatív károsodások kialakulásához is (Hanikenne és mtsai., 2021; Bashir és mtsai., 2021). A gyökerek vasfelvételi rendszere működésének és hosszútávú transzport-folyamatai szabályozásának esszenciális szerepe van a levelek Fe homeosztázisának fenntartásában (Gayomba és mtsai., 2015; Kobayashi, 2019).

A magasabb rendű növényekben két jellegzetes mechanizmus alakult ki a vasfelvételre, melyek a Fe redukcióján, illetve komplexálásán alapulnak (Kobayashi és Nishizawa, 2012). Ezek közül a fűfélék (*Poaceae*) talajból történő vasfelvételéhez stabil Fe-komplexeke képeznek, és ezek kerülnek felvételre a rhizoszférából, míg a többi zárvatermő esetében Fe(III)-komplexek redukcióját követően Fe^{2+} kerül felvételre, amely már a citoplazmában hoz létre stabil Fe-komplexekeket (Gao és Dubos, 2021). A növényi Fe transzport során a membránon

keresztül Fe transzport folyamatokban a két stratégia különböző arányban megfigyelhető a legtöbb növénycsoportnál (Sági-Kazár és mtsai., 2022).

Fiatal, xilém-összeköttetéssel nem rendelkező hajtásrészekbe a Fe elsősorban a floémén keresztül (szimplasztikus transzporttal) transzlokálódik, míg a xilém-elemek differenciációját követően a Fe jelentős része a xilém-nedv mozgásával jut a levelekbe (von Wirén és mtsai., 1999; Rellán-Álvarez és mtsai., 2010; Kobayashi és Nishizawa, 2012). A levelek fejlődése során minden esetben a lamina disztális, csúcsi része differenciálódik legelőször, míg a differenciáció folyamata a levél eredéséhez közeli, proximális területeken fejeződik be. A fejlődő levelek szöveteibe így kezdetben floém, majd a differenciáció progressziójával xilém-transzporttal jutnak el az ásványi tápelemek. A levelekben a Fe-elosztás szabályozásáért a levelek érrendszerében, specifikusan a faparenchimában lokalizált Yellow Stripe-Like (YSL) 1 és 3 Fe-nikociánamin transzportereknek lehet szerepe (Kumar és mtsai., 2017). Hiányukban a Fe a levelekben az erek menti szövetekben ragad, míg a mezofillum fenotípusosan klorotikus lesz. Vashiány hatására a *YSL1/3* expressziója csökken, és a floém lokalizált Oligopeptid Transzporter (OPT) 3 expressziója megemelkedik, míg vastöbblet hatására ellentétes változás tapasztalható (Le Jean és mtsai., 2005; Mendoza-Cózatl és mtsai., 2014). Az OPT3 a floémén keresztüli hosszú távú, hajtásból a gyökerek felé irányuló Fe-szignalizációban játszhat szerepet (Mendoza-Cózatl és mtsai., 2014), hiánya a gyökér vasszorbó felvételi génjei konstitutív serkentését okozza (Kumar és mtsai., 2017; García és mtsai., 2018). Az *OPT3* expressziója vashiány hatására megelőzi a gyökér vasszorbó felvételt szabályozó elemeket (Khan és mtsai., 2018), így feltételezhetően a levelek Fe eloszlása többek között a *YSL1/3 – OPT3* rendszer működésének szabályozása alatt állhat.

A sejten belüli vasmozgatást a citoplazma és az organellumok között közvetlen módon szabályozhatja a citoplazmatikus vas-koncentráció változás, attól függően, hogy vashiányt, vagy vastöbbletet jelző szignál alakul-e ki (Gayomba és mtsai., 2015). A mitokondriumok vasszorbó felvételéért *Arabidopsis thaliana*-ban a Mitochondrial Iron Transporter (MIT) 1 és 2 felelős, melyek kettős mutációja letális a növény számára (Jain és mtsai., 2019). Uborkában (*Cucumis sativus*) vashiány hatására e mitokondriális transzportereknek megemelkedik az expressziójuk (Migocka és mtsai., 2018), mely folyamat összefüggésben áll a mitokondriumok kitüntetett szerepével a sejtek energiaháztartásában (Vigani, 2012; Vigani és mtsai., 2013; Jain és Conolly, 2013; Vigani és mtsai., 2019). Mindazonáltal vashiány hatására a kloroplasztiszok vastartalma csökken, és a vasszorbó felvételen szerepet játszó fő elemek expressziója is gátlás alá kerül (Pham és mtsai., 2020; Sági-Kazár és mtsai., 2021), mely erősíti a feltételezést, miszerint a

kloroplasztiszok optimális működése kiegyensúlyozott vasellátást igényel. A kloroplasztiszokba történő vasfelvételben a redukción alapuló útvonal tűnik elsődlegesnek (Jeong és mtsai., 2008), melyben a Ferric Reductase Oxidase (FRO) 7, a Permease In Chloroplasts (PIC) 1 és valószínűleg a Nickel-Cobalt (NiCo) membránfehérje játszanak szerepet (Jeong és mtsai., 2008; Duy és mtsai., 2011). Bár a PIC1 fehérje szerepe megkerülhetetlennek tűnik a felvételben (Duy és mtsai., 2007), a mechanizmus a mai napig nem ismert kellően. E felvételi rendszer része lehet a kloroplasztiszok belső burkolómembránjában lokalizált Mitoferrin-Like (MFL) 1 transzporter, amely a MIT1 és 2 transzporterek rokonfehérjéje (Vigani és mtsai., 2019).

A mitokondriumok és plasztiszok vasháztartása több ponton, több kettős lokalizációjú fehérje miatt is kapcsolatban áll egymással. A Ferroportin 3 (FPN3; ismert még IREG3 és MAR1 néven is) mind a mitokondriumokban, mind a kloroplasztiszokban megtalálható, szerepe a legújabb kutatások szerint a vas-leadásban, így a toxikus vas-felhalmozás elkerülésében van (Kim és mtsai., 2021). Bár korábbi kutatások feltételezték a szerepét a vas-felvételben is (Conte és mtsai., 2009), a levelek fejlődése során tapasztalt kifejeződési mintázata alapján ez valószínűtlen (Pham és mtsai., 2020). A növényekben általánosan jelen lévő, vas-nikociánamin transzporterekként ismert YSL család két tagja (YSL4/6) *Arabidopsis thaliana* csírázó magvaiban expresszál, és megjelenik a sziklevelek proplasztiszainak membránjában, ezért szerepét feltételezik a plasztiszokból történő vas-leadás szabályozásában (Divol és mtsai., 2013). A fejlődő és kifejlett repce (*Brassica napus*) lomblevelekben mért expressziós mintázata azonban szintén valószínűtlenné teszi, hogy az YSL4 jelentős szerepet játszana a mezofillum-sejtek plasztidiális vas-felvételében (Pham és mtsai., 2020). Conte és mtsai., (2013) eredményei azt mutatták, hogy az YSL4/6 elsősorban a tonoplaszt membránjában található meg, ezért a sejteken belüli vas-újraelosztásban lehet szerepük.

Mind a mitokondriumok, mind a kloroplasztiszok fontos szerepet játszanak Fe kofaktorok bioszintézisében (Balk és Pilon, 2011). A kloroplasztiszokban a Fe-S kofaktorok bioszintézise a saját cianobakteriális eredetű Sulfur Mobilization (SUF) útvonalán keresztül történik (Balk és Pilon, 2011) melynek túlnyomó része a fotoszintetikus elektrontranszport lánc részeként nem szabadon mozgatható (Hantzis és mtsai., 2018). Az ATP-binding Cassette Transporter of Mitochondria (ATM) 3 a mitokondriális Iron-Sulfur Cluster (ISC) összeszerelési útvonal tagja, amely a Cytosolic Iron-Sulfur (CIA) összeszerelési útvonal működéséhez szolgáltat Fe-S prekurzorokat. A mitokondriális ISC útvonal működése nem csak a légzési elektrontranszport lánc Fe-S centrum igényeit szolgálja ki, hanem a citoplazmatikus Fe-S fehérje bioszintézis

megfelelő működéséhez is elengedhetetlen (Schaedler és mtsai., 2014). Megtalálható mind mitokondriumokban, mind plasztiszokban a külső (burkoló)membránhoz horgonyzott NEET motívum fehérje, melynek a citoplazmatikus fehérjék felé történő Fe-S centrum átadásban van szerepe (Zandalinas és mtsai., 2020; Nechushtai és mtsai., 2020). Bár e fehérjének kitüntetett szerepe van az eukarióta sejtek vasháztartásában, nem ismert azonban, hogy a működése miként kapcsolódik az organelláris vasháztartáshoz.

A vakuólumok jelentős szerepet játszanak a sejt-szintű vasháztartásban. A vakuólumokban tárolt Fe könnyen remobilizálható, és a vakuoláris Fe transzporterek közvetlenül befolyásolhatják a citoplazma és a vakuoláris vas-pool arányát (Gayomba és mtsai., 2015), ezért a magvak vas-raktározásának sok esetben a vakuólumok a színterei (Roschztardtz és mtsai., 2009). A vakuólumokból történő vas-mobilizációért alapvetően a Fe(II) transzporterként ismert NRAMP 3/4 fehérjék felelősek (Bastow és mtsai., 2018), míg a vakuólumokba irányuló vas-transzport a VTL fehérjék feladata (Gollhofer és mtsai., 2014). Az NRAMP3/4 Fe exporterek expressziója vashiány hatására jelentősen megemelkedik, ezzel növelve a citoplazma vastartalmát (Lanquar és mtsai., 2005; Mary és mtsai., 2015). Fe többlet hatására az NRAMP3/4 expressziója csökken, míg egyes szövetekben a VTL transzporterek expressziója és a Fe vakuólumba töltése növekszik (Bashir és mtsai., 2021). A vakuólumokban raktározott Fe mobilizációjához elengedhetetlen a TDX25 aszkorbát-transzporter megjelenése a tonoplasztban (Hoang és mtsai., 2021), így a vakuólumba kerülő aszkorbinsav végzi el a Fe redukcióját, mely lehetővé teszi transzportját az NRAMP 3/4 fehérjéken keresztül. Az aszkorbinsav szerepet játszik a tonoplasztban lokalizált Citokróm b₅₆₁ (CYBASC1) elektron-donoraként, melynek közvetlen szerepe lehet a vakuoláris Fe redukciójában (Grisen és mtsai., 2004). Rizs (*Oryza sativa*) tonoplasztból azonban kimutatták a FRO1 vas-kelát-reduktáz jelenlétét (Li és mtsai., 2019), mely arra utal, hogy a vakuólumból történő vas-felszabadulás is a redukción alapuló stratégiát követi. A vakuoláris Fe szerepe így többek között a citoplazmában elérhető Fe mennyiségének szabályozásában tűnik fontosnak.

