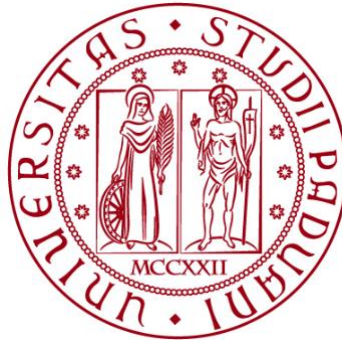


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Una subunità piccola non convenzionale di Rubisco
sostiene l'organello di concentrazione della CO₂
nelle piante terrestri**

**Tutor: Prof. Alessandro Alboresi
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Matilde Panepinto

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1 La fotosintesi	3
1.2 La RuBisCO	3
1.3 Il pirenoide	4
1.4 Anthocerotophyta.....	5
2. APPROCCIO SPERIMENTALE	7
2.1 Fluorescence Recovery After Photobleaching assay (saggio FRAP)	7
2.2 Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native-PAGE)	7
2.3 Size-exclusion chromatography (SEC)	8
2.4 BS3 on SDS PAGE	8
2.5 Spettrometria di massa tandem accoppiata a nano-cromatografia liquida (nanoLC-MS/MS)	8
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	10
3.1 Localizzazione di RbcS-STAR nel pirenoide.....	10
3.2 Proprietà dinamiche di RbcS-STAR nel pirenoide	10
3.3 Caratterizzazione dell'auto-oligomerizzazione di STAR.....	12
3.3.1 Native-PAGE	13
3.3.2 Size-exclusion chromatography (SEC)	13
3.3.3 Bissulfosuccinimidil suberato (BS3) su SDS-PAGE.....	14
3.3.4 Spettrometria di massa tandem accoppiata a nano-cromatografia liquida (nanoLC-MS/MS).....	14
3.4 Analisi strutturale dell'oloenzima Rubisco	15
3.5 Espressione di RbcS-STAR in organismi eterologhi	16
4. CONCLUSIONI	18
5. BIBLIOGRAFIA.....	19

APPENDICE

ABSTRACT

L'evoluzione della fotosintesi ossigenica risulta essere la causa stessa della sua inefficienza: l'enzima Rubisco, responsabile della fissazione della CO₂ atmosferica, ha catalisi lenta e bassa specificità per la molecola, reagendo significativamente anche con O₂. L'aumento di O₂ atmosferico ha richiesto negli ultimi centinaia di milioni di anni lo sviluppo di meccanismi per la concentrazione della CO₂ (CCMs). Il pirenoide è un CCM che si ritiene essersi evoluto indipendentemente in diversi organismi per evoluzione convergente e caratterizza molte alghe e alcune piante, le Anthocerotophyta. La scoperta del pirenoide in questo gruppo di Briofite ha aperto nuove strade di ricerca, accomunate dall'obiettivo di applicare il medesimo CCM alle piante coltivate, per migliorarne il rendimento.

Questo studio esamina la natura dei condensati di Rubisco, caratteristici del pirenoide, grazie all'identificazione di un'inusuale isoforma della subunità piccola che forma parte dell'oloenzima, chiamata RbcS-STAR. Quest'isoforma risulta essere responsabile, in quanto linker innato, dei condensati di Rubisco nel modello *Anthoceros agrestis* ed è in grado di indurli anche quando espressa nella Rubisco di *Arabidopsis thaliana*. Poiché, rispetto ai linker algali noti, RbcS-STAR non richiede di modificare subunità native di Rubisco nelle piante terrestri per condensare l'enzima, lo studio apre nuove prospettive nell'applicazione biotecnologica del CCM nelle colture.

1. INTRODUZIONE

1.1 La fotosintesi

La fotosintesi ossigenica è l'insieme delle reazioni attraverso cui piante, alghe e alcuni batteri convertono l'energia solare in energia chimica.

La fotosintesi può essere considerata una reazione di ossido-riduzione in cui la CO_2 atmosferica viene ridotta e l'acqua viene ossidata dando come prodotti glucosio ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e ossigeno (O_2).

Negli eucarioti, tutte le reazioni avvengono nel cloroplasto, un organello suddiviso in stroma e tilacoidi (un sistema di membrane interne al cloroplasto). Questa organizzazione spaziale si riflette anche nella localizzazione delle due fasi della fotosintesi: la fase luminosa avviene nei tilacoidi e la fase metabolica nello stroma. Nella fase luminosa, i complessi pigmento-proteina presenti nelle membrane tilacoidali catturano la luce e la utilizzano per alimentare una catena di trasporto degli elettroni che produce molecole di NADPH e di ATP. Queste ultime costituiscono la fonte di energia utilizzata nella fase metabolica per fissare la CO_2 atmosferica. La fase metabolica avviene nello stroma del cloroplasto e consiste nella fissazione della CO_2 , processo che si realizza attraverso una serie di reazioni cicliche, chiamate ciclo di Calvin-Benson. La CO_2 viene inserita nel ciclo dall'enzima Ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO), che catalizza la reazione tra ribulosio bisfosfato (RuBP) e CO_2 per produrre due molecole di 3-fosfoglicerato (3-PGA). Nella fase successiva del ciclo, 3-PGA viene fosforilato e ridotto a gliceraldeide-3-fosfato (G3P): questo prodotto esce dal ciclo di Calvin-Benson e viene esportato fuori dal cloroplasto per essere trasformato in saccarosio, cioè la forma in cui i prodotti della fotosintesi si muovono nei tessuti di conduzione della pianta per fornire nutrimento ai tessuti, o in amido, la forma in cui l'energia e il carbonio vengono accumulati come riserva.

1.2 La RuBisCO

L'enzima Ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO) è un oloenzima esadecamerico formato da 8 subunità grandi RbcL (catalitiche) e 8 subunità piccole RbcS (di cui si conoscono diverse isoforme per organismo), codificate rispettivamente nel genoma del cloroplasto e nel genoma nucleare delle cellule.

Rubisco è responsabile di due diverse attività catalitiche: l'attività carbossilasica a partire dal RuBP fissa la CO_2 atmosferica in due molecole di 3PGA che proseguono il ciclo di Calvin-Benson; l'attività ossigenasica, invece, lega al RuBP una molecola di O_2 invece che una di CO_2 . Questa duplice attività catalitica è dovuta in primo luogo alle simili proprietà delle due molecole: sono entrambe piccole, idrofobiche e poco cariche. Inoltre, nonostante l'affinità di Rubisco per CO_2 sia circa 100 volte superiore rispetto a O_2 , la composizione atmosferica odierna, che è molto diversa da quella presente quando l'enzima si è evoluto in cui l'ossigeno era poco presente, rende inevitabile un'attività ossigenasica significativa.

La cellula vegetale ha sviluppato, in risposta a queste condizioni, una via metabolica per riciclare il fosfoglicolato, cioè la molecola a due atomi di carbonio prodotta dall'attività ossigenasica della Rubisco.

Questa reazione di riciclo è chiamata fotorespirazione e avviene nella cellula vegetale in una serie di reazioni attraverso perossisoma, mitocondrio e cloroplasto. La fotorespirazione permette, a partire da 4 atomi di carbonio che entrano nel ciclo (2 fosfoglicolati), di recuperarne 3 (1 fosfoglicerato) che possono poi rientrare nel ciclo di Calvin-Benson. Il costo metabolico del processo equivale a 1 ATP e alla perdita di una molecola di CO_2 e una di NH_3 che dovranno essere nuovamente fissate. L'elevato costo della fotorespirazione fa perdere molta efficienza ma risulta essenziale per la crescita delle piante alla concentrazione di CO_2 cui sono normalmente esposte.

Rubisco può essere definito, per una serie di ragioni, un enzima poco efficiente: da una parte la sua specificità per la CO_2 rispetto a O_2 è ridotta, dall'altra ha un'attività catalitica lenta. Osservando Rubisco in diversi organismi si è notato che all'aumento della specificità dell'enzima corrisponde minor velocità di catalisi e viceversa, rendendo chiaro come l'efficienza attuale sia già un compromesso evolutivo. Come conseguenza, alcuni organismi fotosintetici hanno sviluppato altri sistemi per rendere i processi fotosintetici più efficaci, si sono, infatti, evoluti in questo contesto una serie di meccanismi per la concentrazione della CO_2 (CCM, *CO₂-concentrating mechanisms*). Concentrare la CO_2 consente un aumento del turnover della Rubisco e l'aumento della proporzione di reazioni di carbossilazione rispetto a quelle di ossigenazione.

I CCMs si dividono in biochimici e biofisici secondo la molecola intermedia usata per concentrare la CO_2 . I primi (come la fotosintesi C4) funzionano tipicamente attraverso strutture multicellulari e si basano sulla temporanea incorporazione della CO_2 in molecole organiche e sul suo successivo rilascio vicino alla Rubisco. Nei secondi CCMs l'unico intermedio è il bicarbonato (HCO_3^-), il meccanismo opera a livello di unica cellula e si basa su compartimenti subcellulari in cui la Rubisco viene concentrata in una matrice: nei procarioti il compartimento che si forma è il carbossisoma mentre negli eucarioti è il pirenoide.

1.3 Il pirenoide

Il pirenoide è un compartimento subcellulare che si forma nel cloroplasto, è specializzato per contenere in una zona definita la CO_2 assorbita dall'atmosfera in modo da rendere più probabile il legame con la Rubisco, concentrata in una matrice. Il pirenoide è un meccanismo di concentrazione della CO_2 (CCM) tipico delle alghe verdi e delle Anthocerotophyta, uno dei tre gruppi di Briofite in cui la presenza del pirenoide caratterizza gran parte delle specie.

Tra i CCMs il pirenoide risulta di particolare interesse per una serie di motivi, primo fra tutti la quantità di CO_2 fissata grazie a esso, che è stata calcolata essere circa il 30-40% delle assimilazioni annuali totali. Inoltre, i pCCMs (*pyrenoid-based concentrating mechanisms*) sono interesse di ricerca per la possibilità di applicarli alle piante coltivate, in modo da aumentarne la quantità di CO_2 fissata e rendere più efficienti l'uso di azoto e acqua. Questa prospettiva, rispetto ad altri CCMs, è considerata favorevole in primo luogo per la prossimità evolutiva tra le Antoceroti e le piante vascolari, che corrisponde a maggiori probabilità di ingegnerizzare strutture di un gruppo nell'altro. In aggiunta il pirenoide, in quanto CCM biofisico, opera a livello di singola cellula: la sua implementazione in altre piante non

richiederebbe variazioni strutturali e anatomiche (per esempio la specifica anatomia fogliare delle piante C4), ma solo delle modifiche a livello proteico e di interazione tra i componenti cellulari.

Riguardo l'origine del pirenoide, si ritiene che essa sia legata a eventi di evoluzione convergente, ovvero uno sviluppo indipendente di caratteristiche o strutture simili tra le specie di diverse linee evolutive, in questo caso in risposta a una comune pressione selettiva: il rapido cambio in proporzioni della composizione atmosferica causato dallo sviluppo della fotosintesi ossigenica. La fotosintesi ossigenica inizia a svilupparsi nei cianobatteri circa 3 miliardi di anni fa e comporta una rapida inversione nelle concentrazioni atmosferiche: la CO₂ (reagente della fotosintesi) diminuisce, mentre l'O₂ (prodotto della fotosintesi) aumenta, creando una condizione sfavorevole per la crescita.

In questo contesto, i pCCMs si stimano essersi evoluti in cianobatteri e alghe circa 300-450 milioni di anni fa e successivamente nelle Antocerote, circa 100 milioni di anni fa: due momenti evolutivi in cui le diverse linee di organismi fotosintetici erano già ben separate, rivelando credibile l'ipotesi di un'evoluzione convergente. La teoria trova delle conferme anche a livello molecolare: in primo luogo i CCM in organismi diversi utilizzano anidrasi carboniche tilacoidali non omologhe per convertire il bicarbonato accumulato nello stroma in CO₂; un'altra prova riguarda l'assenza di omologhi della proteina EPYC1 (*Essential pyrenoid component 1*) di *Chlamydomonas*, fondamentale per la condensazione della Rubisco nel pirenoide: la stessa funzione viene svolta nei pirenoidi di altri organismi da proteine differenti, evolute indipendentemente. In questa tesi in particolare, verrà trattata la strategia di condensazione della Rubisco dell'organismo modello *Anthoceros agrestis*.

La morfologia del pirenoide varia in base alla specie ma mantiene come caratteristica unificante la matrice di Rubisco. Questa consiste in condensati a separazione di fase liquido-liquido in cui l'enzima Rubisco rappresenta il 90% del contenuto proteico (in *Chlamydomonas*, l'organismo modello per gli studi sul pirenoide). Diverse specie possono avere un'unica matrice di Rubisco per cellula o averne multiple, variabili per forma e dimensione. La matrice di Rubisco è sempre associata a membrane tilacoidali, queste contengono le anidrasi carboniche che convertono il bicarbonato in CO₂, forma in cui può essere fissata dall'enzima. Nella maggior parte delle specie i tilacoidi attraversano il pirenoide in forma di fogli o tubuli; nelle altre specie, invece, si trovano adiacenti alla matrice di Rubisco a cui sono associati depositi polisaccaridici che contornano il pirenoide con funzione di barriere per rallentare la fuoriuscita di CO₂ dal compartimento. I pirenoidi nelle Antocerote hanno la caratteristica principale di essere attraversati da numerosi tilacoidi e sono tipicamente privi della struttura polisaccaridica.