A szövet- és sejt-szintű vasháztartás szabályozásában sejt-szintű vas-szenzor(ok)nak kell közre játszania, melyek a sejtek és kompartmentjeik vas-homeosztázisát monitorozzák. A Brutus (BTS) haemeritrin-doménnal rendelkező E3-ubikvitin-ligáz, a sejt kritikus érzékelője és egyben negatív regulátor is. A BTS akkor stabil, ha vasat köt és ez a stabilitás szűnik meg vashiánykor. Stabil állapotban basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transzkripciós faktorok degradációt erősíti a proteoszóma-komplexumban (Rodríguez-Celma és mtsai., 2019), melyek a gyökér vasszorbálási rendszerének szabályozásában vesznek részt (Gao és Dubos, 2021). A levelekben

a *BTS*, a *Vascular Plant One-Zinc Finger (VOZ)* 1 és 2 transzkripciós faktorok, a *POPEYE (PYE)*, illetve a *bLHL* IVc családjának homo- és heterodimerképző tagjai: *IAA-Leucine Resistant (ILR)* 3, az *Iron Deficiency Tolerant (IDT)* 1, a *bHLH104* és a *bHLH115* expresszálnak. Fe jelenlétében az ILR3 heterodimert képez a PYE negatív regulátorral. A BTS vas hiányában ubikvitinálja a VOZ1/2-t az ILR3-at és más IVc-bHLH transzkripciós faktorokat, és iniciálja a 26S proteószómán történő degradációjukat (Gao és Dubos, 2021; Rodríguez-Celma és mtsai., 2019). Gyökerekben a rendszer az Upstream Regulator of IRT1 (URI) upstream szabályozóval, Ib családba tartozó bHLH (bHLH 38/39/100/101), valamint a Fer-Like Iron Deficiency Induced Transcription Factor (FIT) transzkripciós faktorokkal interakcióba kerülve szabályozza a gyökerek vashé felvételét (Kobayashi, 2019; Schwarz és Bauer, 2020), azonban a levelek sejtjeiben végbemenő szignalizációs folyamatok és effektor-funkciók sokkal kevésbé feltártak. Szintén hiányoznak az ismeretek arról, hogy e szignalizációs folyamatok miként befolyásolják az organelláris vasház tartásban ismert effektor elemek működését. Fe hiánya esetén azonban a kloroplasztiszok vashé felvétele gátlás alá kerül, melyben a redukción alapuló felvételi rendszer gátlása fontos (Solti és mtsai., 2012; Pham és mtsai., 2020; Sági-Kazár és mtsai., 2021). A levelek sejtjei között, továbbá a levelekből az erek felé irányuló szabályozó rendszer, melyben többek között a YSL1/3 és OPT3 transzporterek is részt vesznek (Grillet és mtsai., 2018; Gao és mtsai., 2021), szintén fontos, a Fe eloszlását szabályozó funkcióval bír.

Bár a levelekben, így a mezofillum-sejtben a Fe mennyisége és lokalizációja nagyon fontos szereppel bír, mégis kevésbé ismert, hogy levél-szinten nem-vashiányos körülmények között milyen vas-eloszlási mintázatok alakulnak ki szöveti, és sejt-szinten, illetve ezeket a mintázatot milyen vas-homeosztázis szereplők alakítják ki.

Célkitűzés

Munkánkban célul tűztük ki a sejt szintű vasház tartás összefüggéseinek megértését a fotoszintetikusán aktív, kloroplasztiszokkal és mitokondriumokkal rendelkező növényi sejteken belül. Vizsgálataink során arra is keressük a választ, hogy milyen szövet szintű kapcsolat van a levelek vashé eloszlásának szabályozásában.

Anyagok és módszerek

Növénynevelés

Vizsgálataink során *Arabidopsis thaliana* L. (Col-0) növényeket használtam fel. Hidropóniás nevelést alkalmaztam $\frac{1}{4}$ töménységű Hoagland tápoldatban (1,25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,75 mM KNO_3 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM KH_2PO_4 , 0,08 μM CuSO_4 , 4,6 μM MnCl_2 , 0,19 μM ZnSO_4 , 0,12 μM Na_2MoO_4 , 11,56 μM H_3BO_3 , és Fe(III)-citrát vasforrás, változó koncentrációkban). A kísérleti csoportoknak megfelelően optimális vasellátású (oFe, 20 μM Fe(III)-citrát a tápoldatban), supraoptimális (sFe, 100 μM Fe(III)-citrát a tápoldatban), és vashiányos (dFe, 1 hét előnevelés 5 μM Fe(III)-EDTA tartalmú tápoldatban, majd vasmentes tápoldat) növényeket neveltem. 5 hetes nevelést követően történt a mintavételezés izolálásainkhoz és az analitikai méréseinkhez. Az izolálásokhoz a kísérleti növények teljes rozettáját felhasználtam, a levélgyekek és a legfiatalabb levelek kivételével.

Protoplaszt- és vakuólum-izolálás

A protoplasztok és vakuólumok izolálásához Robert és mtsai (2007) protokollját követtük kisebb módosításokkal. Kezelésként 1-1 g tömegű levelet 2 mm szélességű csíkokra vágunk és 10-10 ml izoláló oldatban: 1% (w/V) celluláz (Onozuka R-10, Serva), 1% (w/V) macerozyme (R-10, Serva), 0,4% (w/V) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 M mannitol, mM dithiotreitol (DTT), 10 mM MES, pH 5,6 vákuum alá helyeztük őket 15 percig. Ezt követően 4 órán keresztül inkubálttuk őket folyamatos rázatás mellett (72 rpm) sötétben. A feltárt levéltörmelékéből a protoplasztokat egy mosó pufferrel (0,4 M mannitol, 10 mM MES, pH 5,6) átnedvesített szűrőn (150 mesh) keresztül kigyűjtöttük, majd kiülepítettük centrifugálással (80 $\times g$, 2x10 perc, 25 $^{\circ}\text{C}$).

A vakuólum izolálást protoplasztokból végeztük. A kiülepített protoplasztok egy részét lízis pufferben : 0,2 M mannitol, 10% (w/V) Ficoll, 10 mM EDTA, 5 mM NaPO_4 , pH 8, 0,0005% (w/V) Neutral Red (Sigma) felvettük, és rárétegeztünk 4% (m/V) Ficollt tartalmazó gradiens oldatot: 0,3 M mannitol, 4% (w/V) Ficoll, 6,8 mM EDTA, 5 mM NaPO_4 pH 7,8, 0,0003% (w/V) Neutral Red, és végül Ficoll-mentes vakuólum puffert (0,45 M mannitol, 5 mM NaPO_4 , pH 7,5, 2 mM EDTA). A gradienseket egy Beckman L7-65 ultracentrifugában, Sw40-

Ti rotorban centrifugáltuk ($71\,000 \times g$, 5 perc, $10\,^{\circ}\text{C}$). A vakuólumok a 0 és 4% (m/V) Ficoll-réteg határán rózsaszín sávként jelentek meg.

Kloroplasztisz- és mitokondrium-izolálás

Kloroplasztisz izoláláshoz jégen, előre behűtött eszközökkel dolgoztunk. Az Arabidopsis leveleket izoláló pufferben: 50 mM Hepes-KOH pH 7, 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 0,1% (w/V) szarvasmarha szérum albumin (BSA), 0,1% (w/V) Na-askorbát, 1% (w/V) PVP homogenizáltuk (Waring blender homogenizátor). A homogenátumot két réteg gézen és egy réteg MoraclothTM-on keresztül átszűrtük és centrifugáltuk ($1000 \times g$, 5 perc, $4\,^{\circ}\text{C}$). A csapadékot felvettük mosópufferben: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , míg a felülúszót mitokondrium izoláláshoz használtuk tovább.

A felülúszóból kiülepítettük a további sejttörmelékét ($5000 \times g$, 10 perc, $4\,^{\circ}\text{C}$) majd kiülepítettük a mitokondriumokat ($17\,000 \times g$, 15 perc, $4\,^{\circ}\text{C}$). A csapadékot mosópufferben vettük fel, majd 28% Percoll-gradiensre rétegeztük és centrifugáltuk ($40\,000 \times g$, 45 perc, $4\,^{\circ}\text{C}$). A mitokondriumok egy sárgás-fehér sávot formáltak a gradiens tetején. A mitokondrium-frakciót ezt követően BSA-mentes mosópufferrel tízszeresére hígítottuk és kiülepítettük ($23\,000 \times g$, 15 perc, $4\,^{\circ}\text{C}$). A csapadékot BSA-mentes mosópufferben vettük fel.

Vastartalom-meghatározás

Az izolátumok protoplaszt- és organellum-tartalmát Bürker-kamra, és fénymikroszkóp (Nikon Optiphot-2) segítségével határoztuk meg, majd szolubizáló oldatban: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 330 mM szorbitol, 2 mM MgCl_2 , 1% (w/V) nátrium-dodeciul-szulfát (SDS) és 1% (w/V) DTT szobahőmérsékleten szolubilizáltuk 30 percen keresztül. A protoplaszt és kloroplasztisz mintákból centrifugálással ($10\,000 \times g$, 5 perc) eltávolítottuk a keményítőt. Ezt követően a mintákhoz $100\,\mu\text{M}$ askorbinsavat és $300\,\mu\text{M}$ batofenantrolin-diszulfonátot (BPDS) adtunk, majd egy 1 órás sötét inkubációt követően UV-VIS spektrofotométerrel (UV-2600, Shimadzu) 535 nm hullámhosszon mértük az abszorbanciát. A protoplasztok és organellumok vastartalmát Smith és mtsai (1952) által meghatározott extinkciós koefficiens segítségével határoztuk meg ($22,14\,\text{mM}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$).

Induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS)

A levélminták feltárását Soós és mtsai. (2019) módszere alapján végeztük. A begyűjtött levélmintákat 48 órán keresztül 60 °C inkubáltuk, majd salétromsavval emésztettük. Az feltárt levelek elemanalitikai meghatározását May Zoltán (MTA-TTK) végezte el ICP-MS módszerrel.

Kvantitatív Real-Time PCR (qRT-PCR)

A begyűjtött levélmintákon RNS kinyerést TRI Reagenssel (Sigma) és DirectZol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, USA) RNS kinyerő kittel végeztünk a gyártó utasításai szerint. Reverz transzkripció RevertAid reverz transzkriptáz enzimmel (Thermo Fisher Scientific) és random hexamer oligonucleotidok használatával történt 42°C-on. Az átírt cDNS mintákat -80°C-on tároltuk felhasználásig.

A cDNS mintákon 0,5-0,5 µM génspecifikus primerpárral és 2× hígított SYBR Green reagenssel (Luminaris Color HiGreen High ROX, Thermo-Fisher Scientific), 15 µl végtérfogaton végeztünk Real-Time PCR reakciókat. Minden biológiai minta mindegyikét 3 technikai párhuzamos mérésben mértük. A qRT-PCR mérést StepOnePlus Real-Time PCR géppel végeztük a következő beállítások alapján: előemésztés 50 °C 2 percig, amit 10 percen keresztül 95 °C-on denaturáció/enzimaktiváció követ, és végül 40 cikluson keresztül 95 °C-on denaturáció (15 másodperc), 30 másodpercig kapcsolási hőmérséklet ($T_m = 58\text{ °C}$) és újabb 30 másodpercig 72 °C-on lévő lánchosszabbítás követ. A relatív génexpressziót *actin*, *β-tubulin*, és *EF1a* kontroll génre normálva a Pfaffl (2001) módszer segítségével számoltuk.

Röntgenfluoreszcencia (XRF) térképezés

Szárítószekrényben (60 °C, overnight), jelentős nyomás nélkül, de a levélminta kilapultságát biztosító körülmények között légszáraz állapotra szárított levélmintákon végeztünk elem térképezést Horiba XGT7200 (Horiba, Japán) Röntgen-fluoreszcencia leképező-rendszer segítségével. A gerjesztési Röntgensugár egy keskeny polimer ablakon keresztül jutott a minta felületére, majd a mintából kibocsátott $K\alpha$ fotonokat detektálva kaptuk meg a felületi elem eloszlást. Az elem térképezést minden esetén a levelek közepén végeztük, hogy a főér is jól kivehető legyen. A mérés során a gyorsító feszültség 50 kV, az áramerősség

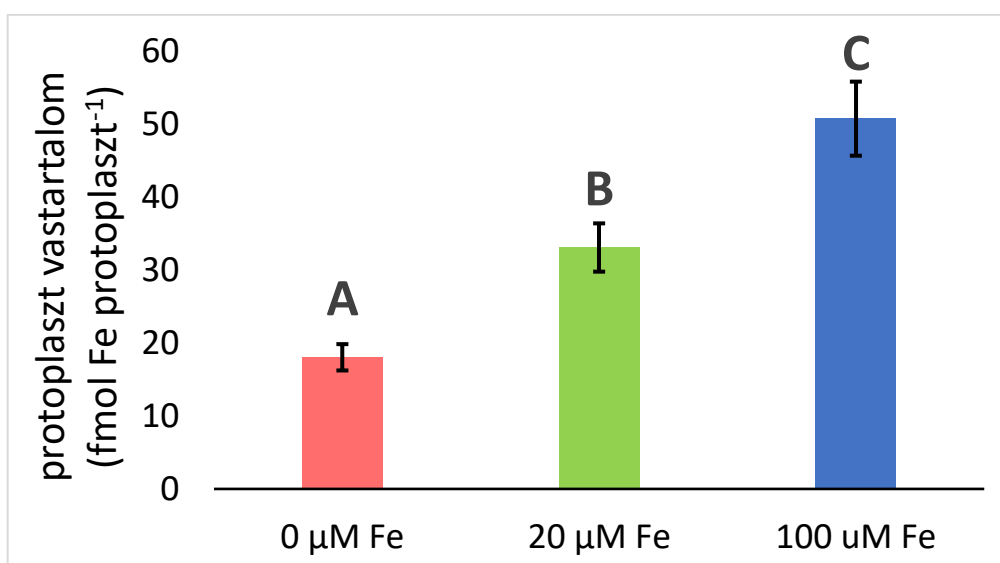
1 mA volt. A mérésekhez 100 μm átmérőjű nyalábot használtunk, 1000 s áréánkenti leképezési idő beállítással, és pixelenkénti $3\times$ ismétléssel. A nyers adatok elemzésére és reprezentációjára Hyperspy v1.7.1 Python csomagot használtunk. A Fe K α (6.4 KeV) intenzitás térképeken intenziás profilokat készítettünk, mellyel a vaseloszlás változását modelleztük. A profilok zajsűrését az intenzitás profilok tendenciájának megállapításához Savitzky–Golay filter segítségével végeztük.

Statisztikai analízis

A vastartalom mérések statisztikai analízise Prism szoftver (v. 9.2; GraphPad Software, Inc., USA) segítségével történt. A változások összehasonlítására egy-utas ANOVA-t használtunk, Tukey *post hoc* teszttel [$P < 0,05$, $n = 3 \times 3$ (biológiai*technikai)]. RStudio-ban (RStudio Inc.) az XRF térképek intenzitás profiljaira lineáris regresszióval egyenest illesztettünk, hogy megkapjuk az R^2 értéket és a meredekséget.

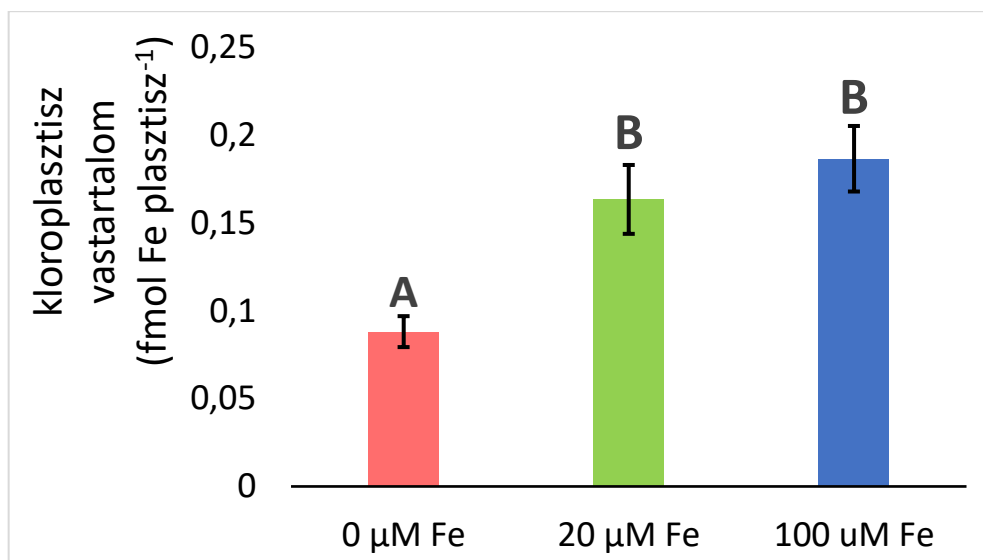
Eredmények

A szimplasztikusan raktározott és felhasznált Fe változásait protoplasztok vastartalom meghatározásával vizsgáltuk (1. ábra). Az optimális kezeléshez képest a vashiányos növényekben jelentős csökkenést tapasztaltunk, míg a supraoptimális kezelésnél szignifikáns növekedést.



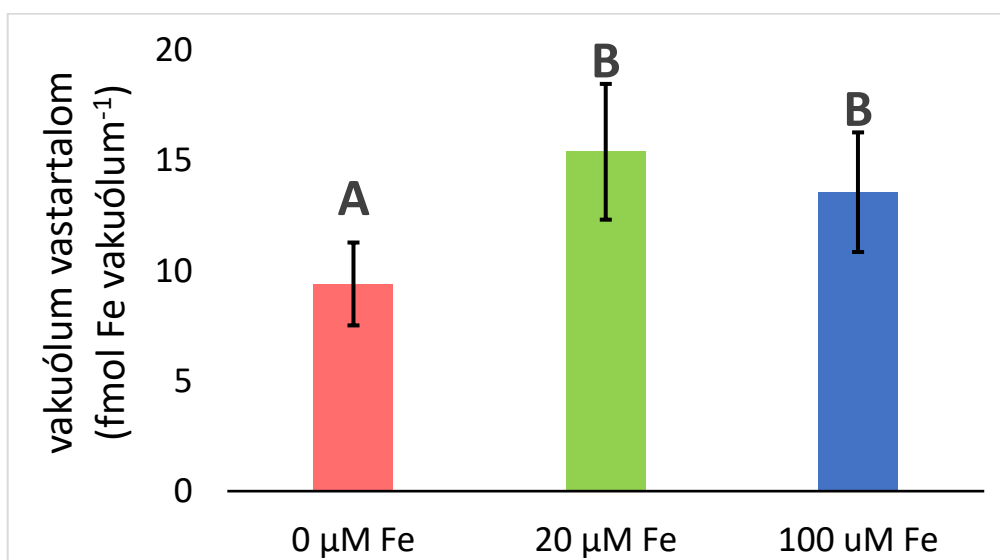
1. ábra: Arabidopsis protoplasztok vastartalma különböző Fe ellátások hatására.

Mivel a mezofillum-sejtekben a Fe elsősorban a kloroplasztiszokban található, valószínűnek tűnhet, hogy a vastöbblet részben ezekben a kompartmentekben raktározódik, ugyanakkor nem tapasztalunk szignifikáns változást a kloroplasztiszok vastartalmában a vasellátás emelésével (2. ábra).