1.4 Anthocerotophyta

Le Antocerote sono un gruppo poco numeroso di piante non vascolari che vive in suoli umidi e sono le uniche piante terrestri che sviluppano il pirenoide. Sono tradizionalmente classificate nella divisione delle Briofite anche se la corretta classificazione filogenetica risulta attuale oggetto di dibattito.

Possiedono una morfologia semplice, caratterizzata da una struttura talloide aderente al substrato dalla quale si ergono delle strutture verticali: le due strutture

sono rispettivamente il gametofito e lo sporofito. Il tallo (che corrisponde alla generazione gametofitica) è costituito da cellule isodiametriche i cui cloroplasti possiedono il pirenoide e risulta simile alle Epatiche, dalle quali si distingue però per la presenza di pori nella superficie ventrale. Sulla stessa superficie ventrale sono presenti anche rizoidi, con la funzione di ancoraggio al substrato. Le Antocerote sono predisposte a instaurare rapporti endosimbiontici con cianobatteri azotofissatori, ospitati in cavità mucillaginose al di sotto dei pori. Gli sporofiti di queste specie sono fotosintetizzanti e hanno un'epidermide con stomi, rispetto alle altre Briofite gli sporofiti delle Antocerote sono indipendenti troficamente dal gametofito.

Le relazioni filogenetiche tra i tre gruppi di Briofite (Anthocerotophyta, Marchantiophyta e Bryophyta) e le tracheofite sono tuttora oggetto di discussione. La divisione delle Briofite è tanto interessante quanto difficile da studiare perché strettamente legata all'emersione delle piante dall'ambiente acquatico, fenomeno risalente secondo le stime a circa 470-515 milioni di anni fa (Morris et al., 2018). Le ipotesi principali sono due e riguardano la monofilia e la parafilia della divisione delle Briofite. La prima teoria (Wickett et al., 2014) è associata a studi molecolari che collocavano fino a pochi anni fa le Epatiche (Marchantiophyta) o le Antocerote (Anthocerotophyta) come gruppo fratello di tutte le piante vascolari (*Tracheophyta*), descrivendo le Briofite come un clade parafiletico. La teoria che supporta la loro monofilia, invece, è più recente e sostiene che le Briofite sono un clade unico, gruppo fratello delle Tracheophyte. All'interno di questo unico clade, Epatiche e Muschi (Bryophyta) sono ritenuti essere più strettamente imparentati (formano il clade dei Setaphyta) mentre le Antocerote rappresentano il lignaggio più basale e fratello dei Setaphyta (De Sousa et al., 2019).

Lo studio del pirenoide nelle Anthocerotophyta viene condotto principalmente sull'organismo modello *Anthoceros agrestis* nel quale è stata identificata un'isoforma della subunità piccola di Rubisco (RbcS) caratterizzata da un'estensione C-terminale di 102 aminoacidi denominata "STAR" (sequestration associated region).

2. APPROCCIO SPERIMENTALE

2.1 Fluorescence Recovery After Photobleaching assay (saggio FRAP)

Il saggio FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) è una metodica di microscopia confocale che permette di ottenere informazioni sulla mobilità molecolare analizzando la cinetica di recupero della fluorescenza in sistemi biologici di ridotte dimensioni, come membrane cellulari, singole cellule o strutture subcellulari (Axelrod et al., 1976).

Il saggio prevede tre fasi sequenziali. Nella fase di *pre-bleach* viene valutata l'intensità di fluorescenza iniziale della struttura subcellulare, le cui proteine di interesse sono state precedentemente marcate con fluorofori.

La fase successiva è detta di *bleaching* e consiste nell'applicare un breve e intenso impulso laser che causa *photobleaching* irreversibile dei fluorofori presenti nella regione di interesse.

Nella fase di recupero il segnale fluorescente viene monitorato nel tempo mediante un impulso luminoso a intensità ridotta per registrare la diffusione di molecole fluorescenti intatte provenienti dalle aree circostanti la regione colpita. Per completare l'analisi, il segnale di fluorescenza rilevato dopo un certo tempo t viene normalizzato rispetto all'intensità iniziale (a t_0) in modo da ottenere la curva di recupero. A un recupero rapido corrisponde un'alta mobilità molecolare, mentre a un recupero lento o assente corrisponde un'organizzazione in cui le molecole sono vincolate nella struttura subcellulare con una scarsa possibilità di diffusione.

Il saggio FRAP è stato applicato a quattro sistemi distinti: pirenoidi di *A. agrestis* che esprimevano RbcS-STAR marcata con mScarlet (RbcS-STAR-mScarlet), pirenoidi che esprimevano RbcS1-mVenus, pirenoidi che esprimevano sia RCA-mScarlet che RbcS1-mVenus, e a strutture formate da RbcS-STAR-mScarlet espressi in *A. fusiformis*, specie normalmente priva di pirenoidi.

2.2 Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native-PAGE)

L'elettroforesi sul gel nativo (*Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Native-PAGE) è una tecnica utilizzata per separare le proteine in un gel di poliacrilammide mantenendo la loro struttura nativa. Nella tecnica convenzionale (SDS-PAGE) le proteine vengono separate esclusivamente in base al peso molecolare poiché vengono trattate con sodio-dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico che si lega alle catene polipeptidiche conferendo loro una carica negativa uniforme che maschera le cariche originali e dissocia eventuali complessi. Il Native-PAGE, invece, viene eseguito in assenza di agenti denaturanti, in questa condizione le proteine migrano nel gel mantenendo la propria carica originale e quindi anche la forma e struttura nativa. Ciò permette di verificare la presenza di oligomeri e di osservarne la dimensione.

La procedura prevede per prima cosa l'allestimento del gel di poliacrilammide, un gel altamente reticolato che funziona da setaccio molecolare e in cui le proteine si spostano in risposta al campo elettrico che viene applicato al sistema. Questa Native-PAGE è stata eseguita in parallelo su campioni di GFP-RbcS-STAR, GFP-STAR e GFP, in modo da poterne osservare la differente migrazione sul gel e ricavare informazioni sulle rispettive modalità di associazione oligomerica.

2.3 Size-exclusion chromatography (SEC)

La cromatografia a esclusione dimensionale (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) separa le molecole di una soluzione in base alla loro dimensione sfruttando il passaggio attraverso una colonna cui è associata una matrice di particelle sferiche porose. Le molecole di dimensione maggiore sono escluse dalle particelle di gel e migrano senza ritenzione, eluendo con volumi di eluzione minori (il volume di eluzione è il volume di tampone che deve passare prima che la molecola esca dalla colonna), al contrario le molecole di dimensione minore penetrano nelle particelle di gel, poiché il passaggio le rallenta esse eluiscono con volumi di eluzione maggiori.

Sperimentalmente, il campione proteico in soluzione con un tampone viene caricato nella parte superiore della colonna e fatto migrare attraverso la matrice con un flusso costante. Il flusso di eluato è rilevato durante tutta la procedura con un rivelatore di assorbanza.

La visualizzazione dei risultati è possibile grazie al cromatogramma, il quale riporta sull'asse delle ascisse il volume di eluzione (mL) e sull'asse delle ordinate l'assorbanza a 280 nm (mAU). L'assorbanza rilevata è proporzionale alla concentrazione proteica nell'eluato: a un picco stretto corrisponde una popolazione omogenea di molecole di dimensioni uniformi, mentre a picchi multipli o allargati corrispondono popolazioni eterogenee di molecole.

2.4 BS3 on SDS PAGE

Il Bissulfosuccinimidil suberato (BS3) è un cross-linker amminico in grado di formare legami covalenti tra gruppi amminici di residui di lisina in stretta prossimità spaziale. Il trattamento con BS3 stabilizza le interazioni proteina-proteina presenti nel campione, in modo che esse vengano mantenute anche nella SDS-PAGE che segue il cross-linking. Quando sottoposte all'elettroforesi con SDS (un detergente anionico), le proteine perdono le interazioni non covalenti responsabili della struttura nativa e dell'associazione oligomerica ma mantengono i cross-link formati da BS3.

2.5 Spettrometria di massa tandem accoppiata a nano-cromatografia liquida (nanoLC-MS/MS)

La spettrometria di massa tandem accoppiata a nano-cromatografia liquida è stata utilizzata per identificare i residui aminoacidici coinvolti nelle interazioni di cross-linking in GFP-STAR. Questa strategia è nota come *cross-linking mass spectrometry* e permette di mappare i contatti proteina-proteina identificando quelle coppie di residui che, poiché in prossimità spaziale nella struttura nativa, sono tenute insieme da un cross-link di BS3.

La procedura prevede che la proteina cross-linkata con BS3 venga digerita con tripsina, una proteasi che taglia la catena polipeptidica dopo i residui di lisina e arginina. Da questa fase risultano peptidi cross-linkati e peptidi lineari che vengono poi separati per nano-cromatografia liquida e introdotti nello spettrometro di massa. Nella prima fase di analisi (MS1) viene misurata la massa di ogni peptide, mentre nella seconda fase (MS/MS) i peptidi vengono frammentati per collisione con un gas inerte. Lo spettro di frammenti che risulta dal processo (MS2) permette

di risalire tramite un database proteico alla sequenza dei peptidi coinvolti nei cross-link, identificando in questo modo le coppie di lisine che erano in prossimità spaziale nella proteina nativa.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Localizzazione di RbcS-STAR nel pirenoide

Per comprendere la localizzazione della subunità RbcS-STAR nel pirenoide, sono state marcate con proteine fluorescenti di fusione (mVenus e mScarlet) la proteina RbcS-STAR e altre proteine note per essere associate alla formazione del pirenoide: l'enzima RCA (*Rubisco activase*) e le subunità piccole canoniche di Rubisco, RbcS1 e RbcS2.

Questi esperimenti di *fluorescent protein tagging* hanno permesso di osservare tramite microscopia confocale che RbcS1-mVenus (Fig.1 A) e RbcS2-mVenus (Fig.1 B) colocalizzano con RCA-mScarlet negli stessi pirenoidi e che RbcS-STAR-mScarlet colocalizza con RbcS1-mVenus (Fig.1 C) e RCA-mVenus (Fig.1 D). Questo risultato conferma che RbcS-STAR è un componente del pirenoide.

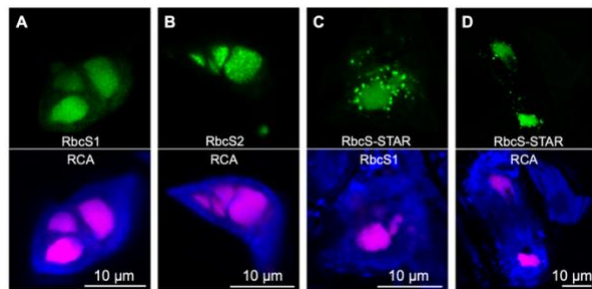


Fig. 1. Esperimenti di *fluorescent protein tagging*

Dalle immagini, inoltre, è possibile osservare la formazione di *puncta stromali* aggiuntivi da parte di RbcS-STAR-mScarlet, indipendenti dagli altri marcatori del pirenoide. Questi sono dei piccoli aggregati proteici di dimensione inferiore a 500 nm che si formano nello stroma del cloroplasto e non coincidono con il segnale di RbcS1 (Fig.1 C) o di RCA (Fig.1 D), indicando una certa tendenza di RbcS-STAR ad auto-oligomerizzare, cioè a formare assemblaggi con altre copie di sé stessa.

3.2 Proprietà dinamiche di RbcS-STAR nel pirenoide

Per comprendere le differenti proprietà dinamiche dei componenti del pirenoide sono stati eseguiti quattro saggi FRAP su sistemi distinti. I risultati sono osservabili mediante immagini di microscopia confocale in cui le frecce bianche indicano i punti colpiti da *bleaching* e mediante i grafici delle curve di recupero di intensità fluorescente, in cui il tempo sperimentale t si trova sull'asse delle ascisse (t_0 corrisponde all'evento di *photobleaching*) e l'intensità di fluorescenza relativa sull'asse delle ordinate.

Dall'analisi delle curve viene ricavata la frazione mobile (M_f), definita come il rapporto tra la variazione di intensità al plateau e la variazione di intensità tra la fase di *pre-bleach* e il momento immediatamente successivo al *bleaching*.

$$M_f = (I_{\text{plateau}} - I_0) / (I_{\text{pre}} - I_0)$$

Il primo saggio FRAP è stato eseguito su pirenoidi di *A. agrestis* esprimenti RbcS-STAR-mScarlet (Fig.2). Dopo 100s e 300s dal *bleaching* le regioni sottoposte a *photobleaching* rimangono prive di segnale fluorescente e la curva del grafico rimane piatta attorno a un'intensità relativa di 0.4-0.5 per tutta la durata dell'osservazione, senza avvicinarsi significativamente al grado di intensità originale.

Questo comportamento corrisponde a una mobilità molto limitata di RbcS-STAR all'interno del pirenoide: le molecole che hanno subito il *bleaching* non vengono sostituite da molecole fluorescenti provenienti dallo stroma circostante, ciò indica che RbcS-STAR mantiene forti vincoli diffusionali all'interno della struttura del pirenoide.

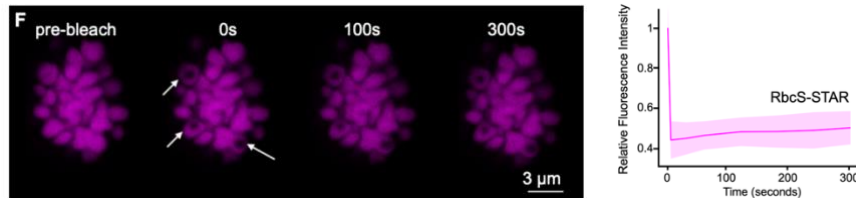


Fig. 2. Saggio FRAP su pirenoidi esprimanti RbcS-STAR-mScarlet in *A. agrestis*.

Il secondo saggio FRAP è stato eseguito su pirenoidi di cellule appartenenti alla stessa linea trasformata di *A. agrestis* in cui è espresso RbcS1-mVenus (Fig.3), con l'obiettivo di confrontare i due saggi per evidenziare le differenze in dinamicità tra la subunità piccola canonica e la subunità non canonica RbcS-STAR. Il saggio su RbcS1 ha evidenziato due comportamenti distinti tra pirenoidi della stessa linea: in parte è risultato un recupero rapido (in giallo), con $M_f = 67 \pm 9\%$, e in parte uno lento (in azzurro), con $M_f = 13 \pm 3\%$. Queste differenze in recupero riscontrate tra pirenoidi della stessa linea di organismi indicano come i condensati possano possedere proprietà fisiche eterogenee: i pirenoidi con un recupero fluorescente rapido hanno organizzazione più liquida, mentre quelli con recupero lento hanno organizzazione più rigida. Al contrario, RbcS-STAR mostra un recupero scarso in tutti i pirenoidi analizzati, ciò suggerisce che RbcS-STAR è soggetta a vincoli diffusionali maggiori rispetto alla subunità canonica, probabilmente dovuti a interazioni aggiuntive mediate dall'estensione STAR.

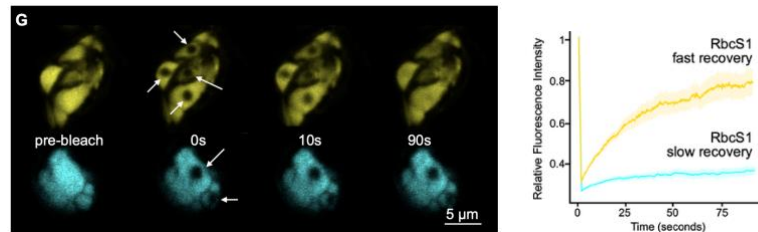


Fig. 3. Saggio FRAP su pirenoidi esprimanti RbcS1-mVenus in *A. agrestis*.

Un terzo saggio FRAP è stato applicato ai pirenoidi che avevano mostrato un lento recupero di RbcS1, in questi è stato messo a confronto il recupero di RbcS1-mVenus rispetto a quello di RCA-mScarlet nello stesso compartimento (Fig.4). Le due proteine mostrano un comportamento profondamente diverso: RCA-mScarlet (in rosa) ha un recupero rapido con $M_f = 98 \pm 5\%$, mentre RbcS1-mVenus (in verde) mantiene un recupero lento. Queste differenze diffusionali risultano coerenti con le rispettive funzioni biologiche: RCA si muove liberamente nel compartimento in quanto ha un ruolo di interazione transiente con Rubisco per attivarla, mentre

RbcS1 (e in generale Rubisco) forma interazioni più stabili e possiede maggiori vincoli diffusionali.

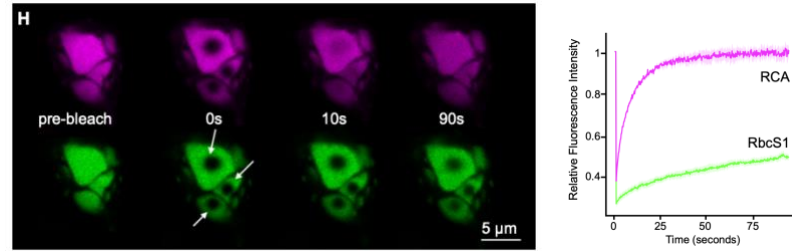


Fig. 4. Saggio FRAP su pirenoidi esprimenti RbcS1-mVenus e RCA-mScarlet in *A. agrestis*.

Il quarto saggio FRAP è stato eseguito su condensati formati da RbcS-STAR-mScarlet nell'*Antocerot* *A. fusiformis*, normalmente priva di pirenoidi (Fig.5). L'obiettivo era verificare se le proprietà di immobilità di RbcS-STAR osservate nei precedenti saggi fossero intrinseche dell'estensione STAR o dipendenti dal contesto del pirenoide nativo dell'organismo modello utilizzato *A. agrestis*. Il recupero di fluorescenza minimo osservabile nei condensati di RbcS-STAR indotti in *A. fusiformis* conferma che le caratteristiche di ridotta mobilità sono intrinseche di RbcS-STAR, indipendentemente dal contesto cellulare di espressione.

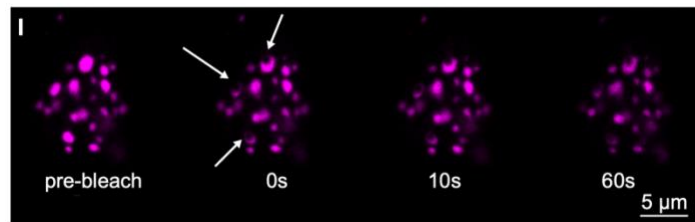


Fig. 5. Saggio FRAP su condensati esprimenti RbcS-STAR-mScarlet in *A. fusiformis*

3.3 Caratterizzazione dell'auto-oligomerizzazione di STAR

Un primo indicatore del potenziale di auto-oligomerizzazione di STAR è stato dedotto dall'insolubilità di RbcS-STAR in esperimenti di espressione ricombinante in *E. coli*: in seguito a lisi cellulare, RbcS-STAR non rimaneva in soluzione ma precipitava. Per poter studiare in vitro la natura dell'interazione, RbcS-STAR (l'intera subunità piccola) e il dominio STAR sono stati fusi in N-terminale con la *green fluorescent protein* (GFP), ottenendo le proteine di fusione GFP-RbcS-STAR e GFP-STAR, caratterizzate da maggiore solubilità e utilizzate nelle analisi sperimentali una volta purificate.

Grazie ad analisi bioinformatiche (Fig.6), l'estensione aminoacidica STAR è stata identificata come composta da tre motivi ripetuti di 23 aminoacidi: m1, m2 e m3. Le predizioni strutturali ottenute con AlphaFold3 indicano che m1 (in viola) corrisponde a una regione disordinata, mentre m2 (in arancione) e m3 (in azzurro) formano due domini a α -elica caratterizzati da residui idrofobici in posizioni chiave tipiche dei domini coiled-coil, domini spesso coinvolti in interazioni proteina-proteina e nella formazione di condensati.

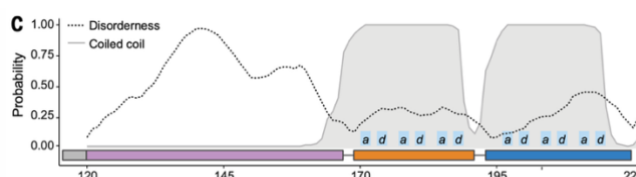


Fig. 6. Predizione strutturale della regione disordinata di STAR seguita da due regioni α -elica che formano coiled-coils.

Per verificare se l'oligomerizzazione di STAR fosse mediata da queste interazioni idrofobiche, sono state generate due varianti mutanti della proteina: nelle varianti 6Q e 12Q sono stati sostituiti rispettivamente metà e tutti i residui di leucina e isoleucina con residui di glutammina (Fig.7), in modo da ridurre le interazioni e osservare i cambiamenti nell'associazione oligomerica. Ciò viene fatto applicando in parallelo le procedure tecniche alle proteine di fusione GFP-STAR WT (wild-type), GFP-6Q e GFP-12Q.

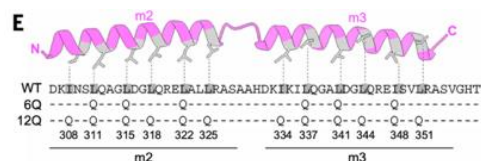


Fig. 7. Sostituzioni di leucine (L) e isoleucine (I) in glutammina (Q) nelle varianti 6Q e 12Q.

3.3.1 Native-PAGE

Poiché il Native-PAGE mantiene la struttura proteica nativa dei campioni, i risultati permettono di ricavare informazioni sull'organizzazione delle proteine in soluzione.

La migrazione nel gel (Fig.8) di GFP-RbcS-STAR corrisponde a quella di una specie polidispersa: forma, infatti, bande multiple corrispondenti a una popolazione di molecole di diversa dimensione. Questo comportamento è probabilmente dovuto alle numerose superfici di interazione del dominio RbcS, predisposto fisiologicamente a interagire con le altre proteine che si assemblano nell'oloenzima Rubisco. GFP-STAR, priva del dominio RbcS, migra come specie monodispersa (popolazione di molecole di dimensione omogenea) poiché forma un numero discreto e stabile di interazioni, risultato coerente con l'ipotesi di auto-oligomerizzazione mediata dal dominio STAR.

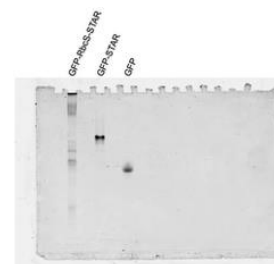


Fig. 8. Native-PAGE di GFP-RbcS-STAR, GFP-STAR e GFP purificati.

3.3.2 Size-exclusion chromatography (SEC)

L'analisi SEC viene eseguita in parallelo su GFP-STAR (WT), GFP-6Q, GFP-12Q e GFP e il cromatogramma (Fig.9) permette di confrontare i profili di eluizione delle varianti proteiche. In un cromatogramma, a picchi stretti e simmetrici corrispondono popolazioni di dimensione uniforme, mentre a picchi larghi e multipli corrispondono popolazioni eterogenee.

GFP (curva in giallo) eluisce a un volume di circa 88 mL, rappresentando la molecola più piccola in soluzione e il riferimento per la forma monomerica. I picchi di eluizione delle varianti GFP-12Q (in verde) e GFP-6Q (in lilla) sono simili e

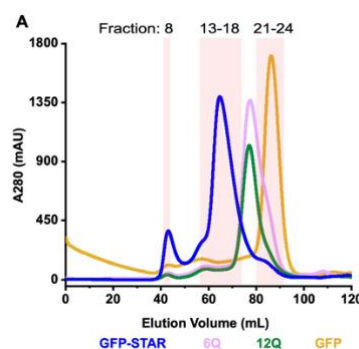


Fig. 9. Cromatogramma dell'analisi SEC.

risultano più vicini al riferimento dimensionale monomerico dato dal picco di GFP rispetto al picco di GFP-STAR WT. Ciò indica che le sostituzioni di aminoacidi idrofobici nelle varianti compromettono significativamente la capacità di oligomerizzazione, mantenendo le proteine in uno stato prevalentemente monomerico.

Il profilo di eluizione di GFP-STAR è rappresentato da un picco principale a circa 65 mL, corrispondente all'oligomero più abbondante, e da un picco secondario a circa 40 mL, corrispondente a una quantità ridotta di aggregati di ordine superiore. Questi risultati confermano che il dominio STAR è propenso a formare oligomeri stabili mediati dalle interazioni idrofobiche tra i domini coiled-coil m2 e m3.

3.3.3 Bissulfosuccinimidil suberato (BS3) su SDS-PAGE

Per comprendere la stechiometria dell'oligomero più abbondante in cui si associa GFP-STAR, vengono eseguiti esperimenti di cross-linking seguiti da corsa su SDS-PAGE. Nell'esperimento, la corsa su gel viene eseguita in parallelo su campioni di GFP, GFP-STAR WT, GFP-6Q e GFP-12Q, ciascuno analizzato in presenza e in assenza del cross-linker BS3 (Fig.10). Nelle corsie in assenza di BS3 (corsie "-") tutti i campioni migrano alla distanza attesa per lo stato monomerico della proteina, che corrisponde a un peso molecolare di circa 28kDa per GFP e circa 40 kDa per le varianti di GFP-STAR. Nelle corsie in presenza di BS3 (corsie "+"), GFP-6Q e GFP-12Q mostrano una banda unica a basso peso molecolare corrispondente alla forma monomerica, mentre GFP-STAR WT forma una banda corrispondente a un peso molecolare tra 150kDa e 200kDa, compatibile con un tetramero (peso molecolare circa 4 volte quello del monomero). GFP è utilizzata come controllo dell'esperimento e non mostra variazioni di posizione sul gel con o senza BS3, confermando che le bande ad alto peso molecolare osservate per GFP-STAR WT non sono frutto di errori o interferenze sperimentali. Questi risultati confermano che le interazioni idrofobiche tra i domini coiled-coil di m2 e m3 sono necessarie per l'associazione oligomerica di STAR e che la stechiometria dell'oligomero principale è tetramERICA.