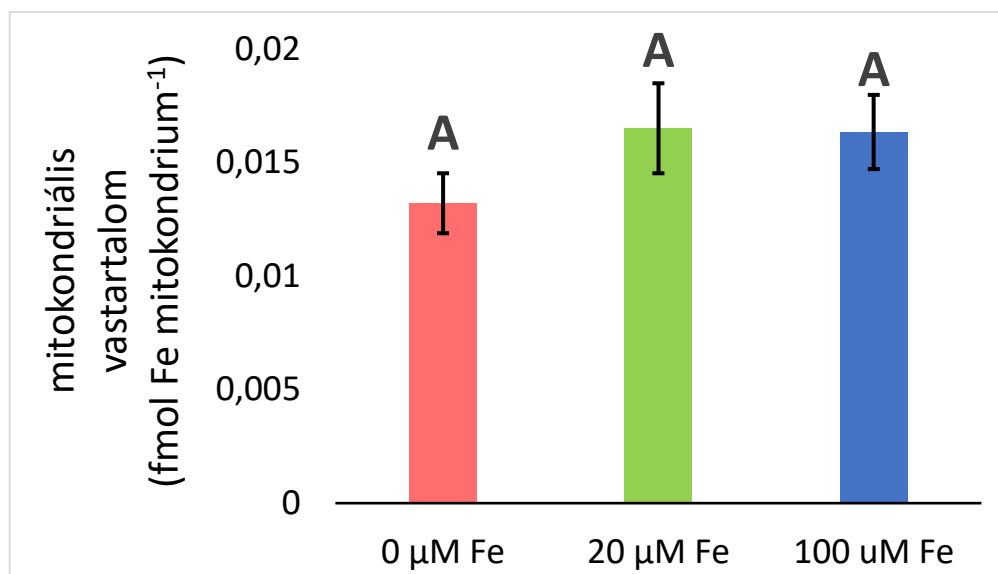
2. ábra: Arabidopsis mezofillum kloroplasztjainak vastartalma különböző vasellátások hatására.

A másik legvalószínűbb vasraktározó kompartment a növényi sejtek vakuóluma (3. ábra), bár itt sem tapasztalunk szignifikáns különbséget a vakuoláris vastartalomban a vasellátás növelésével.



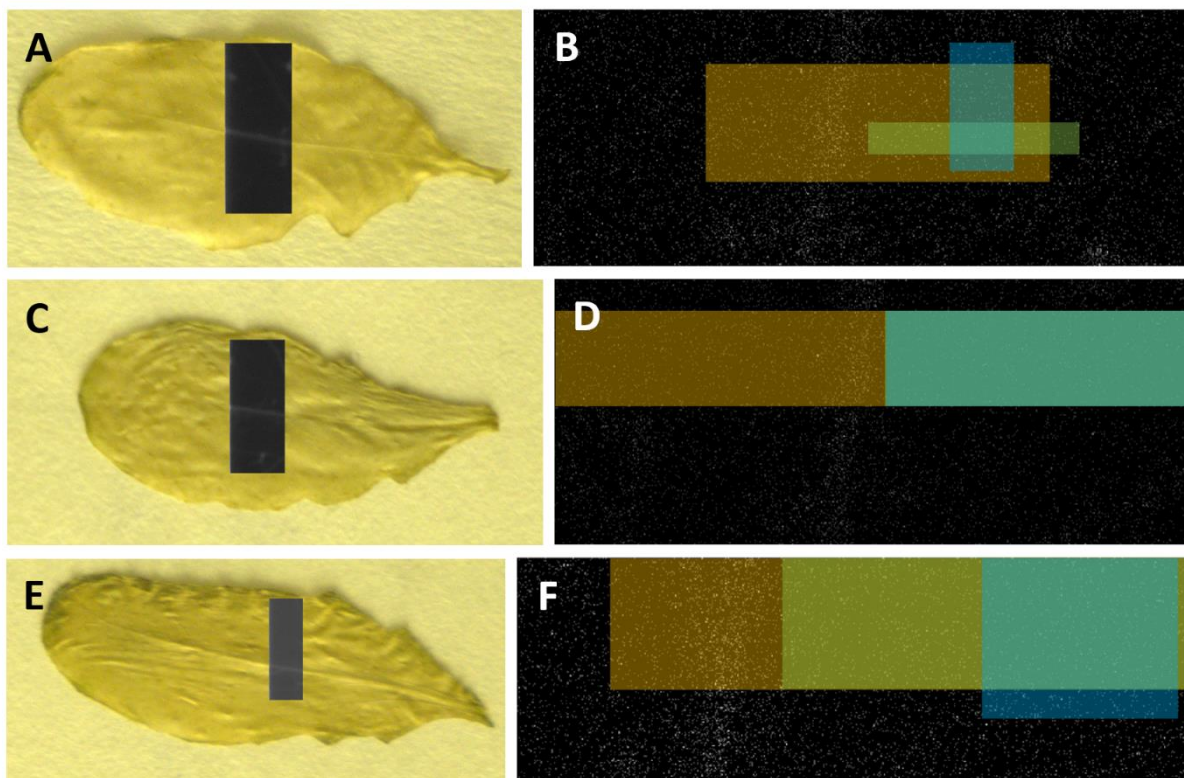
3. ábra: Arabidopsis levél sejtek vakuólumainak vastartalma különböző vasellátások hatására.

Nem tapasztaltunk különbséget a mitokondriumok vastartalmában egyik kezelés esetében sem (4. ábra). Itt azonban kiemelendő, hogy a mitokondriumok vasigénye a kloroplasztiszokhoz képest eltörpül, és az alkalmazott vashiányos kezelésünk hatására sem mutatkozik jelentős változás.

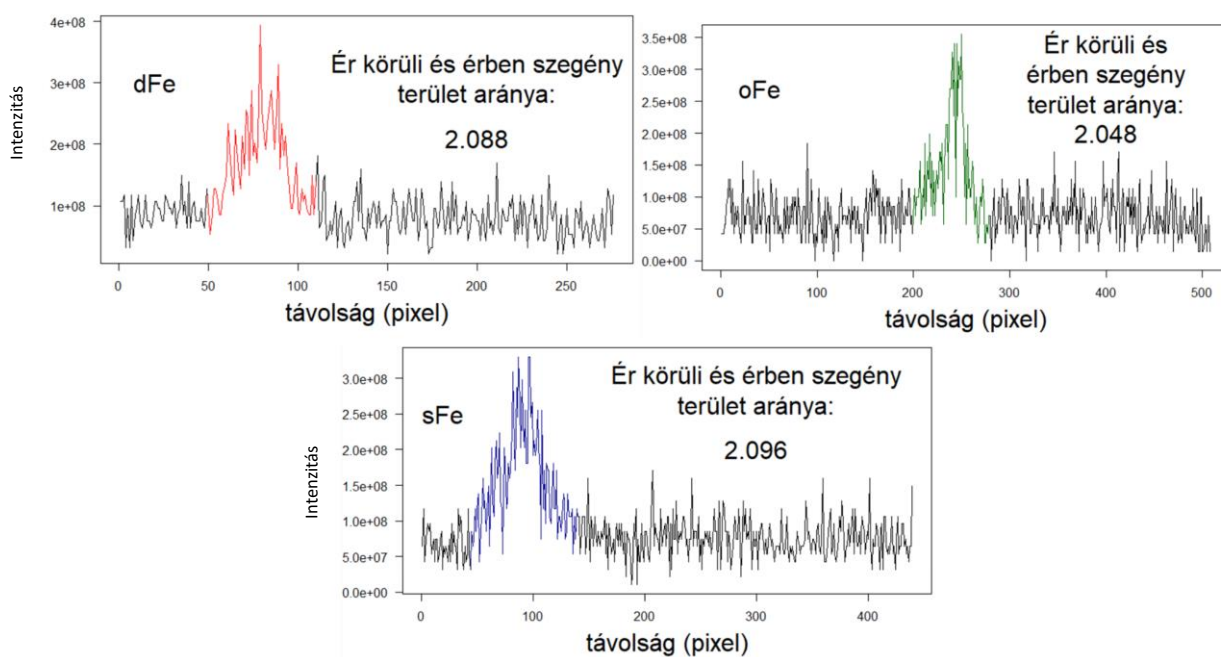


4. ábra: Arabidopsis levél sejtek mitokondriumok vastartalma különböző vasellátások hatására.

Az izolált proplasztok és organellumai vas-megoszlásának vizsgálata mellett elemeztük a Fe eloszlásának két-dimenziós mikromintázatát a levelekben XRF térképezéssel (5. ábra). Elemzésünkben elsődlegesen összevetettük a főér és a kvázi nagyobb levélerektől mentes lamina területein mérhető Fe $K\alpha_1$ (~6,4 keV) emisszió relatív intenzitásának arányait, melyből kiderült, hogy a vasellátás változtatásának hatására nem alakult ki jelentős változás a Fe levéllemezen belüli eloszlásában (6. ábra).

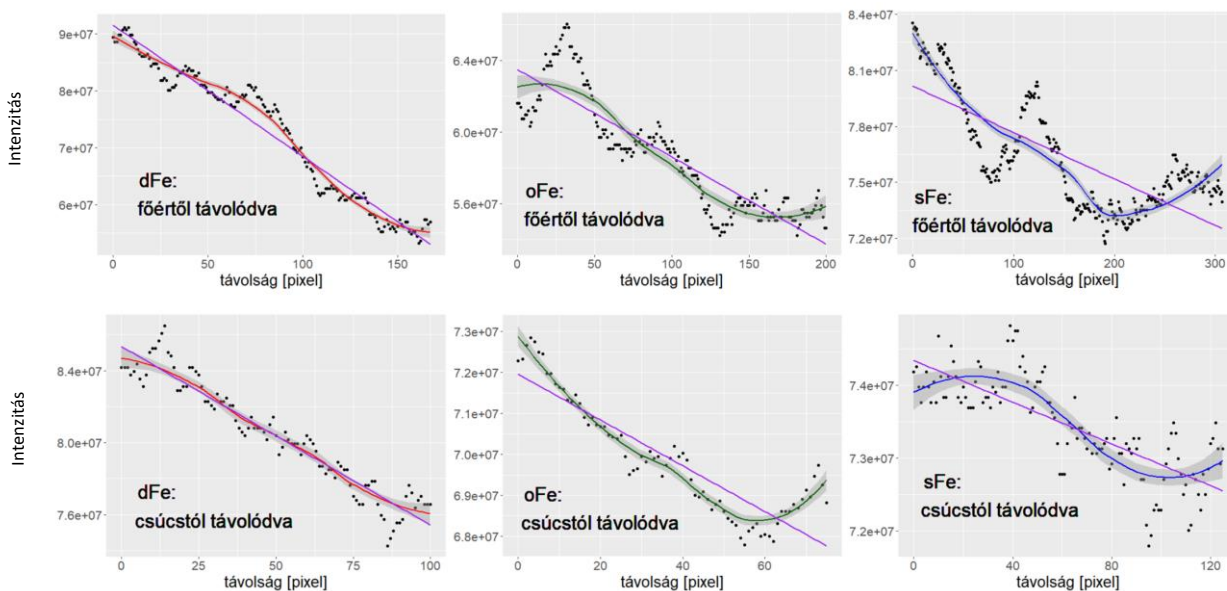


5. ábra: Levél területén lévő mintavételezés helye (A, C, E) és $\text{Fe}(\text{K}\alpha_1)$ térképek (B, D, F) különböző kezelésekkel (dFe: A, B; oFe: C, D; sFe: E, F). Elemzés során 3 típusú mintát vettünk: A levélérből és laminából vett közös horizontális terület (barna laminából vett horizontális középvonalú terület (zöld), laminából vett vertikális középvonalú terület (kék; D képnél az utóbbi kettő teljesen átfed).



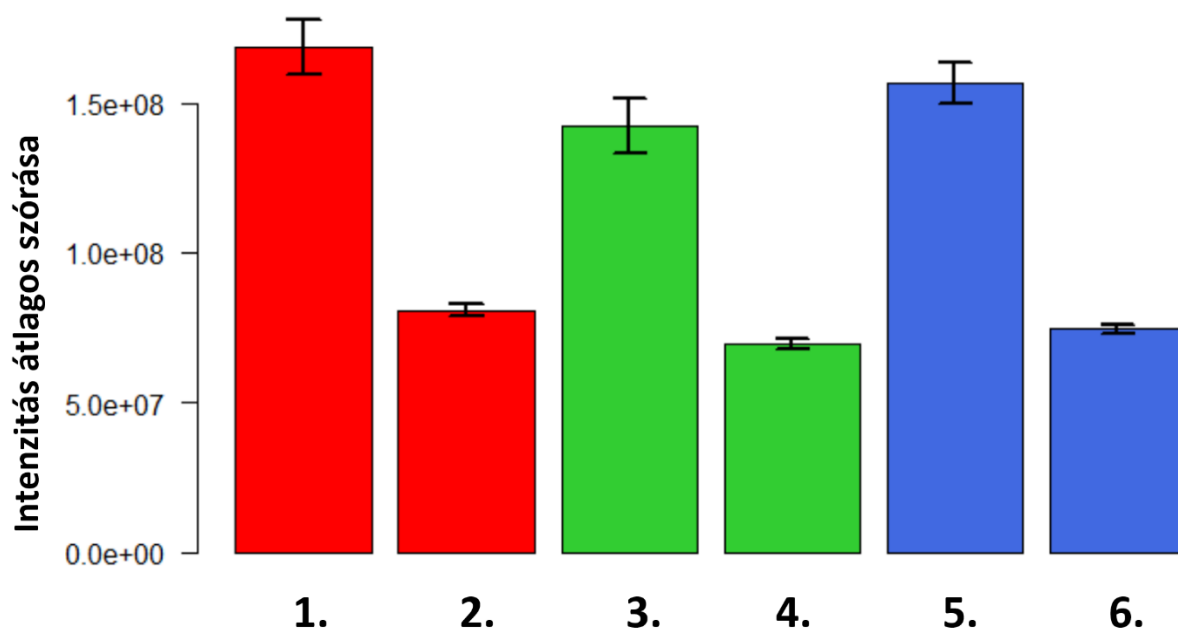
6. ábra: Az ér és a lamina vas-intenzitásának aránya. A grafikonon az érnek vett területeket jelölik a feketétől eltérő színek. A: vashiányos-, B: optimális vasellátottságú-, C: szupraoptimális vasellátottságú kezelés. Ez a $\text{Fe}(\text{K}\alpha_1)$ térképek barna része alapján készült.

A kvázi érmentes lamina horizontális vizsgálatánál (6. ábra A, B, C) azonban azt tapasztaltuk, hogy az levél főerétől távolodva csökkent a Fe $K\alpha_1$ jel intenzitása, mely eloszlásra hatást gyakorolt a növények vasellátása. A legmeredekebb csökkenést a $K\alpha_1$ emisszió értékében vashiányos (dFe) növényeknél mértünk (7. ábra A), míg vastöbblet (sFe) hatására volt legenyhébb a csökkenés (7. ábra C). A kvázi érmentes lamina vertikális vizsgálatánál a levélalap felé csökkent az intenzitás (7. ábra DEF), a szupraoptimális vasellátásnál (sFe) ez a hossz tengelyével párhuzamos intenzitásváltozás már csak minimális mértékűnek adódott (7. ábra F).



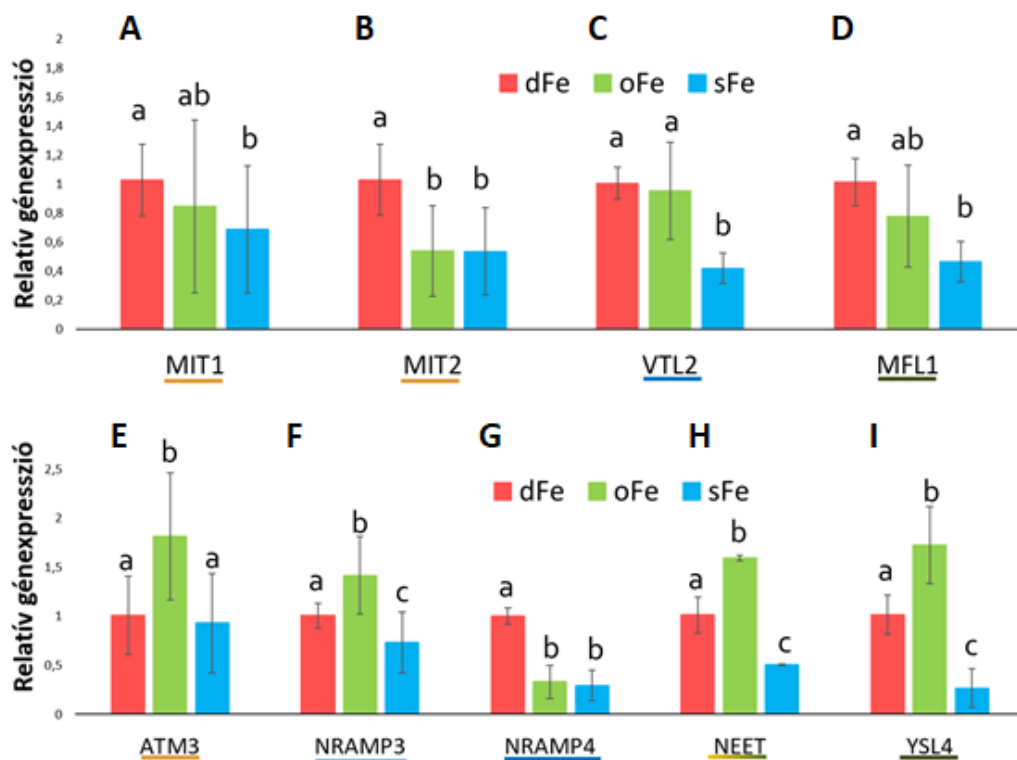
7. ábra: A lamina horizontális és vertikális középsíkú vas-intenzitások grafikonjai (dFe: A, D; oFe: B; E; sFe: C, F; horizontális: A, B, C; vertikális: D, E, F.). A görbék körüli szürke sáv a görbe 95%-os konfidencia-intervallumát jelenti. A lila egyenes, a regressziószámítással megkapott lineáris egyenes. A vashiányos növény levelében (dFe) regressziószámításnál kapott meredeksége -231000 horizontális irányban (A), illetve -99300 vertikálisan (D). Optimális vasellátású növény levelében (oFe) a paraméter -48700 (B) és -56000 (E) értékekre változott és a szupraoptimális vasellátású növény levelében (sFe) a paraméter a legalacsonyabb, -24900 (C) és -14300 (F) értékeket mutatta. Az illesztés megbízhatósága korrigált R^2 értékekben a következők voltak A-F-ig: 0.951, 0.783, 0.573, 0.915, 0.792, 0.602. A szignifikancia-fok mindegyiknél kellő mértékben volt alacsony volt (szintén A-F-ig): $1.03e^{-110}$, $3.51e^{-68}$, $1.12e^{-58}$, $5.59e^{-55}$, $3.8e^{-27}$, $8.18e^{-27}$.

Önmagukban a kvázi érben szegényebb területek homogéneknek tekinthetők, ugyanis a szórások mértéke jelentősen alacsonyabb az intenzitások mértéke mellett (8. ábra). Önmagukban az intenzitás-mértékek nem hasonlíthatóak össze, mivel a mérés technika nem kvantitatív, de az ábra szemlélteti, hogy mekkora szórások voltak az adatokban. A hibahatárok értékei: dFe mezofillum: 5.06%, oFe mezofillum: 4.47%, sFe: 3.79%.



8. ábra: A különböző kezelések mérésének átlagos szórásai vashiányos (dFe: 1 és 2.), optimális vasellátású (oFe; 3. és 4.) és supraoptimális vasellátású (sFe; 5. és 6.) növények leveleiben a főér-közeli területeken (1., 3., 5.) és a kvázi érmentes lamina területén (2., 4., 6.).