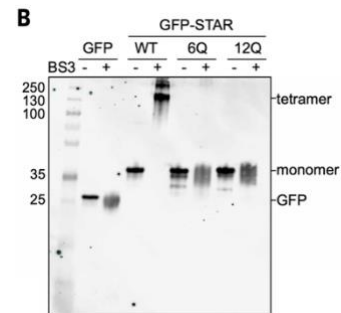


Fig. 10. SDS-PAGE di GFP-STAR e le sue varianti con cross-link di BS3.

3.3.4 Spettrometria di massa tandem accoppiata a nano-cromatografia liquida (nanoLC-MS/MS)

La tecnica viene applicata a GFP-STAR WT e alla variante GFP-6Q con l'obiettivo di confrontare i profili di cross-linking nei motivi m2 e m3 del dominio STAR. I risultati vengono visualizzati tramite una *heatmap* (Fig.11) che riporta sugli assi le posizioni aminoacidiche di STAR (da 257 a 359) e identifica le coppie di lisine legate da cross-link con dei cerchi colorati dal bianco (frequenza nulla) al rosso (frequenza superiore a 20).

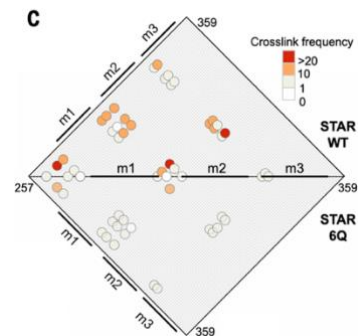


Fig. 11. Heatmap che evidenzia le lisine con cross-link e la loro frequenza per GFP-STAR WT (sopra) e 6Q (sotto).

Il triangolo della *heatmap* che fa riferimento a GFP-STAR WT mostra una maggior quantità di cerchi arancioni e rossi, concentrati nelle regioni m2-m2, m2-m3 e m3-m3. La quantità di cross-link in queste regioni indica che le lisine nei domini m2 e m3 si trovano spesso in prossimità spaziale nella proteina nativa, a conferma del fatto che le α -eliche di m2 e m3 formano coiled-coil. Nella regione m1, invece, sono presenti segnali di cross-link con frequenza minore, coerentemente con il carattere disordinato di questo motivo.

Il triangolo inferiore della mappa mostra la frequenza di cross-link che è quasi nulla nella variante GFP-6Q. Questo dimostra che le interazioni idrofobiche sono necessarie per mantenere le lisine di m2 e m3 in prossimità spaziale per la formazione di coiled-coil.

3.4 Analisi strutturale dell'oloenzima Rubisco

L'organizzazione strutturale dell'oloenzima Rubisco è stata studiata mediante cryo-electron microscopy (cryo-EM) e ha permesso di identificare diverse popolazioni strutturali dell'oloenzima in *A. agrestis*. Dai micrografi si osservano tre popolazioni distinte di particelle di Rubisco.

La prima popolazione mostra due oloenzimi di Rubisco in configurazione testa a testa (*head-to-head*) l'uno sull'altro (Fig.13). La ricostruzione di questa popolazione ha prodotto una mappa di densità elettronica ad alta risoluzione (Fig.12) che ha permesso di identificare il punto di interfaccia di contatto, mediata dai residui N90 e K89 delle subunità RbcS. Un' associazione strutturale simile è stata osservata anche nei carbossisomi batterici.

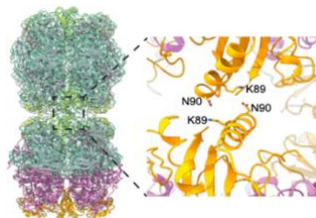


Fig. 12. Mappa di densità elettronica ad alta risoluzione della configurazione testa a testa di Rubisco.

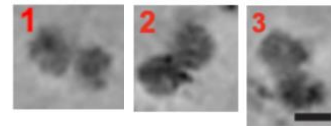


Fig. 13. Particelle di Rubisco in conformazione testa a testa, visibili dal micrografo di cryo-EM.

La seconda popolazione (Fig.15) evidenzia singoli oloenzimi con densità aggiuntive sporgenti dal complesso (frecche verdi), probabilmente corrispondenti ai domini STAR. Questa ricostruzione ha prodotto una mappa di densità a risoluzione più bassa (Fig.14), coerente con la flessibilità intrinseca della regione non strutturata di STAR, che assume posizioni variabili producendo un segnale di densità diffuso.

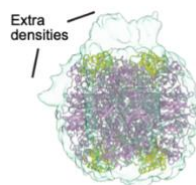


Fig. 14. Mappa di densità elettronica a bassa risoluzione della configurazione di Rubisco con densità aggiuntive.

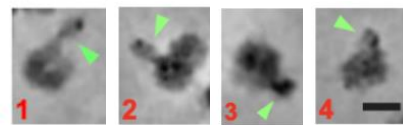


Fig. 15. Singole particelle di Rubisco con densità aggiuntive sporgenti, visibili dal micrografo di cryo-EM.

La terza popolazione (Fig.16) è formata da più particelle di Rubisco collegate tra loro da strutture filamentose, probabilmente interazioni STAR-STAR che formano dei ponti tra gli oloenzimi (frecche gialle) e mediano la condensazione di Rubisco.

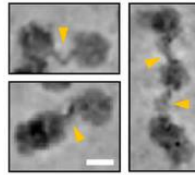


Fig. 16. Particelle di Rubisco collegate da ponti di STAR, visibili dal micrografo di cryo-EM

Questi dati cryo-EM dimostrano che RbcS-STAR è parte integrante dell'oloenzima e che il dominio STAR, sporgendo verso l'esterno, è coinvolto nelle interazioni tra più oloenzimi.

3.5 Espressione di RbcS-STAR in organismi eterologhi

Per comprendere il comportamento e la possibile applicazione dei risultati su organismi eterologhi sono stati condotti esperimenti sull'organismo modello *Arabidopsis thaliana*, un'angiosperma priva di pirenoidi.

L'espressione di RbcS-STAR è stata testata nel mutante RbcS-triplo 1a2b3b, caratterizzato da un contenuto di Rubisco pari al 3% del WT e una crescita molto lenta.

L'espressione di RbcS-STAR nell'organismo mutante (Fig.17) ha portato significativi miglioramenti di crescita in tutti i parametri analizzati, cioè l'accumulo di biomassa nella rosetta, l'area delle foglie e i tassi di assimilazione della CO₂. Questo risultato conferma che RbcS-STAR è una subunità piccola funzionale in grado di assemblarsi con le subunità RbcL di *A. thaliana* e creare un oloenzima Rubisco ibrido.

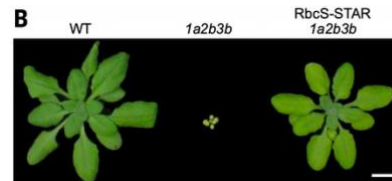


Fig. 17. Rosette di *Arabidopsis* WT, mutante 1a2b3b e RbcS-STAR 1a2b3b a 28 giorni di crescita.

Le immagini TEM dei cloroplasti (Fig.18) evidenziano che, oltre a miglioramenti nella crescita del mutante, l'espressione di RbcS-STAR comporta la formazione di grandi compartimenti elettron-densi nello stroma (indicati con una freccia) che risultano, invece, assenti nei cloroplasti di *Arabidopsis* WT e nel mutante 1a2b3b non trasformato. La tecnica dell'immunogold labelling ha confermato che questi compartimenti sono arricchiti di RbcS-STAR e di Rubisco, dimostrando che l'espressione di RbcS-STAR in *Arabidopsis* 1a2b3b è in grado di indurre la formazione di condensati di Rubisco.

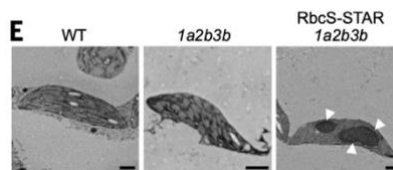


Fig. 18. Immagini TEM di cloroplasti di *Arabidopsis* WT, mutante 1a2b3b e RbcS-STAR 1a2b3b

Per verificare che la formazione di condensati sia attribuibile al dominio STAR e non al dominio RbcS canonico di *A. agrestis*, i mutanti tripli 1a2b3b vengono trasformati con RbcS1 di *A. agrestis* (AaRbcS1), con RbcS-STAR privato del dominio STAR (Δ STAR) e con la RbcS nativa di *A. thaliana* con STAR aggiunto artificialmente (AtRbcS1A-STAR). Le immagini TEM (Fig.19) mostrano l'assenza di condensati in assenza di STAR, mentre evidenziano compartimenti elettron-densi analoghi a quelli formati da RbcS-STAR nelle piante esprimenti AtRbcS1A-STAR. Questo risultato dimostra che è sufficiente fondere il dominio STAR a una RbcS, anche appartenente a un altro organismo, per indurre la condensazione della Rubisco.

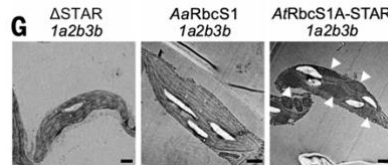


Fig. 19. Immagini TEM di cloroplasti di *Arabidopsis* 1a2b3b, trasformati con: Δ STAR, AaRbcS1 e AtRbcS1A-STAR.

Per confermare che anche *in planta* la formazione dei condensati è mediata dai coiled-coil di m2 e m3, sono state analizzate diverse varianti troncate di RbcS-STAR nel mutante 1a3b di *Arabidopsis* (Fig.20).

È stato osservato che la rimozione alternativa di m2 (Δ m2) o m3 (Δ m3) risulta in una formazione di condensati ma di natura più liquida, suggerendo un effetto cumulativo dei due motivi sulle proprietà fisiche del condensato. La rimozione della regione non strutturata (Δ unstructured) riduce la proporzione di Rubisco condensata. La rimozione combinata della regione non strutturata e m3 (Δ unstructured Δ m3) oppure di m2 e m3 (Δ m2 Δ m3) abolisce la formazione di condensati, producendo un segnale fluorescente diffuso nello stroma.

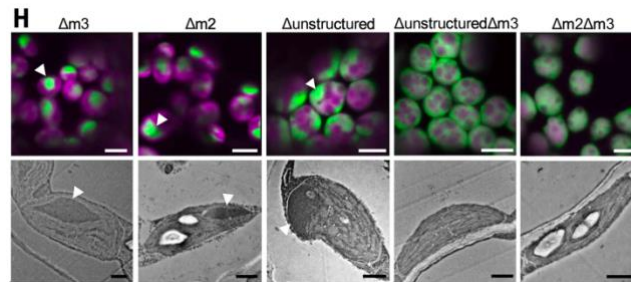


Fig. 20. Immagini di microscopio confocale (sopra) e TEM (sotto) di cloroplasti di *Arabidopsis* 1a3b esprimenti le varianti troncate di RbcS-STAR.

Questi risultati confermano che la condensazione di Rubisco *in planta* dipende dalle interazioni tra i domini coiled-coil di m2 e m3, mentre la regione non strutturata ricopre probabilmente il ruolo di *spacer* flessibile che allontana i motivi coiled-coil da Rubisco per ridurre l'ingombro sterico e favorire le interazioni STAR-STAR tra gli oloenzimi in prossimità.

4. CONCLUSIONI

Questi risultati sono di particolare interesse perché rappresentano una nuova direzione per lo studio della formazione del pirenoide. Gli studi precedenti si concentravano su EPYC1, la proteina linker che induce la condensazione di Rubisco nell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, il cui limite principale risiedeva nella scarsa applicabilità a organismi eterologhi: EPYC1 interagisce con le α -eliche esposte sulla superficie di RbcS di *C. reinhardtii* e la sostituzione di queste con le α -eliche di piante terrestri compromette l'interazione, impedendo la formazione del pirenoide. Al contrario, questo studio ha dimostrato che la formazione del pirenoide in *Anthoceros agrestis* è sostenuta da una proteina con caratteristiche diverse: RbcS-STAR è un linker innato, integrato nell'oloenzima Rubisco come subunità piccola funzionale e capace di auto-oligomerizzare attraverso i domini coiled-coil. In questo caso, il meccanismo non richiede l'interazione di proteine specifiche dell'organismo di origine poiché STAR risulta funzionale anche se fusa alla RbcS di altri organismi. Questa sua caratteristica di modularità rappresenta un grande vantaggio rispetto ai linker algali noti come EPYC1.

Un limite dello studio è rappresentato dal fatto che esso dimostra la sufficienza di RbcS-STAR per la formazione di condensati, ma non la sua indispensabilità per la formazione del pirenoide nativo in *A. agrestis*. Sarà necessario compiere ulteriori esperimenti di *knockout* per dimostrare l'essenzialità di RbcS-STAR.

È importante, inoltre, ricordare che il pirenoide è il risultato di episodi di evoluzione convergente, per questo rimangono aperte molte possibilità di studio riguardo il funzionamento di meccanismi analoghi in altri organismi.

Dal punto di vista applicativo, i risultati ottenuti e la vicinanza evolutiva delle Antocerote alle piante vascolari aprono prospettive sempre più concrete per l'ingegnerizzazione di un meccanismo di condensazione della CO₂ nelle piante coltivate che migliori significativamente l'efficienza della fotosintesi.

5. BIBLIOGRAFIA

- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., Bachmann, M. (2012). Native Polyacrylamide Gels. In: Kurien, B., Scofield, R. (eds) Protein Electrophoresis. Methods in Molecular Biology, vol 869. Humana Press, Totowa, NJ.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_5
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., & Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 16(9), 1055–1069.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(76\)85755-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85755-4)
- Frangedakis, E., Shimamura, M., Villarreal, J. C., Li, F., Tomaselli, M., Waller, M., Sakakibara, K., Renzaglia, K. S., & Szövényi, P. (2021). The hornworts: Morphology, evolution and development. *New Phytologist*, 229(2), 735–754.
<https://doi.org/10.1111/nph.16874>
- He, S., Crans, V. L., & Jonikas, M. C. (2023). The pyrenoid: The eukaryotic CO₂-concentrating organelle. *The Plant Cell*, 35(9), 3236–3259.
<https://doi.org/10.1093/plcell/koad157>
- Li, F.-W., Villarreal, J. C., & Szövényi, P. (2017). Hornworts: An Overlooked Window into Carbon-Concentrating Mechanisms. *Trends in Plant Science*, 22(4), 275–277.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.02.002>
- PORATH, J., & FLODIN, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 183(4676), 1657–1659.
<https://doi.org/10.1038/1831657a0>
- Rappsilber, J. (2011). The beginning of a beautiful friendship: Cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *Journal of Structural Biology*, 173(3), 530–540.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.10.014>
- Rascio N. (2021). *Elementi di Fisiologia Vegetale*. EdiSES.

PHOTOSYNTHESIS

An unconventional Rubisco small subunit underpins the CO₂-concentrating organelle in land plants

Tanner A. Robison^{1,2†}, Yuwei Mao^{3,4†}, Zhen Guo Oh^{2†*}, Warren S. L. Ang^{1†}, Dan Hong Loh², Yu-Heng Hsieh^{1,5}, Maddie Ceminsky⁵, Nicky Atkinson^{3,4}, Declan Lafferty¹, Xia Xu¹, Laura H. Gunn^{2*}, Alistair J. McCormick^{3,4*}, Fay-Wei Li^{1,2*}

In many algae, photosynthesis is boosted by biophysical CO₂-concentrating mechanisms, which pack the CO₂-fixing enzyme Rubisco into liquid-like organelles called pyrenoids. Engineering C₃ crops with algal pyrenoids could increase yields, but progress is hampered by the deep evolutionary divide between crops and algae. Here, we show that hornworts, the only land plants with pyrenoids, have an unusual Rubisco small subunit, RbcS-STAR, the C-terminal coiled-coil domain of which oligomerizes to mediate Rubisco condensation. RbcS-STAR is incorporated into the Rubisco holoenzyme and thus acts as an “innate” Rubisco linker. Expression of RbcS-STAR in pyrenoid-lacking species, including *Arabidopsis*, is sufficient to induce pyrenoid-like condensates. Our findings reveal a mechanism for Rubisco condensation and a potential route to introduce pyrenoids into crop plants.

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) catalyzes CO₂ fixation, but it also reacts with O₂, resulting in energetically wasteful photorespiration. Many algae limit photorespiration by using CO₂-concentrating mechanisms that enrich CO₂ around Rubisco to favor carboxylation (1). To achieve this, Rubisco, which is typically diffuse throughout the chloroplast stroma, is condensed into microcompartments called pyrenoids. Within pyrenoids, CO₂ concentrations can be elevated 40-fold over ambient levels (2). Determining the molecular basis of pyrenoid formation and CO₂ delivery has garnered increasing interest because their introduction to crop plants is predicted to increase CO₂ fixation as well as nitrogen and water use efficiency (3, 4).

In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, Rubisco condensation is induced by a repeat-rich, intrinsically disordered linker protein, EPYC1 (5, 6). In multiple algal lineages spanning >1 billion years of evolution, Rubisco condensation is achieved by biochemically similar but evolutionarily distinct linker proteins (7–9), implying a unifying principle governing the repeated evolution of pyrenoids. The translational value of the Rubisco linkers characterized thus far, however, is limited by the fact that they bind to divergent, lineage-specific locations on Rubisco. EPYC1, for example, interacts with surface-exposed α -helices on the algal Rubisco small subunit (RbcS), and substitution with land plant α -helices disrupts pyrenoid formation (10, 11). Conversely, the *Chlorella sorokiniana* linker binds to the more conserved Rubisco large subunit (RbcL), permitting Rubisco condensation across algal diversity but excluding most flowering plants (9).

Hornworts, a lineage of bryophytes, are the only land plants that have a pyrenoid-based CO₂-concentrating mechanism (pCCM) (12–14), and this closer phylogenetic distance to crop plants raises the possibility that hornwort pCCMs could be more compatible with crops than those of algae. The current model for pCCM function in the hornwort *Anthoceros agrestis* bears some resemblance to that of *Chlamydomonas*, but no canonical Rubisco linker could be identified (15), suggesting the possibility of a different mechanism to condense Rubisco. Here, we report the discovery of an “innate” Rubisco linker in *A. agrestis* composed of an unconventional RbcS isoform with an extended C terminus.

A distinctive RbcS isoform with a long C-terminal extension

Rubisco is predominantly a hexadecameric complex composed of eight RbcL and eight RbcS (L₈S₈) subunits. In Viridiplantae, RbcL is encoded in the chloroplast genome, whereas RbcS is nuclear encoded and typically has multiple gene copies (isoforms). The *A. agrestis* genome encodes five RbcS isoforms, one of which has a 102-amino acid C-terminal extension (Fig. 1A). This isoform is peculiar because the length of RbcS is otherwise highly conserved across photosynthetic organisms. The extra C-terminal structure is uncommon and could correspond to additional function. We named this C-terminal extension “STAR” (sequestration associated region), and the RbcS isoform RbcS-STAR.

Multiple lines of evidence demonstrate that RbcS-STAR is a bona fide protein. First, analysis of RNA-sequencing datasets (16) revealed that the corresponding transcript is highly abundant (31 to 33% of the total RbcS pool) with even coverage across the entire coding sequence, indicative of a well-supported gene model (fig. S1, A and B). Second, mass spectrometry data from RbcL coimmunoprecipitation (15) confirmed that RbcS-STAR was not only highly abundant (21 to 40% of the total RbcS pool), but that there was peptide coverage across the entire protein sequence including the C-terminal extension (fig. S1, A, C, and D).

STAR contains three repeating 23-amino acid motifs, m1, m2, and m3 (Fig. 1B). The sequence of m1 is less conserved than those of m2 and m3 and was predicted to lack secondary structure. Conversely, m2 and m3 were predicted to form coiled coils (Fig. 1C), having the characteristic heptad repeats and corresponding amphipathic α -helices (Fig. 1B and fig. S2, A to D). Coiled-coil domains are often involved in protein-protein interactions and are capable of mediating condensate formation (17–20).

RbcS with an extended C terminus is not restricted to *A. agrestis* and its presence appears to loosely track pyrenoid presence across hornwort species (Fig. 1D and fig. S3). For example, within *Anthoceros*, RbcS-STAR orthologs are also present in pyrenoid-containing *A. punctatus* but absent in pyrenoid-lacking *A. fusiformis* and *A. angustus*. In the more distantly related and pyrenoid-containing *Phaeoceros*, another RbcS isoform with a C-terminal extension is apparent. These isoforms were derived from independent duplication events, and no sequence similarity exists at the C-terminal extension (Fig. 1D, figs. S2E and S3, and table S1). Despite this lack of homology, the extension sequence also contains helices predicted to form coiled coils, likely representing convergent evolution (fig. S2F).

RbcS-STAR localizes to pyrenoids

To characterize RbcS-STAR in *A. agrestis*, we first examined its subcellular localization using fluorescent protein tagging. In our transient expression lines, RbcS-STAR localized to *A. agrestis* pyrenoids, together with other known pyrenoid components such as Rubisco activase (RCA) and the most abundantly expressed RbcS isoforms, RbcS1 and RbcS2 (Fig. 2, A and B, and fig. S4, A to D). RbcS-STAR also formed smaller stromal puncta (<500 nm), which were absent in other fluorescent pyrenoid markers (Fig. 2B and fig. S4, C and D), suggesting that RbcS-STAR has a propensity to self-oligomerize. In the stable RbcS-STAR-mScarlet line, similar puncta could also be observed, and

¹Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, USA. ²Plant Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY, USA. ³Institute of Molecular Plant Sciences, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK. ⁴Centre of Engineering Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK. ⁵Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca, NY, USA. *Corresponding author. Email: ohzhenguo@gmail.com (Z.G.O.); lhg42@cornell.edu (L.H.G.); alistair.mccormick@ed.ac.uk (A.J.M.); fl329@cornell.edu (F.-W.L.) †These authors contributed equally to this work.

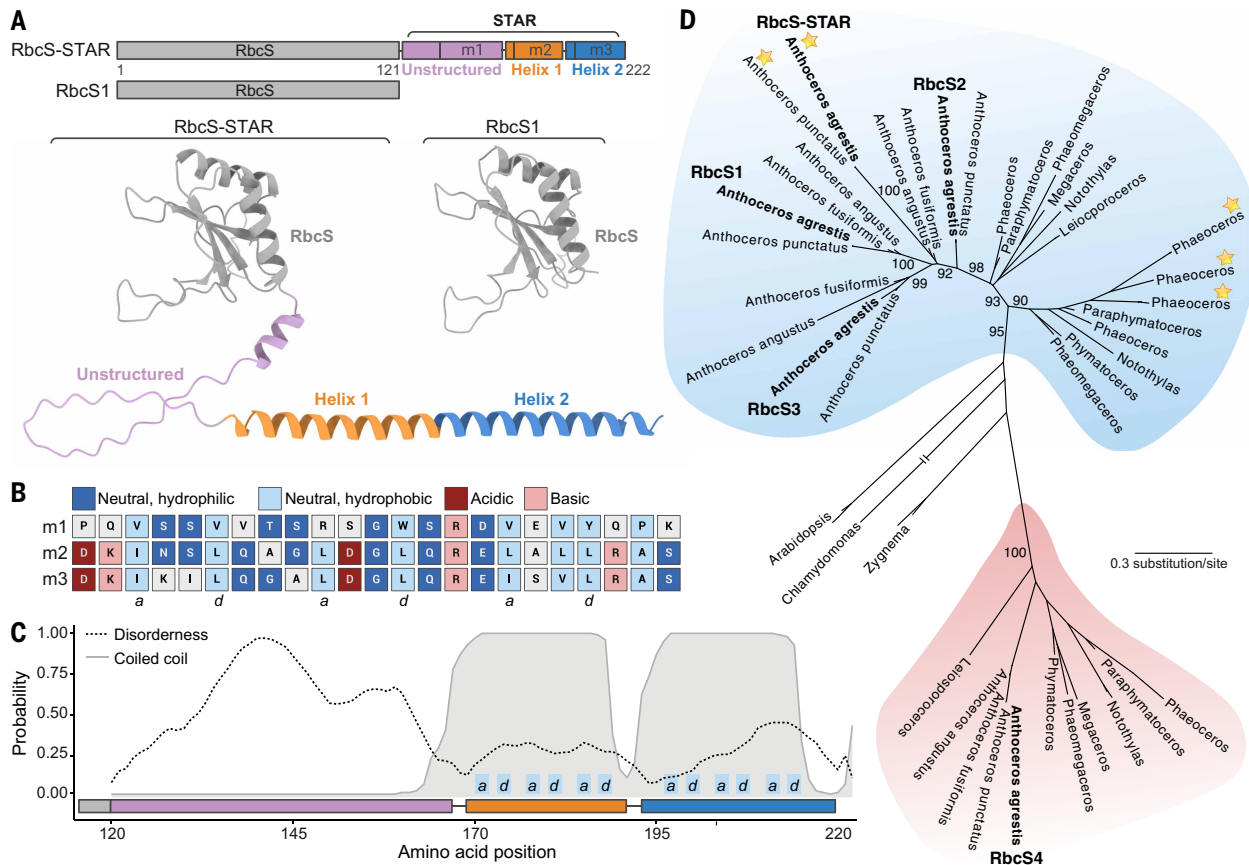


Fig. 1. A distinctive Rubisco small subunit isoform is present in *A. agrestis*. (A) Depiction of RbcS-STAR compared with the canonical RbcS (RbcS1) in *A. agrestis*. AlphaFold3 (37) structural predictions of RbcS-STAR and RbcS1 are shown below. (B) Alignment of the repetitive motifs (m1, m2, and m3) on STAR based on amino acid properties. The putative a and d registers important for coiled-coil formation are marked. (C) STAR is composed of a predicted disordered region (dashed line), followed by helices predicted to form coiled coils (gray area). The key hydrophobic a and d registers are highlighted. (D) Phylogeny of hornwort RbcS demonstrating multiple origins of isoforms with extended C terminus (marked by stars). RbcS isoforms from *A. agrestis* are shown in bold type. Bootstrap support values are shown for selected major branches.

the pyrenoids were more numerous and much smaller (fig. S4E), possibly due to overexpression. Using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assays, we found that pyrenoids in the RbcS-STAR-mScarlet stable line exhibited limited mobility, with poor recovery even after 5 min (fig. S4F).