A levelekben, illetve a mezofillum sejtjeiben tapasztalható vas-eloszlás mintázatának értelmezéséhez a levelek sejtjeinek vas-homeosztázisának egyes kitüntetett szereppel bíró elemeinek expresszióját vizsgáltuk. A relatív génexpressziós mintázatok (9. ábra) azt mutatják, hogy a hasonló funkcióban szerepet játszó transzportfehérjék génjei hasonló kifejeződési mintázattal is rendelkeznek. Az organelláris vas-importtal kapcsolatos gének: a mitokondriális *MIT1* és *MIT2*, a vakuólumokhoz köthető *VTL2* és a kloroplasztisz *MFL1* génje melyek mindegyike az organelláris/kompartmentális vasszabályozásban játszik szerepet, vashiány hatására magasabb, míg többlet hatására alacsonyabb expressziót mutatnak az optimálishoz képest (9. ábra A,B,C,D). Szemben az organellumokba/kompartmentekbe irányuló transzportrendszer elemeivel, a Fe feltételezett sejten belüli remobilizációjával kapcsolatos elemek génjei: a mitokondrium-citoplazma vas-kén-centrum bioszintézis összekapcsoló *ATM3*, a Fe exporttal összefüggésbe hozott *YSL4*, a a mitokondriumhoz és a kloroplasztiszokhoz is köthető *NEET* fehérje, illetve a vakuólum vas-exporter a *NRAMP3/4* esetében mind vashiány, mind vastöbblet hatására csökkent a relatív transzkript-abundancia, míg az expresszió maximuma optimális vasellátás során volt megfigyelhető (9. ábra E, F, G, H, I). A *MIT1/2* illetve az *NRAMP3/4* redundáns funkciójú fehérjék, így a mintázatuk nem feltétlen egyezik meg a hasonló funkció ellenére sem.



9. ábra: Organelláris vas transzporttal (fent), illetve vas remobilizációval kapcsolatos fehérjék (lent). Az aláhúzás színei az organelumokat jelzik. Narancssárga: mitokondrium; sötétzöld: vakuólum; sötétzöld: kloroplasztisz. A hisztogramok színei a kezeléseket jelölik a jelmagyarázat alapján. A statisztikához egy-utas ANOVA próba volt használva, Tukey-féle post hoc teszttel ($p < 0,05$; $n = 3 \times 3$ (biológiai*technikai))

Diszkusszió

A szervek, szövetek, sejtek vasháztartása erősen szabályozott rendszer, kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy a levelek vasháztartása, valamint a levelekben kialakuló vas-eloszlások milyen módon szabályozottak. Vizsgálataink során *Arabidopsis thaliana* növények leveleinek vaseloszlás változását, Fe felhalmozódását, illetve levélsejtek vasháztartását vizsgáltuk. Az ICP-MS eredmények arra mutatnak rá, hogy a levelekben nem történt vasfelhalmozódás még supraoptimális vasellátás hatására sem. Fontos megjegyezni azonban, hogy bár a többlet vasellátás összességében nem, XRF térképek alapján eloszlásában azonban változtatta a levelekben a Fe mennyiségét. Mindemellert az optimális kezeléshez képest nem tapasztaltunk akkora különbséget a vashiány esetén, mint amekkora különbség volt a kezelések között. A dFe növény levelének vastartalma részben az előkezelésből, részben anyai hatásként a magban raktározott Fe remobilizációjából származhat. Az XRF térképek eredményei alapján valószínűsítjük, hogy az *Arabidopsis* rendelkezik egy olyan finoman szabályozott rendszerrel, mely vashiánykor mind az elérhető Fe felvételét, mind annak a célba juttatását segíti. A levelek

sejtjeinek, illetve az egyes kompartmentek vas-igénye azonban telítődni látszik. Bár expresszió-analízisünkben a mintavétel részletessége nem tette lehetővé, hogy a levéllemezen belüli eloszlás-változások háttérében álló génexpresszó-szintű különbségeket vizsgáljuk, feltételezhető, hogy sejten belüli vas-igény telítési folyamatok (Solti és mtsai., 2012) is hozzájárultak a laminán belüli eloszlások kialakulásához. Bár nem vizsgáltuk a ferritin formájában történő vas-felhalmozódást, *Brassica napus* növényeken kapott eredmények alapján (Pham és mtsai., 2020) kevésbé tartjuk valószínűnek, hogy a 100 μM vasellátás nagy mennyiségű ferritin megjelenését indukálta volna. A kloroplasztisz ferritin megjelenésének indukciójához extrém körülmények, így vashiányt követően alkalmazott $>100 \mu\text{M}$ vas-sók alkalmazása lett volna szükséges (Lobréaux és mtsai., 1995; Ravet és mtsai., 2009). A ferritin gének expressziója továbbá szenescencia-függő jelenség a levelekben (Cseh és mtsai., 2022).

A lamina területe vas-eloszlás szempontjából összességében homogénnek tekinthető, mely a levelek hossz tengelyükkel párhuzamos irányban jobban megmutatkozik vizsgálataink alapján. A főleg vashiányos kezelés alatt jelentkező, a levélalap irányába mutató csökkenés a vas-jel intenzitásában összhangban lehet azzal, hogy a levélcsúcs területén nagyobb a kloroplasztiszok denzitása. Tekintettel arra, hogy a levelek vastartalmának túlnyomó része a kloroplasztiszokban található (Terry és Abadía., 1987), a kloroplasztiszok denzitása döntően befolyásolhatja a levelekben a Fe eloszlását. Horizontális irányú csökkenés, mely a főértől távolodó intenzitás csökkenés egyezést mutat azzal a feltételezéssel, miszerint a szállítószövetek, így a floém vasleadása meghatározó szabályozó eleme a levelek vaselosztásának. Vashiány hatására a szállítószövetekből a mezofillum felé transzportált Fe mennyiség csökken, mely szabályozás kapcsolatban lehet az OPT3 funkciójával (Kroh és Pilon, 2019). Vashiány hatására az OPT3 közreműködik a gyökerek vasfelvételi rendszerének serkentéséhez (Jeong és mtsa., 2017). Amennyiben a gyökerek számára nem elérhető felvehető Fe, így a levelekbe irányuló vas-transzport is elmarad vashiányos körülmények között, a reziduális Fe mezofillum felé történő leadásra tartósan gátolt maradhat.

A sejteken belüli vas-eloszlásra mind a Fe hiánya, mind a relatív többlete hatást gyakorolt, mely elsősorban a protoplasztok vastartalmának értékeiben volt szembevetendő. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kloroplasztiszok vastartalmában is hasonló jellegű tendenciákat mutattunk ki. Mindazonáltal a protoplaszt-izolátumainkban a protoplasztonkénti vastartalom az sFe mintákban jelentősebben különbözött az oFe mintáktól, mint a kloroplasztisz-izolátumokban. A mezofillum sejtjeiben a Fe túlnyomó része a kloroplasztiszokban, azokon belül is a tilakoidmembránok fotoszintetikus apparátusában található (Terry és Abadía, 1987; Morissey

és Guerinot, 2009; Castagna és mtsai., 2009; Hantzis és mtsai., 2018), így várható volt, hogy a protoplasztok vastartalmának változása egyezéseket kell mutasson a plasztiszok vastartalmának alakulásával. Az sFe kezelés során tapasztalt különbségek azonban rámutattak, hogy bár szupraoptimális vasellátás esetén a plasztiszokba történő vas-traszport lassul, sőt leáll (Solti és mtsai., 2012; Sági-Kazár és mtsai., 2021), alternatív vas-felhalmozódási helyek megléte feltételezhető a protoplasztokban. Fontos megjegyezni, hogy a Fe felhalmozódása, illetve a felszabaduló/szabad Fe jelenléte a kloroplasztiszokban Fenton-reakcióhoz és oxidatív stresszhez vezethet (Deák és mtsai., 1999; Jeong és Guerinot, 2009). Egyes szövetekben, illetve egyes élettani állapotokban történhet vasfelhalmozódás ferritin formájában (Sági-Kazár és mtsai., 2022), de ebben az esetben is a Fe feltételezhetően a fotoszintetikus struktúrák bontásából származik. A sejtfal emésztésének és így az apoplaszt eltávolításának a mértékét nem ellenőriztük, így elképzelhető, hogy a reziduális apoplaszt rendelkezett vastartalommal is (Nikolić és Römheld, 2002; Nikolić és Römheld, 2007). A reziduális apoplaszt-szennyezésből eredő vastartalom jelenlétét erősíti Pham és mtsai (2020) mérései is, ahol sFe körülmények között nevelt *Brassica napus* növények kloroplasztiszzaiban hasonlóképpen nem növekedett jelentősen a vastartalom, míg a levelek vastartalma szignifikánsan magasabbnak adódott. Fontos megjegyezni, hogy szupraoptimális vasellátás esetében a protoplasztok mellett a kloroplasztiszok vastartalma annak ellenére adódott magasabbnak, hogy a vasszorból és a transzport rendszerek tagjainak expressziója csökkent. Mind a mezofillum-sejtek, mind a mitokondriumok és kloroplasztiszok vasszorból a redukción alapuló úton működnek (Sági-Kazár és mtsai., 2022), azonban fénynek kitett szövetekként a levelekben a Fe (Fe(III)-citrát) fotoredukciója jelentős (Nikolić és Römheld, 2007; Jeong és mtsai., 2008; Gracheva és mtsai., 2022) és hozzájárulni látszik gátolt enzimikus vas-redukció mellett is a további, kismértékű vastartalom-gyapodáshoz. Hasonlóan a Fe többletéhez, a vashiány is – a vakuólumok mellett – elsősorban a kloroplasztiszokat érinti. Mindezek az eredmények rámutatnak, hogy bár a mitokondriumok vasszorból jelentősen alacsonyabb a kloroplasztiszokéhoz képest, a sejtek anyag-és energiaforgalmában betöltött szerepük esszenciális, így vasszorból, és egyben a légzési elektrontranszportlánc működésének a fenntartása szabályozási szinten prioritást élvez a kloroplasztiszokkal szemben (Vigani, 2012, Vigani és Hannikenne, 2018). A mitokondriumok az ATP-szintézisen kívül a legfontosabb vas-ligand a citrát, produkciójáért is felelősek, melynek fontos szerepe van a hosszútávú transzportban és a kloroplasztiszok vasszorból (Nunes-Nesi és mtsai., 2014). A vastartalom normalizálását jelentősen nehezíti, hogy – elsősorban vashiány esetén – mind a levelek felületnövekedése, a mezofillum sejteinek expanziója, de a kloroplasztiszok divíziója is elmarad, illetve lecsökken (Nikolić és Römheld,

2007). Véleményünk szerint a Fe allokációját így nem csak a felvételben fontos elemek expressziója és működése, de a nettó sejtenkénti organellum-szám is döntően alakítja. A vakuólumok vastartalmának meghatározásában vizsgálatainkban zavaró körülmény lehetett a különböző vakuólum-mérettel rendelkező sejtek együttes jelenléte a kiindulási növényi anyagban, hiszen a nagyobb expansziót mutató, így feltehetően magasabb vasellátáshoz jutott sejtek vakuólumai felülreprezentálhatták a mintát. Mint azt az XRF leképezési adataink is mutatták, e különbségek kis léptékű skálán is jelentősek lehetnek.