Although the relatively immobile RbcS-STAR-mScarlet is consistent with data using a different *A. agrestis* strain (21), this finding contrasts with the high mobility of RCA-mVenus (15). To investigate this difference further, we performed FRAP assays on transiently expressed RbcS1-mVenus and observed a range of recovery dynamics from rapid (mobile fraction $67 \pm 9\%$) to slow ($13 \pm 3\%$) (fig. S4G). In the case of slow RbcS1-mVenus recovery, RCA-mScarlet from the same bleached regions still recovered rapidly (mobile fraction $98 \pm 5\%$; fig. S4H). These observations suggest that RCA and Rubisco are subject to different diffusional constraints within the *A. agrestis* pyrenoid matrix. Differences in protein mobility within a single biomolecular condensate has also been observed in P granules (22) and diatom pyrenoids (7).

STAR can target proteins to pyrenoids

To determine whether STAR alone displays any affinity for pyrenoids, we cotransformed STAR-mVenus and RCA-mScarlet (a pyrenoid marker) in *A. agrestis*. We found that the two proteins colocalized, suggesting an interaction between STAR and pyrenoid components (Fig. 2C and fig. S5A). STAR-mVenus also formed additional puncta that were depleted of RCA-mScarlet, further demonstrating STAR's

self-oligomerizing properties (Fig. 2C and fig. S5A). To rule out the influence of mVenus, we fused a chloroplast transit peptide to mVenus and observed dispersed stromal localization (fig. S5B).

Next we tested whether m2 and m3 (Fig. 1A) are implicated in pyrenoid affinity by truncating m2 (STAR Δ m2), m3 (STAR Δ m3), or both motifs (STAR Δ m2 Δ m3). Removing either m2 or m3 did not perturb pyrenoid localization (Fig. 2, D and E, and fig. S5C), and additional puncta could still be observed. Conversely, eliminating both motifs resulted in the fluorescent signals becoming significantly more dispersed throughout the stroma (Fig. 2F and fig. S5, D and E). Together, our data suggest that STAR displays strong pyrenoid affinity, likely through its repetitive m2 and m3 motifs.

RbcS-STAR can induce pyrenoid formation in a pyrenoid-lacking hornwort species

We reasoned that if RbcS-STAR is responsible for pyrenoid formation in *A. agrestis*, then expressing it heterologously in a pyrenoid-lacking plant should result in Rubisco condensation. To test this, we leveraged the closely related hornwort species *A. fusiformis*, which lacks both pyrenoids and a RbcS-STAR homolog (Fig. 1D). We first transformed *A. fusiformis* with its most abundantly expressed native RbcS (*A/RbcS1*; fig. S1D) tagged with mVenus (*A/RbcS1*-mVenus). We found that native *A. fusiformis* Rubisco was spread throughout the stroma, thus confirming that it lacks a pyrenoid (Fig. 2G). When RbcS-STAR-mScarlet was cotransformed, *A/RbcS1*-mVenus formed pyrenoid-like structures

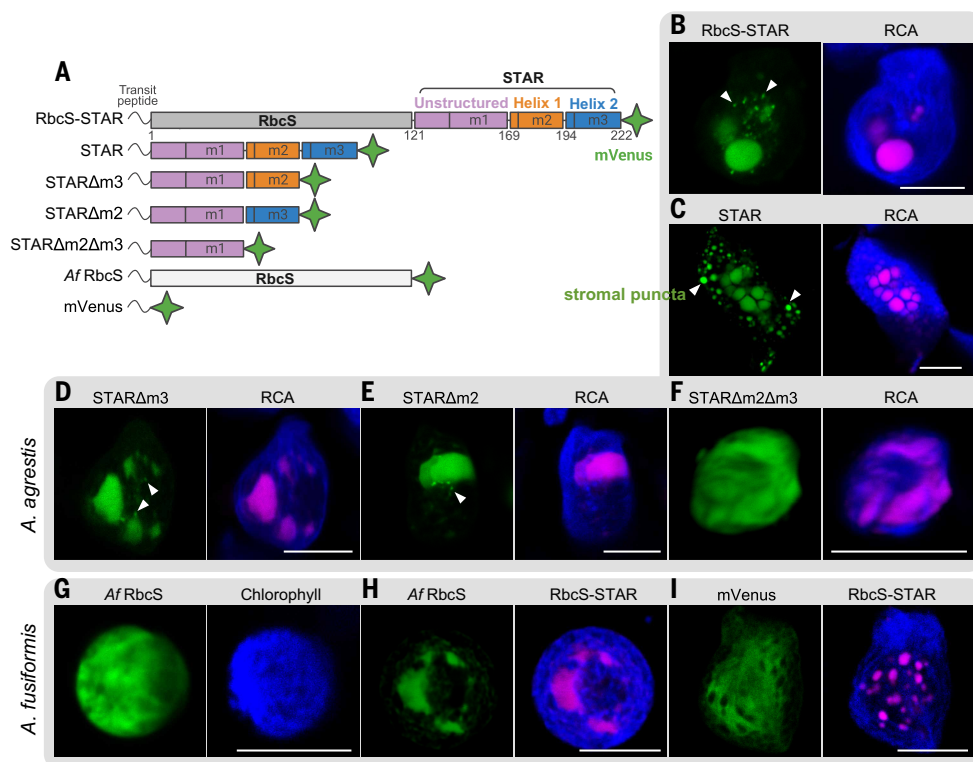


Fig. 2. RbcS-STAR induces pyrenoid formation in hornworts. (A) Schematics of the constructs for fluorescent protein tagging. (B to F) *A. agrestis* coexpressing RCA-mScarlet with RbcS-STAR-mVenus (B), STAR-mVenus (C), STARΔm3-mVenus (D), STARΔm2-mVenus (E), or STARΔm2Δm3-mVenus (F). Nonpyrenoid condensates are marked by arrowheads. (G) *A. fusiformis* expressing *A. fusiformis* RbcS1-mVenus. (H and I) *A. fusiformis* coexpressing *A. agrestis* RbcS-STAR-mScarlet with either *A. fusiformis* native RbcS-mVenus (H) or chloroplast-targeted mVenus (I). Images are shown with the mVenus fluorescence (green) channel and a merged image combining mScarlet fluorescence (magenta) and chlorophyll autofluorescence (blue). Scale bar, 10 μm.

together with RbcS-STAR (Fig. 2H and fig. S5F). We next coexpressed RbcS-STAR-mScarlet and chloroplast targeted mVenus. The RbcS-STAR condensates remained but the mVenus signal was dispersed (Fig. 2I), corroborating that the observed condensation was due to RbcS-STAR rather than interactions between fluorescent tags. These results demonstrate that RbcS-STAR is sufficient to induce Rubisco condensation in a species that lacks pyrenoids.

STAR self-oligomerizes through coiled-coil interactions

The ability of RbcS-STAR to condense Rubisco (Fig. 2H), coupled with its tendency to form nonpyrenoid condensates when transiently expressed in *A. agrestis* (Fig. 2, B to E), implies a propensity for self-oligomerization. To validate oligomerization potential, we attempted to recombinantly produce RbcS-STAR in *Escherichia coli*. *E. coli*-expressed RbcS-STAR was largely insoluble after cell lysis (fig. S6A). Although it could be solubilized in 8 M urea (fig. S6A), RbcS-STAR did not remain in solution when the urea was dialyzed out. Appending a N-terminal green fluorescent protein (GFP) to produce GFP-RbcS-STAR or GFP-STAR improved solubility (fig. S6B). Purified GFP-STAR migrates on native PAGE as a monodisperse species, whereas GFP-RbcS-STAR is polydisperse (fig. S6C). Size-exclusion chromatography analysis indicated that GFP-STAR forms a stable complex based on the unformed elution peak (Fig. 3A and fig. S7, A and B). Oligomerization was also observed when we applied bisulfosuccinimidyl suberate (BS3), an amine cross-linker, to GFP-STAR. BS3 treatment caused most GFP-STAR (39.7 kDa) to migrate between 150 and 200 kDa on sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE (confirmed by immunoblot), indicative of a

tetrameric state and consistent with the in silico coiled-coil predictions (Fig. 3B and figs. S2B and S7C). Tandem mass spectrometry on the cross-linked GFP-STAR revealed many lysine linkages between the motifs, providing additional support for the close proximity of STAR (Fig. 3C). These data suggest that STAR-STAR oligomers most likely form a stable tetramer.

We hypothesized that STAR self-oligomerizes through the coiled-coil domains of m2 and m3 (Figs. 1B and 3D and fig. S2D). To disrupt self-oligomerization, we replaced either half (6Q) or all (12Q) of the leucines and isoleucines at the *a* and *d* positions in m2 and m3 with glutamine (Fig. 3E). Our in silico analysis predicted that these mutations would abolish the coiled-coil formation while preserving the α -helical structure (fig. S8, A and B). Circular dichroism spectra of the purified proteins closely matched their predicted spectra from AlphaFold3 (fig. S8, C to F), corroborating the presence of helices. Compared with GFP-STAR, 6Q and 12Q eluted later in size-exclusion chromatography, possibly reflecting oligomeric monomers (Fig. 3A and fig. S7, A, D, and E). BS3 cross-linking of 6Q and 12Q confirmed their monomeric state (Fig. 3B and fig. S7C). Subsequent tandem mass spectrometry analysis of cross-linked 6Q revealed that most linkages observed in the coiled-coil regions of the wild-type (WT) protein were lost (Fig. 3C). Together, these results indicate that

STAR-STAR oligomerization is tetrameric and is mediated by hydrophobic interactions between the coiled-coil domains (Fig. 3F).

No evidence for STAR-Rubisco interaction

To test for possible interactions between STAR and the core Rubisco complex, we first conducted a gel-shift assay on GFP-STAR and *Aa*Rubisco, together with an aggressive cross-linker, glutaraldehyde. Here, *Aa*Rubisco was recombinantly produced from *E. coli* (23, 24) using an established synthetic biology framework adapted for hornwort Rubisco expression (25) and contained only RbcS1 as the small subunit. We found no distinct high-molecular-weight band nor smear (fig. S9A), suggesting that STAR does not form complexes with *Aa*Rubisco. To rule out steric hindrance caused by the tetrameric nature of GFP-STAR, we synthesized STAR m3 peptides and analyzed binding with Rubisco using microscale thermophoresis. No interaction signal was detected at peptide concentrations of up to 3.75 mM (fig. S9B). Higher concentrations of the m3 peptide were not tested because the solution became too viscous for loading the capillaries. Our experiments thus indicated that STAR does not directly bind to *Aa*Rubisco.

RbcS-STAR is part of the Rubisco holoenzyme

To gain further structural insights of RbcS-STAR in the hexadecameric Rubisco complex, we synthesized hornwort Rubisco from *E. coli* with different combinations of small subunits and chaperones. We found that coexpressing *Aa*RbcL and RbcS-STAR was insufficient to produce soluble Rubisco assemblies (figs. S10 and S11, A and B). However,

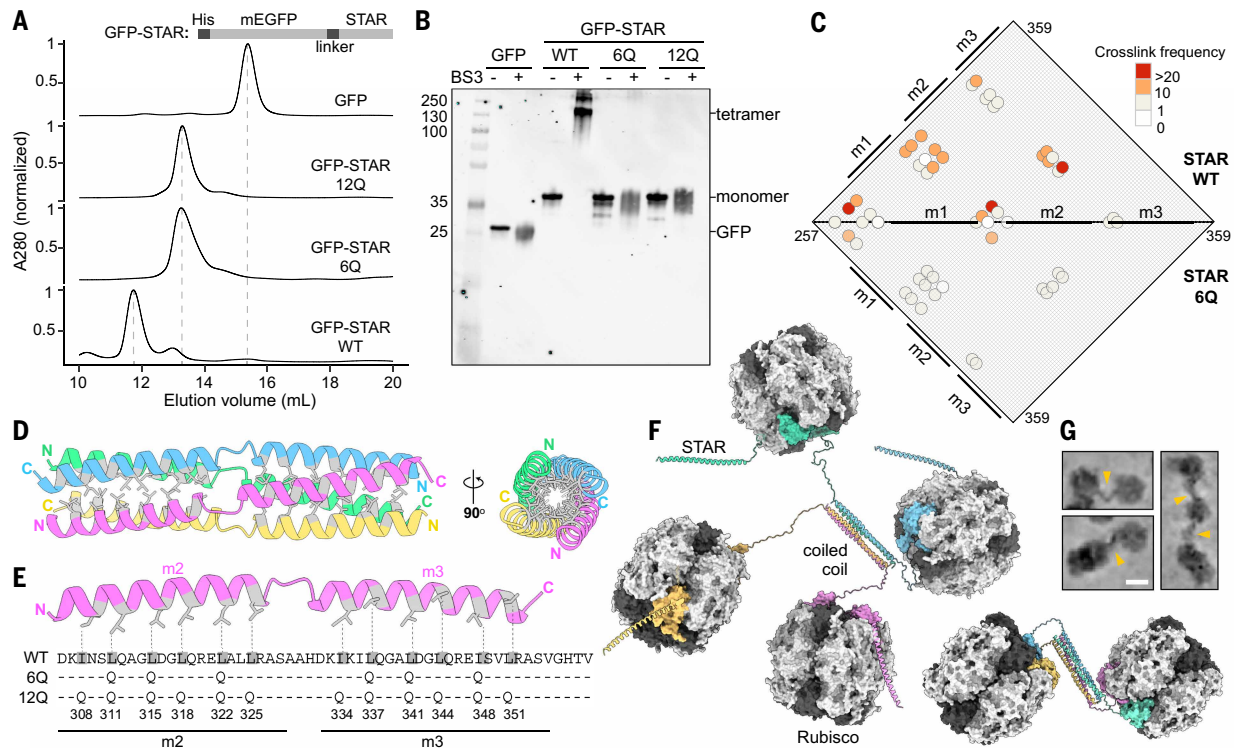


Fig. 3. STAR forms tetrameric coiled coils. (A) Size-exclusion chromatograms of WT GFP-STAR and its variants (6Q and 12Q). The construct scheme for GFP-STAR is shown at the top. (B) Anti-His SDS-PAGE Western blot of BS3-cross-linked GFP-STAR and its variants. The expected molecular weights of GFP-STAR and GFP are 39.7 and 28.6 kDa, respectively. (C) Heatmap showing cross-linked lysines (circles) and their frequency for GFP-STAR WT (top) and 6Q (bottom). Only the STAR segment (position 257 to 359) is shown. (D) Molecular scheme of STAR m2 and m3 as a tetramer formed by antiparallel coiled coils as predicted by AlphaFold3. Hydrophobic leucine and isoleucine residues participating in coiled-coil interactions are shown as gray sticks. (E) Leucines and isoleucines were replaced by glutamine (Q) in 6Q and 12Q variants to disrupt the hydrophobic core. (F) Model showing two possible ways Rubisco interacts: through either one (left) or two (bottom right) RbcS-STARs per hexadecamer participating in coiled-coil formation. Additional configurations are also feasible. Rubisco large and small subunits (RbcS1) are colored in light and dark gray, respectively. (G) Cryo-EM micrographs showing Rubisco particles linked by STAR-like threads (arrowheads). Scale bar, 100 Å.

coexpressing *AaRbcL*, *RbcS-STAR*, and *AaRbcS1* resulted in soluble Rubisco complexes that contained *RbcS-STAR* (figs. S10 and S11, C and D). These results suggested that *AaRbcS1* improved the stability and solubility of *RbcS*-heterogeneous Rubisco. Omitting the Rubisco chaperone *RbcX* during Rubisco production increased Rubisco yield (figs. S10 and S11, C and D).

Cryo-electron microscopy (cryo-EM) micrographs of Rubisco assembled with *RbcS-STAR* and *AaRbcS1* revealed both single particles and aggregated Rubisco complexes (fig. S12A). Inspection of denoised micrographs showed three distinct particle populations beyond the typical Rubisco hexadecamer: (i) head-to-head stacking (fig. S12B), (ii) particles with a protruding extension (fig. S12C), and (iii) particles linked by thread-like structures, reflecting possible STAR-STAR interactions (Fig. 3G and fig. S12D). Particle selection from these populations resulted in reconstruction of two density maps (fig. S13). The first map represents two *AaRubisco* enzymes (*RbcL₈RbcS1₈*; 3.3-Å resolution) interacting in a head-to-head configuration between *RbcS* residues N90 and K89 (figs. S12, B, E, and F, and S13), similar to Rubisco arrangements observed in carboxysomes (26–28). The second map (6.8-Å resolution) resembles a Rubisco hexadecamer with additional densities surrounding the small subunit tetrad (figs. S12, C, D, G, and H, and S13). Further refinements did not improve the map quality and resolution, likely due to the flexibility of the unstructured STAR segment (Fig. 1A). In addition, only a small subset of particles contributed to our second reconstruction (fig. S13) because most particles formed higher-order oligomeric states, resulting in aggregation that is unsuitable for single-particle reconstruction (fig. S12A).

Nonetheless, our cryo-EM data demonstrated that *RbcS-STAR* is indeed integrated and part of the Rubisco holoenzyme.

The stoichiometry of different *RbcS* isoforms in a single Rubisco holoenzyme is difficult to determine precisely and is confounded by possible heterogeneous Rubisco populations. Nonetheless, our transcriptomic and proteomic analyses on *A. agrestis* suggested a possible stoichiometric ratio favoring 8 *RbcL*: 6 *RbcS*: 2 *RbcS-STAR* (fig. S1, B to D).

RbcS-STAR is a functional RbcS and induces condensate formation in *Arabidopsis*

We next investigated the properties of *RbcS-STAR* when expressed in *Arabidopsis*. To demonstrate that *RbcS-STAR* is a functional *RbcS*, we tested whether *RbcS-STAR* could rescue the *Arabidopsis* *RbcS*-triple mutant *1a2b3b*, which has severely reduced Rubisco content (~3% of WT) and very slow growth rates (Fig. 4, A to D) (29). Expressing *RbcS-STAR* in *1a2b3b* led to significant improvements in rosette biomass accumulation, leaf area, and leaf CO₂ assimilation rates (Fig. 4, A to D, and fig. S14), indicating that *RbcS-STAR* is a functional *RbcS* and can be assembled with *Arabidopsis* *RbcL* to form a hybrid Rubisco.

Transmission electron microscopy (TEM) indicated the presence of prominent electron-dense compartments in the chloroplast stroma of *1a2b3b* plants expressing *RbcS-STAR*, which were absent in WT and *1a2b3b* plants (Fig. 4E). Immunogold labeling confirmed *RbcS-STAR* and *Arabidopsis* Rubisco enrichment within these compartments (fig. S15, A to C). Each chloroplast contained up to four compartments occupying 20 to 60% of the chloroplast area (Fig. 4E and fig. S15, D and

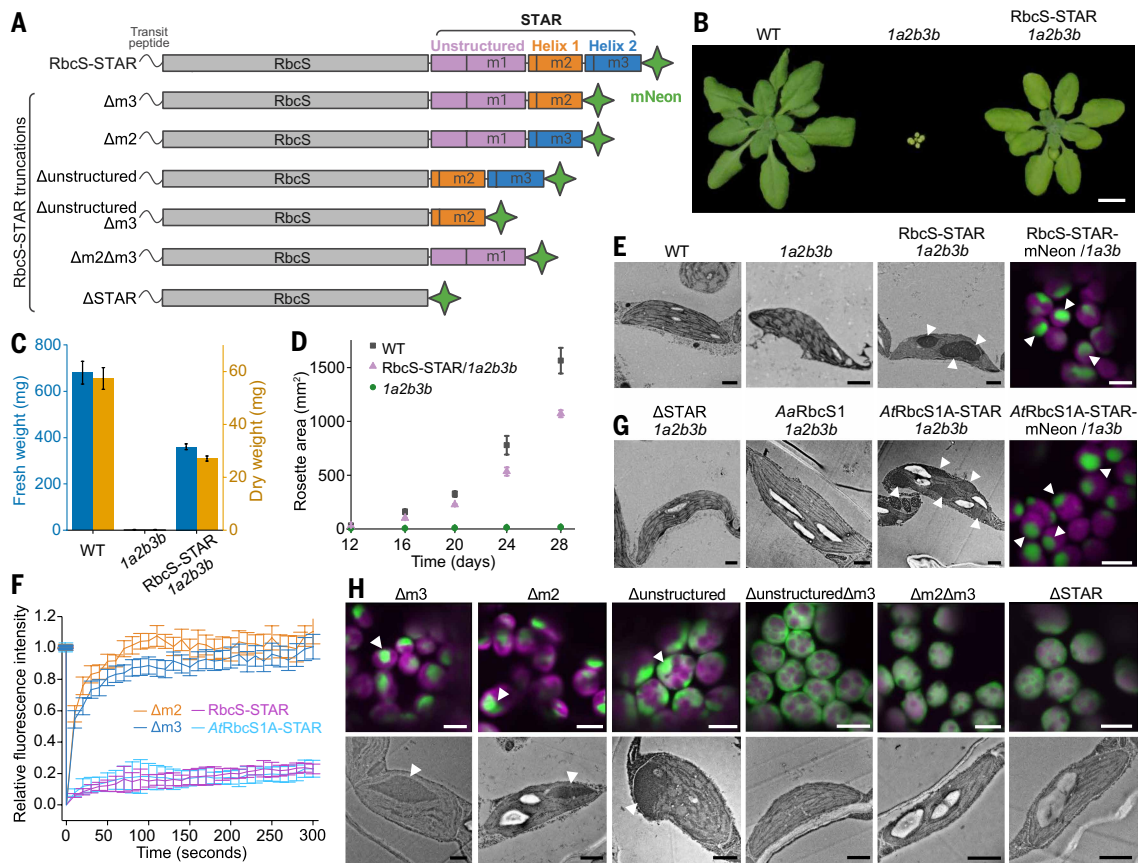


Fig. 4. Bifunctionality of RbcS-STAR as a RbcS and a driver of Rubisco condensation. (A) Schematics of the constructs used. mNeon was added for expression in the *Arabidopsis* 1a3b line. (B) Twenty-eight-day-old rosettes of WT, 1a2b3b, and RbcS-STAR/1a2b3b. (C and D) Fresh and dry weight (C) and rosette area (D) of WT, 1a2b3b, and RbcS-STAR/1a2b3b ($n = 6$). (E) TEM images comparing chloroplasts of WT, 1a2b3b, and RbcS-STAR/1a2b3b and a merged confocal image of RbcS-STAR-mNeon/1a3b. (F) FRAP of RbcS-STAR-mNeon/1a3b and AtRbcS1A-STAR-mNeon/1a3b lines ($n = 7$) and RbcS-STAR-mNeon/1a3b truncation lines Δm2 ($n = 23$) and Δm3 ($n = 34$). (G) TEM images of ΔSTAR, AaRbcS1, and AtRbcS1A-STAR complemented 1a2b3b lines and a merged confocal image of AtRbcS1A-STAR-mNeon/1a3b. (H) Confocal and TEM images of *Arabidopsis* 1a3b lines expressing different versions of RbcS-STAR-mNeon truncations. In (E), (G), and (H), example condensates are labeled with arrowheads, and merged confocal images are shown combining mNeon fluorescence (green) and chlorophyll autofluorescence (magenta). Error bars represent SD in (C) and (D) and SEM in (F). Scale bars, 1 cm in (B), (E), (G), and (H); 5 μ m for confocal images and 1 μ m for TEM images.

E). When RbcS-STAR-mNeon was expressed in the less severe RbcS-double mutant 1a3b (29) (fig. S16), fluorescent foci were also observed (Fig. 4E), which was consistent with our TEM data (Fig. 4E and fig. S15A). FRAP assays of RbcS-STAR-mNeon (in the 1a3b background) showed only 20% recovery after photobleaching (Fig. 4F), similar to what we observed in *A. agrestis* (fig. S4F).

We next sought to determine whether RbcS-STAR could induce condensates in WT plants, in which the native RbcS pool is significantly more abundant. Chloroplastic condensates similar to those in RbcS-STAR/1a2b3b plants were observed (figs. S15, D and E, and S17B). Growth and CO₂ assimilation rates were slightly reduced compared with WT plants, possibly due to condensation affecting CO₂ conductance to Rubisco active sites (fig. S17, A and C to F).

Fusing STAR to *Arabidopsis* RbcS induces Rubisco condensation

To test whether STAR or the canonical AaRbcS domain is required for Rubisco condensation in *Arabidopsis*, we transformed the 1a2b3b and 1a3b mutant plants with AaRbcS1, RbcS-STAR with STAR removed (ΔSTAR), or AtRbcS1A fused to STAR (AtRbcS1A-STAR). Transgenes were untagged under the 1a2b3b background but tagged with mNeon in 1a3b. No condensates were observed in the absence of STAR, i.e., in

ΔSTAR and AaRbcS1 lines (Fig. 4G and fig. S18). Some of these lines showed enhanced biomass, leaf area, and CO₂ assimilation rates (fig. S19), likely a result of higher RbcS and Rubisco levels (fig. S20). By contrast, condensates indistinguishable from those of RbcS-STAR were formed when STAR was fused to the native *Arabidopsis* RbcS isoform (AtRbcS1A-STAR) (Fig. 4G and figs. S15, D and E, and S18). Together, these results demonstrate that appending STAR to a RbcS is sufficient to induce Rubisco condensation.