A sejten belüli vas-transzport folyamatok a folyamatban fontos elemek relatív transzkript-abundanciáján keresztüli megértésére tett lépéseink rámutattak, hogy a kezelések hatására jelentős egyezések alakultak ki a kifejeződési mintázatokban. A mitokondriális és vakuoláris vasfelvételben szerepet játszó elemek relatív génexpressziója csökkenést mutatott a növekvő vasellátásra. Szemben azonban a laborunk által korábban vizsgált, plasztisz-vasfelvételben szerepet játszó elemekkel (Pham és mtsai., 2020; Sági-Kazár és mtsai., 2021), amely elemek expressziója vashiány hatására is csökkent, a mitokondriális vasfelvételben fontos elemek expressziójának az érintetlensége megerősíti a mitokondriális vasellátás szerepét az anyagcsere kiegyensúlyozásában vashiányos körülmények között is. A Fe remobilizációban feltételezetten érintett elemek terén mind a hiány és a többlet hatására is expresszió szintű gátlás lépett fel. Fe hiányára a válasz értelme egyértelműnek tűnik, hiszen az egyébként is kevesebb mennyiségű Fe alapvetően meghatározott beépülési helyeken szükséges, hogy maradjon. A Fe többleténél azonban a szupresszió oka elsősorban a Fe felszabadulásának a gátlásában keresendő. Az expressziós mintázatról, illetve az organellumokban mért vastartalmakról összességében elmondható, hogy vashiány hatására a Fe elsősorban a mitokondriumok felé irányítódik. Optimális vasellátás alatt a kloroplasztiszokba irányuló vas-transzport is működik, mely lehetővé teszi a fotoszintetikus apparátus kifejlődését és működését (Solti és mtsai., 2016). Végül supraoptimális vas-ellátás hatására a sejten belüli vas-transzportért és re-allokációért felelős elemek gátlása figyelhető meg, melynek a vas-felszabadulás kivédésében, így az oxidatív stressz elkerülésében lehet szerepe.

Következtetések

A növények vasháztartása mind szervi, mind sejtes és intracelluláris szinten is erős szabályozás alatt áll. Bár a Fe eloszlása a főér és az érben szegényebb lamina között meglepően állandónak bizonyult, mégis csökkenő vastartalom mérhető a levélszél, illetve a levélalap

irányába, mely különbségek részben ontológiai folyamatok eredményeinek tekinthetők. Magas, de különösen alacsony vasellátás mellett jellegzetesen megváltozik a sejtek vas-háztartása, mely megnyilvánul a Fe sejten belüli lokalizációjának változásaiban is. Szupraoptimális vasellátás esetében az egyes sejt kompartmentek vastartalma jelentős stabilitást mutat, míg vas-többlet csak izolált mezofillum-sejtekben volt kimutatható, mely felveti a lehetőségét, hogy vas-felhalmozódás fiziológiai körülmények között elsősorban az apoplasztban, de legkevésbé a mitokondriumokban alakul ki. A szupraoptimális vasellátás alatt tapasztalt általános szupresszió a sejten belüli vas-transzport folyamatok intenzitásának csökkenését mutatja, melynek szerepe lehet az oxidatív stressz elkerülésében, egyben szintén rámutat, hogy az organelláris szintű vas-felhalmozás fiziológiai körülmények között nem favorizált folyamat.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Sági-Kazár Máténak a témavezetői segítségét, türelmét, kitartását. Köszönöm, hogy lehetőséget biztosított a kutatáshoz való becsatlakozáshoz, hasznos magyarázatait és tanácsait a dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm dr. Solti Ádámnak az ötleteit, szakmai meglátásait, segítőkészségét és türelmét.

Valamint köszönöm az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék valamennyi munkatársának segítségét.

A kutatómunka az Emberi Erőforrások minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Program ÚNKP-21-3-I-680, valamint az NKFIH K-135607, VEKOP-2.3.3-15-2016-00008 és ELTE Témaerületi Kiválósági Program 2020 (TKP2020-IKA-05) projektjei keretében valósult meg.

Irodalomjegyzék

Balk, J., & Pilon, M. (2011). Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. *Trends in plant science*, 16(4), 218-226.

Balk, J., & Schaedler, T. A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 125-153.

- Bashir, K., Ahmad, Z., Kobayashi, T., Seki, M., & Nishizawa, N. K.** (2021). Roles of subcellular metal homeostasis in crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 72(6), 2083-2098.
- Bastow, E. L., Garcia de la Torre, V. S., Maclean, A. E., Green, R. T., Merlot, S., Thomine, S., & Balk, J.** (2018). Vacuolar iron stores gated by NRAMP3 and NRAMP4 are the primary source of iron in germinating seeds. *Plant Physiology*, 177(3), 1267-1276.
- Briat, J. F., Dubos, C., & Gaymard, F.** (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science*, 20(1), 33-40.
- Castagna, A., Donnini, S., & Ranieri, A.** (2009). Adaptation to iron-deficiency requires remodelling of plant metabolism: an insight in chloroplast biochemistry and functionality. In *Salinity and water stress* (pp. 205-212). Springer, Dordrecht.
- Conte, S., Stevenson, D., Furner, I., & Lloyd, A.** (2009). Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant physiology*, 151(2), 559-573.
- Conte, S. S., Chu, H. H., Chan-Rodriguez, D., Punshon, T., Vasques, K. A., Salt, D. E., & Walker, E. L.** (2013). *Arabidopsis thaliana* Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Frontiers in plant science*, 4, 283.
- Cseh B., Koszti Sz., Gracheva M., Farkas S., Sági-Kazár M., Gianoncelli A., Bonanni V., Fodor F., Solymosi K., Kovács K., Rudnóy S., Solti Á.** (2022) Leaf senescence initiation related alterations in the iron homeostasis of the chloroplasts. In: Thomine S. (ed.) *Abstract Book of the 20th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*, p. 83
- Deák, M., Horváth, G. V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z. & Dudits, D.** (1999). Plants ectopically expressing the ironbinding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature biotechnology*, 17(2), 192-196.
- Divol, F., Couch, D., Conéjéro, G., Roschttardt, H., Mari, S., & Curie, C.** (2013). The *Arabidopsis* YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *The Plant Cell*, 25(3), 1040-1055.

- Duy, D., Stübe, R., Wanner, G., & Philippar, K.** (2011). The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. *Plant physiology*, 155(4), 1709-1722
- Duy, D., Wanner, G., Meda, A. R., von Wirén, N., Soll, J., & Philippar, K.** (2007). PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *The Plant Cell*, 19(3), 986-1006.
- Gao, F., & Dubos, C.** (2021). Transcriptional integration of plant responses to iron availability. *Journal of Experimental Botany*, 72(6), 2056-2070.
- García, M. J., Corpas, F. J., Lucena, C., Alcántara, E., Pérez-Vicente, R., Zamarreño, Á. M., ... & Romera, F. J.** (2018). A shoot Fe signaling pathway requiring the OPT3 transporter controls GSNO reductase and ethylene in *Arabidopsis thaliana* roots. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1325.
- Gayomba, S. R., Zhai, Z., Jung, H. I., & Vatamaniuk, O. K.** (2015). Local and systemic signaling of iron status and its interactions with homeostasis of other essential elements. *Frontiers in Plant Science*, 6, 716.
- Gollhofer, J., Timofeev, R., Lan, P., Schmidt, W., & Buckhout, T. J.** (2014). Vacuolar-iron-transporter1-like proteins mediate iron homeostasis in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 9(10), e110468.
- Gracheva, M., Homonnay, Z., Singh, A., Fodor, F., Marosi, V. B., Solti, Á., & Kovács, K.** (2022). New aspects of the photodegradation of iron (III) citrate: spectroscopic studies and plant-related factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1-14.
- Griesen, D., Su, D., Bérczi, A., & Asard, H.** (2004). Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast. *Plant Physiology*, 134(2), 726-734.
- Grillet, L., Lan, P., Li, W., Mokkapati, G., & Schmidt, W.** (2018). IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nature plants*, 4(11), 953-963.
- Hantzis, L. J., Kroh, G. E., Jahn, C. E., Cantrell, M., Peers, G., Pilon, M., & Ravet, K.** (2018). A program for iron economy during deficiency targets specific Fe proteins. *Plant Physiology*, 176(1), 596-610.

- Hanikenne, M., Esteves, S. M., Fanara, S., & Rouached, H.** (2021). Coordinated homeostasis of essential mineral nutrients: a focus on iron. *Journal of experimental botany*, 72(6), 2136-2153.
- Hoang, M. T. T., Almeida, D., Chay, S., Alcon, C., Corratge-Faillie, C., Curie, C., & Mari, S.** (2021). AtDTX25, a member of the multidrug and toxic compound extrusion family, is a vacuolar ascorbate transporter that controls intracellular iron cycling in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 231(5), 1956-1967
- Jain, A., & Connolly, E. L.** (2013). Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 348.
- Jain, A., Dashner, Z. S., & Connolly, E. L.** (2019). Mitochondrial iron transporters (MIT1 and MIT2) are essential for iron homeostasis and embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1449.
- Jean, M. L., Schikora, A., Mari, S., Briat, J. F., & Curie, C.** (2005). A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *The Plant Journal*, 44(5), 769-782.
- Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E. L., & Guerinot, M. L.** (2008). Chloroplast Fe (III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10619-10624.
- Jeong, J., & Guerinot, M. L.** (2009). Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in plant science*, 14(5), 280-285.
- Jeong, J., Merkovich, A., Clyne, M., & Connolly, E. L.** (2017). Directing iron transport in dicots: regulation of iron acquisition and translocation. *Current opinion in plant biology*, 39, 106-113.
- Khan, M. A., Castro-Guerrero, N. A., McInturf, S. A., Nguyen, N. T., Dame, A. N., Wang, J., Bindbeutel, R. K., Joshi, T., Jurisson, S. S., Nusinow, D. A. & Mendoza-Cozatl, D. G.** (2018). Changes in iron availability in *Arabidopsis* are rapidly sensed in the leaf vasculature and impaired sensing leads to opposite transcriptional programs in leaves and roots. *Plant, Cell & Environment*, 41(10), 2263-2276.