STAR motifs drive condensation in *Arabidopsis* chloroplasts

We next sought to use the 1a3b *Arabidopsis* mutant line as a chassis to confirm whether Rubisco condensation is mediated by coiled-coil formation in planta. We found that truncating either m2 or m3 (Δm2 or Δm3) did not abolish condensate formation; instead, it resulted in condensates that were more liquid like (Fig. 4, F and H and figs. S18 and S21). This result suggested that the presence of both helices had a cumulative effect on condensate properties. When the unstructured region was removed (Δunstructured), the proportion of condensed Rubisco was reduced (Fig. 4H and figs. S18 and S21). Removing the unstructured region and m3 (ΔunstructuredΔm3) or both m2 and m3 (Δm2Δm3) abolished condensate formation in the 1a3b background, resulting in a diffuse signal across the chloroplast (Fig. 4H and figs. S18

and S21). The unstructured region thus likely acts as a flexible spacer, extending the helices further away from Rubisco to limit possible steric hindrance.

In addition to the underlying hydrophobic shielding, electrostatic interactions between helices are known to stabilize coiled coils (30). We hypothesized that disrupting such interactions in STAR (fig. S2D) might affect its ability to form condensates in *Arabidopsis*. To test this, we first generated a variant of $\Delta m3$ in which all of the positive residues of m2 were changed to alanine ($\Delta m3_mut1$; fig. S22). We predicted that this would create electrostatic repulsion and thus destabilize the coiled coils (fig. S22). Indeed, we observed complete disruption of condensates in $\Delta m3_mut1$ (figs. S18 and S21). Next, we speculated that removal of the negative residues ($\Delta m3_mut2$) would abolish the electrostatic repulsion seen in $\Delta m3_mut1$ and restore STAR-STAR oligomerization. Consistent with this prediction, condensates were again observed in $\Delta m3_mut2$ (figs. S18 and S21). Together with our *in silico* predictions and *in vitro* data, we thus demonstrated that RbcS-STAR drives Rubisco condensation through a coiled-coil interaction in planta.

Discussion

The current paradigm for pyrenoid formation is that Rubisco interacts with a separate, intrinsically disordered linker protein. However, we found no evidence for such a linker protein in *A. agrestis* (15). Instead, an innate linker, RbcS-STAR, is integrated into the Rubisco holoenzyme as a functional RbcS, and the STAR domain self-oligomerizes through coiled-coil interactions. Although RbcS-STAR is sufficient to induce Rubisco condensation in pyrenoid-lacking species, we cannot yet ascertain whether it is required for pyrenoid formation in *A. agrestis*. Future knockout-based studies are needed to establish its essentiality.

The convergent evolution of RbcS-STAR analogs in *Phaeoceros*, a different pyrenoid-bearing hornwort lineage, implies that appending an oligomerization domain to Rubisco could be another general theme for pyrenoid evolution. However, it should be noted that not all hornwort species with pyrenoids have RbcS-STAR analogs, suggesting that canonical disordered linkers (such as those found in green algae and diatoms) or entirely different mechanisms may be used to condense Rubisco in those lineages. Indeed, the ultrastructure of pyrenoids vary markedly across hornwort species (12, 31, 32).

The capacity for the STAR-STAR interaction alone to drive Rubisco condensation positions RbcS-STAR as a powerful tool for advancing efforts to enhance photosynthesis. Transplanting a pCCM into C_3 plants is predicted to increase CO_2 fixation and therefore crop yields (3, 4). Expressing the EPYC1 linker and other components from *Chlamydomonas* has successfully assembled “protopyrenoid” condensates in *Arabidopsis* (33–35). However, because EPYC1 does not natively bind to land plant Rubisco, the native RbcS gene family must be replaced with isoforms modified to carry EPYC1-binding sites, which can negatively affect Rubisco performance and plant growth. Alternatively, tagging of RbcL with a superfolder GFP was reported to result in Rubisco condensates in tobacco chloroplasts (36). However, this strategy involved the cumbersome replacement of native chloroplast-encoded RbcL, which has not yet been achieved in most crop species. In this study, the protopyrenoids could be formed by introducing RbcS-STAR through nuclear transformation into WT *Arabidopsis* plants and this does not require the modification of native Rubisco subunits. Our *Arabidopsis* transgenic lines can thus serve as an ideal chassis to introduce other components to fully functionalize pCCM (15, 34, 35). Our work shows that RbcS-STAR circumvents the incompatibility issue of existing Rubisco linkers, opening a new door toward engineering pCCM.

REFERENCES AND NOTES

1. L. Wang, M. C. Jonikas, *Curr. Biol.* **30**, R456–R458 (2020).
2. M. R. Badger, A. Kaplan, J. A. Berry, *Plant Physiol.* **66**, 407–413 (1980).

3. L. Adler *et al.*, *Plant Physiol.* **190**, 1609–1627 (2022).
4. S. P. Long *et al.*, *Cell* **188**, 6700–6719 (2025).
5. L. C. M. Mackinder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 5958–5963 (2016).
6. T. Wunder, S. L. H. Cheng, S.-K. Lai, H.-Y. Li, O. Mueller-Cajar, *Nat. Commun.* **9**, 5076 (2018).
7. Z. G. Oh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **120**, e2304833120 (2023).
8. R. Moromizato *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **121**, e2318542121 (2024).
9. J. Barrett *et al.*, *Nat. Plants* **10**, 1801–1813 (2019).
10. M. T. Meyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 19474–19479 (2012).
11. S. He *et al.*, *Nat. Plants* **6**, 1480–1490 (2020).
12. K. C. Vaughn, E. O. Campbell, J. Hasegawa, H. A. Owen, K. S. Renzaglia, *Protoplasma* **156**, 117–129 (1990).
13. E. Smith, H. Griffiths, *Planta* **200**, 203–212 (1996).
14. F.-W. Li, J. C. Villarreal, P. Szövényi, *Trends Plant Sci.* **22**, 275–277 (2017).
15. T. A. Robison *et al.*, *Nat. Plants* **11**, 63–73 (2025).
16. F.-W. Li *et al.*, *Nat. Plants* **6**, 259–272 (2020).
17. M. Ramšak *et al.*, *Nat. Commun.* **14**, 7973 (2023).
18. Z. He, J.-U. Sommer, T. S. Harmon, *ACS Macro Lett.* **14**, 413–419 (2025).
19. D. A. Ramirez, L. E. Hough, M. R. Shirts, *Biophys. J.* **123**, 703–717 (2024).
20. D. A. Ramirez, A. Shrimpton, M. R. Shirts, L. E. Hough, *Biophys. J.* **125**, 218–234 (2026).
21. S. Ruaud *et al.*, *New Phytol.* **247**, 1244–1262 (2025).
22. A. Putnam, M. Cassani, J. Smith, G. Seydoux, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 220–226 (2019).
23. R. H. Wilson, G. Thieulin-Pardo, F.-U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *FEBS Lett.* **593**, 611–621 (2019).
24. H. Aigner *et al.*, *Science* **358**, 1272–1278 (2017).
25. Z. G. Oh *et al.*, *Mol. Plant* **17**, 1833–1849 (2024).
26. W.-W. Kong *et al.*, *Structure* **32**, 1110–1120.e4 (2024).
27. T. Ni *et al.*, *Nat. Commun.* **13**, 4299 (2022).
28. L. A. Metskas *et al.*, *Nat. Commun.* **13**, 4863 (2022).
29. P. Khumsupan *et al.*, *J. Exp. Bot.* **71**, 5963–5975 (2020).
30. W. D. Kohn, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Protein Sci.* **4**, 237–250 (1995).
31. F. A. Burr, *Am. J. Bot.* **57**, 97–110 (1970).
32. K. C. Vaughn *et al.*, *New Phytol.* **120**, 169–190 (1992).
33. N. Atkinson, Y. Mao, K. X. Chan, A. J. McCormick, *Nat. Commun.* **11**, 6303 (2020).
34. J. H. Hennacy *et al.*, *Nat. Plants* **10**, 2038–2051 (2024).
35. N. Atkinson, R. Stringer, S. R. Mitchell, D. Seung, A. J. McCormick, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **121**, e2311013121 (2024).
36. T. Chen *et al.*, *Plant Biotechnol. J.* **23**, 2140–2149 (2025).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Srivastava at the Boyce Thompson Institute Plant Cell Imaging Center for technical assistance with confocal imaging using the Leica TCS SP5 laser scanning confocal microscope and A. Roeder at Cornell University for providing access to the Zeiss LSM710 and Leica Stellaris 5 confocal microscopes; C. Nicora and N. Tolic from the Environmental Molecular Sciences Laboratory at the Pacific Northwest National Laboratory for technical assistance with mass spectrometry processing; L. MacKinder and J. Barrett for discussions; and M. Silvestry-Ramos and Mark Pfeifer from the Cornell Center for Materials Research facility for providing and maintaining electron microscopes and circular dichroism spectroscopy. **Funding:** This work was supported by the National Science Foundation (grant MCB-2213841 to F.-W.L. and grant MCB-2213840 to L.H.G.); the Environmental Molecular Sciences Laboratory (F.-W.L.); the Triad Foundation (F.-W.L.); Schmittau-Novak (graduate student grant to T.A.R.); UK Research and Innovation Biotechnology and Biological Sciences Research Council (grants BB/Y000323/1 and BB/W003538/1 to A.J.M.); the Bill & Melinda Gates Foundation and United Kingdom Foreign, Commonwealth and Development Office (grant INV-054558 to A.J.M.); the Darwin Trust of Edinburgh (postgraduate studentship to Y.M.); and the Hypothesis Fund (L.H.G.). **Author contributions:** Conceived the project, wrote the manuscript with contributions and comments from all authors: T.A.R., Y.M., Z.G.O., W.S.L.A., F.-W.L., A.J.M., L.H.G.; Performed hornwort transformation: T.A.R., D.L., X.X.; Performed phylogenetics: T.A.R.; Performed *A. fusiformis* RbcL coimmunoprecipitation and confocal imaging analysis of transformed hornworts: T.A.R.; Performed *Arabidopsis* transformation, immunogold labeling, TEM, confocal imaging of transformed plants, and plant growth assays: Y.M., N.A.; Designed the RbcS-STAR antibody: Z.G.O.; Performed protein expression, purification, and interaction assays: Z.G.O., W.S.L.A., T.A.R., D.H.L., M.C.; Performed cryo-EM sample preparation, data collection, and processing: W.S.L.A.; Performed structural analysis: Z.G.O., W.S.L.A., M.C.; Performed circular dichroism spectroscopy: W.S.L.A., Z.G.O.; Performed microscale thermophoresis: W.S.L.A., Y.-H.H.; Performed cross-linking experiments: W.S.L.A.; Performed mass spectrometry on cross-linked protein samples: Y.-H.H. **Competing interests:** The authors declare no competing interests. **Data, code, and materials availability:** Cryo-EM data were deposited to the Electron Microscopy Data Bank under EMD-70517 (head-to-head structure) and EMD-70520 (low-resolution Rubisco structure). Newly generated constructs and plant lines are available upon request. **License information:** Copyright © 2026 the authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original US government works. <https://www.science.org/about/science-licenses-journal-article-reuse>

SUPPLEMENTARY MATERIALS

science.org/doi/10.1126/science.aea0150
Materials and Methods; Figs. S1 to S22; Table S1; References (37–70);
MDAR Reproducibility Checklist

Submitted 27 June 2025; accepted 9 January 2026

10.1126/science.aea0150



An unconventional Rubisco small subunit underpins the CO₂-concentrating organelle in land plants

Tanner A. Robison, Yuwei Mao, Zhen Guo Oh, Warren S. L. Ang, Dan Hong Loh, Yu-Heng Hsieh, Maddie Ceminsky, Nicky Atkinson, Declan Lafferty, Xia Xu, Laura H. Gunn, Alistair J. McCormick, and Fay-Wei Li

Science **391** (6789), . DOI: 10.1126/science.aea0150

Editor's summary

Hornworts are small land plants that sometimes contain carbon-concentrating organelles similar to those found in algae. Robison *et al.* investigated the properties of the small subunits of Rubisco, the enzyme that fixes carbon (see the Perspective by Meyer and Griffiths). They found an atypical small subunit in hornworts that self-aggregates through an extension to the C terminus. This allows the formation of the carbon-concentrating organelle without the requirement for additional linker proteins that are typically used in algal mechanisms. The hornwort enzymes were able to partially function when introduced into other land plants. Because hornworts are more closely related to flowering plants than to algae, this research offers a useful alternative for crop-engineering efforts to improve photosynthetic efficiency — Madeleine Seale

View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aea0150>

Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of service](#)

Science (ISSN 1095-9203) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2026 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works