- Kim, L. J., Tsuyuki, K. M., Hu, F., Park, E. Y., Zhang, J., Iraheta, J. G., Chia, J. C., Huang, R., Tucker, A. E., Clyne, M., Castellano, C., Kim, A., Chung, D. D., DaVeiga, C. T., Parsons, E. M., Vatamaniuk, O. K. & Jeong, J. (2021).** Ferroportin 3 is a dual-targeted mitochondrial/chloroplast iron exporter necessary for iron homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 107(1), 215-236.
- Kobayashi, T. (2019).** Understanding the complexity of iron sensing and signaling cascades in plants. *Plant and Cell Physiology*, 60(7), 1440-1446.
- Kobayashi, T., & Nishizawa, N. K. (2012).** Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 63(1), 131-152.
- Kroh, G. E., & Pilon, M. (2019).** Connecting the negatives and positives of plant iron homeostasis. *The New Phytologist*, 223(3), 1052-1055.
- Kumar, R. K., Chu, H. H., Abundis, C., Vasques, K., Rodriguez, D. C., Chia, J. C., Huang, R., Vatamaniuk, O. K. & Walker, E. L. (2017).** Iron-nicotianamine transporters are required for proper long distance iron signaling. *Plant Physiology*, 175(3), 1254-1268.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H. & Thomine, S. (2005).** Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO journal*, 24(23), 4041-4051.
- Li, L., Ye, L., Kong, Q., & Shou, H. (2019).** A vacuolar membrane ferric-chelate reductase, OsFRO1, alleviates Fe toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 700.
- Lobréaux, S., Thoirion, S., & Briat, J. F. (1995).** Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *The Plant Journal*, 8(3), 443-449.
- Mary, V., Schnell Ramos, M., Gillet, C., Socha, A. L., Giraudat, J., Agorio, A., Merlot, S., Clairet, C., Kim, S. A., Punshon, T., Guerinot, M. L. & Thomine, S. (2015).** Bypassing iron storage in endodermal vacuoles rescues the iron mobilization defect in the natural resistance associated-macrophage protein3natural resistance associated-macrophage protein4 double mutant. *Plant Physiology*, 169(1), 748-759.
- Mendoza-Cózatl, D. G., Xie, Q., Akmakjian, G. Z., Jobe, T. O., Patel, A., Stacey, M. G., Song, L., Demoin, D. W., Jurisson, S. S., Stacey, G. & Schroeder, J. I. (2014).** OPT3 is

- a component of the iron-signaling network between leaves and roots and misregulation of OPT3 leads to an over-accumulation of cadmium in seeds. *Molecular plant*, 7(9), 1455-1469.
- Migocka, M., Malas, K., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Papierniak, A., Posyniak, E., & Garbiec, A.** (2018). Retracted: Cucumber metal tolerance protein 7 (CsMTP7) is involved in the accumulation of Fe in mitochondria under Fe excess. *The Plant Journal*, 95(6), 988-1003.
- Morrissey, J., & Guerinot, M. L.** (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical reviews*, 109(10), 4553-4567.
- Müller, B., Kovács, K., Pham, H. D., Kavak, Y., Pechoušek, J., Machala, L., Zbořil, R., Szenthe, K., Abadía, J., Fodor, F., Klencsár, Z. & Solti, Á.** (2019). Chloroplasts preferentially take up ferric–citrate over iron–nicotianamine complexes in *Brassica napus*. *Planta*, 249(3), 751-763.
- Nechushtai, R., Karmi, O., Zuo, K., Marjault, H. B., Darash-Yahana, M., Sohn, Y. S., King, S. D., Zandalinas, S. I., Carloni, P. & Mittler, R.** (2020). The balancing act of NEET proteins: Iron, ROS, calcium and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(11), 118805.
- Nikolic, M., & Römheld, V.** (2002). Does high bicarbonate supply to roots change availability of iron in the leaf apoplast?. *Plant and Soil*, 241(1), 67-74.
- Nikolic, M., & Römheld, V.** (2007). The dynamics of iron in the leaf apoplast. In *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions* (pp. 353-371). Springer, Dordrecht.
- Nunes-Nesi, A., Brito, D. S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A. R., & Araújo, W. L.** (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science*, 19(6), 399-407.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pham, H. D., Pólya, S., Müller, B., Szenthe, K., Sági-Kazár, M., Bánkúti, B., Bánáti, F., Sárvári, É., Fodor, F., Tamás, L., Philippar, K. & Solti, Á.** (2020). The developmental and iron nutritional pattern of PIC1 and NiCo does not support their interdependent and exclusive collaboration in chloroplast iron transport in *Brassica napus*. *Planta*, 251(5), 1-16.

- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J. F., Gaymard, F., & Cellier, F. (2009).** Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 57(3), 400-412.
- Rellán-Álvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J. Á., García-Alonso, J. I., Abadía, J. & Álvarez-Fernández, A. (2010).** Identification of a tri-iron (III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology*, 51(1), 91-102.
- Robert S, Zouhar J, Carter C, Raikhel N (2007):** Isolation of intact vacuoles from Arabidopsis rosette leaf-derived protoplasts. *Nature Protocols*, 2(2): 259-262.
- Rodríguez-Celma, J., Chou, H., Kobayashi, T., Long, T. A., & Balk, J. (2019).** Hemerythrin E3 ubiquitin ligases as negative regulators of iron homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 98.
- Roschzttardtz, H., Conéjéro, G., Curie, C., & Mari, S. (2009).** Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant physiology*, 151(3), 1329-1338.
- Sági-Kazár, M., Solymosi, K., & Solti, Á. (2022).** Iron in leaves: chemical forms, signalling, and in-cell distribution. *Journal of Experimental Botany*, 73(6), 1717-1734.
- Sági-Kazár, M., Zelenyánszki, H., Müller, B., Cseh, B., Gyuris, B., Farkas, S. Z., Fodor, F., Tóth, B., Kovács, B., Koncz, A., Visnovitz, T., Buzás, E. I., Bánkúti, B., Bánáti, F., Szenthe, K. & Solti, Á. (2021).** Supraoptimal iron nutrition of Brassica napus plants suppresses the iron uptake of chloroplasts by down-regulating chloroplast ferric chelate reductase. *Frontiers in Plant Science*, 748.
- Schaedler, T. A., Thornton, J. D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A. J., Van Veen, H. W., & Balk, J. (2014).** A Conserved Mitochondrial ATP-binding Cassette Transporter Exports Glutathione Polysulfide for Cytosolic Metal Cofactor Assembly*♦. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23264-23274.
- Schmidt, W., Thomine, S., & Buckhout, T. J. (2019).** Iron nutrition and interactions in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1670.

- Schmidt, S. B., Eisenhut, M., & Schneider, A.** (2020). Chloroplast transition metal regulation for efficient photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(8), 817-828.
- Schwarz, B., & Bauer, P.** (2020). FIT, a regulatory hub for iron deficiency and stress signaling in roots, and FIT-dependent and-independent gene signatures. *Journal of Experimental Botany*, 71(5), 1694-1705.
- Selote, D., Samira, R., Matthiadis, A., Gillikin, J. W., & Long, T. A.** (2015). Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant physiology*, 167(1), 273-286.
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D.** (2021). Low-molecular-weight ligands in plants: role in metal homeostasis and hyperaccumulation. *Photosynthesis Research*, 150(1), 51-96.
- Smith GF, McCurdy WH, Diehl H** (1952). The colorimetric determination of iron in raw and treated municipal water supplies by use of 4:7-diphenyl-1:10-phenanthroline. *Analyst*, 77: 418–422.
- Solti, Á., Kovács, K., Basa, B., Vértés, A., Sárvári, É., & Fodor, F.** (2012). Uptake and incorporation of iron in sugar beet chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 91-97.
- Solti, Á., Sárvári, É., Tóth, B., Mészáros, I., & Fodor, F.** (2016). Incorporation of iron into chloroplasts triggers the restoration of cadmium induced inhibition of photosynthesis. *Journal of plant physiology*, 202, 97-106.
- Soós, Á., Bódi, É., Várallyay, Sz., Molnár, Sz., Kovács, B.** (2019): Mineral content of propolis tinctures in relation to the extraction time and the ethanol content of the extraction solvent. *LWT - Food Science and Technology* 111: 719-726.
- Terry, N., & Abadía, J.** (1986). Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7), 609-646.
- Vigani, G.** (2012). Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *Journal of plant physiology*, 169(1), 1-11.
- Vigani, G., & Hanikenne, M.** (2018). Metal homeostasis in plant mitochondria. *Annual Plant Reviews*, 50, 111-142.

- Vigani, G., Zocchi, G., Bashir, K., Philippar, K., & Briat, J. F.** (2013). Cellular iron homeostasis and metabolism in plant. *Frontiers in plant science*, 4, 490.
- Vigani, G., Solti, Á., Thomine, S., & Philippar, K.** (2019). Essential and detrimental—an update on intracellular iron trafficking and homeostasis. *Plant and Cell Physiology*, 60(7), 1420-1439.
- Von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J. F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A. & Hider, R. C.** (1999). Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*, 119(3), 1107-1114.
- Zandalinas SI, Song L, Sengupta S, McInturf SA, Grant DG, Marjault H, Castro-Guerrero NA, Burks D, Azad RK, Mendoza-Cozatl DG, Nechushtai R, Mittler R** (2020): Expression of a dominant-negative AtNEET-H89C protein disrupts iron-sulfur metabolism and iron homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 101: 1152–1169.
- Zandalinas, S. I., Song, L., Sengupta, S., McInturf, S. A., Grant, D. G., Marjault, H. B., Castro-Guerrero, N. A., Burks, D., Azad, R. K., Mendoza-Cozatl, D. G., Nechushtai, R. & Mittler, R.** (2020). Expression of a dominant-negative AtNEET-H89C protein disrupts iron–sulfur metabolism and iron homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 101(5), 1152-1169.