

B3821

PhD értekezés tézisei

**A két fotokémiai rendszer arányának és a fényenergia
megoszlásának redox szabályozása metabolikus adaptáció
során zöldségben**

Kovács László



MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet

Szeged

2002

Bevezetés

A földi bioszféra működését a fotoszintézis teszi lehetővé. A légköri oxigéntermelés és a földi szervesanyag-produkció nagymértékben függ a fotoszintetikus folyamatok hatásfokától. A fotoszintézis hatékonysága két fotokémiai rendszer összehangolt működésén alapul, amelyeket egy elektrontranszportlánc köt össze a citokróm *b₆f* komplexen keresztül. A lineáris elektrontranszportlánc, amely magában foglalja az első (PS I) és második (PS II) fotokémiai rendszer komponenseit, elektronokat szállít a víztől a NADP⁺ molekulákhoz, miközben ATP és NADPH képződik. A lineáris elektrontranszport mellett létezik egy a PS I és citokróm *b₆f* komplex által katalizált ciklikus elektrontranszport is, amely redukáló erők képződése nélküli ATP-termeléshez kapcsolódik.

A fotoszintézis kvantumhatásfoka sok magasabbrendű növény és alga faj esetén, függetlenül a természetes fényviszonyoktól, megközelíti az elméleti maximumot. A fotoszintézis maximális hatásfokának biztosításához a két fotokémiai rendszer elektrontranszportjának egyensúlya szükséges. Ennek az egyensúlynak a felborulását idézhetik elő, a két fotokémiai rendszer eltérő pigmentösszetétele miatt, a fényintenzitásában és spektrális eloszlásában bekövetkező változások. Még állandó fényviszonyok mellett is az elektrontranszport egyensúlyának felborulásához vezethetnek a sejt anyagcsere folyamatainak változásai, amelyeket a környezetben előforduló tápanyagforrások és a sejt fiziológiai állapota határoznak meg. Mivel a különböző anyagcsere folyamatok az ATP-t és a NADPH-t különböző arányban igénylik, a metabolizmus megváltozása a sejt eredő NADPH/ATP követelményét is megváltoztathatja. A növényi sejt a lineáris és ciklikus elektrontranszport arányának változtatásával képes biztosítani az aktuális anyagcsere folyamatok számára szükséges ATP/NADPH arányt, ehhez azonban a két fotokémiai rendszer működésének újrahangolása szükséges. A megnövekedett ATP-igény a ciklikus fotofoszforiláció fokozódását igényli, amihez a PS I nagyobb mértékű fényelnyelése és a PS I/PS II arány megnövekedése szükséges.

A fotoszintetizáló szervezetekben az evolúció során két alapvető mechanizmus fejlődött ki, amely a két fotokémiai rendszer működésének összehangolásával maximalizálja a fotoszintetikus energiaátalakítás hatásfokát:

(1) A meglévő pigment-protein szerkezet gyors átrendezése a két fotokémiai rendszer között a fénybegyűjtő klorofill-protein komplex (LHC II) egy részének reverzibilis vándorlásával (state átmenetek) szabályozza az elnyelt fényenergia megoszlását a két

fotokémiai rendszer között. A PS II túlgerjesztése a PS I-hez viszonyítva a két fotoszisztéma közötti elektronhordozók (plasztokinon, citokróm *b₆/f* komplex) redukálódásához vezet, ami az LHC II egy perifériális részének foszforilálódását okozza. A foszforilálódott LHC II leválik a PS II-ről és a PS I-hez vándorol (state 1/state 2 átmenet). A PS I túlgerjesztődése a PS II-höz viszonyítva a fotoszisztémák közötti elektrontranszport komponensek oxidációját okozza, aminek hatására az LHC II defoszforilálódik és visszavándorol a PS II-höz (state 2/state 1 átmenet). A state átmenetek a fotoszisztémák abszorpciós hatáskeresztmetszeteinek változtatásával helyreállítják az elektrontranszport egyensúlyát a két fotokémiai rendszer között.

(2) Ha a state átmenetek nem képesek az elektrontranszport egyensúlyát biztosítani, akkor egy lassú szabályozó mechanizmus lép működésbe. Ez a mechanizmus magában foglalja a két fotokémiai rendszer arányának (PS I/PS II) változtatását a két komplexet felépítő fehérjék szintézisének és degradációjának szabályozásán keresztül. Feltételezhető, hogy a PS I/PS II arány a state átmenetekhez hasonlóan redox szabályozás alatt áll.

A szakirodalomban számos olyan adat gyűlt össze, amelyek alapján feltételezhető, hogy nemcsak a fényviszonyokban történő változások, hanem minden olyan környezeti hatás, ami megzavarja az elektrontranszport egyensúlyát a két fotokémiai rendszer között, modulálja a PS I és PS II közötti komponensek (plasztokinon/citokróm *b₆/f* komplex) redox állapotát. A feltételezések szerint a plasztokinon (PQ) vagy a citokróm *b₆/f* komplex redox állapota tölti be annak az érzékelő rendszernek a szerepét, amely elindítja azt a jelátviteli folyamatot, amely szabályozza a state átmeneteket, valamint a nukleáris és a kloroplasztisz gének expresszióját. Ez a komplex visszacsatoló mechanizmus optimalizálja a fényenergia eloszlást a két fotoszisztéma között és lehetővé teszi, a metabolikus folyamatok által megkövetelt ATP/NADPH arány kialakítását.

Célkitűzések

A *Chlamydomonas stellata* zöldalga alkalmas rendszernek bizonyult azoknak a molekuláris redox szabályozási folyamatoknak a vizsgálatára, amelyek biztosítják a metabolikus adaptáció során a két fotokémiai rendszer összehangolt működését. Autotróf nevelési körülmények között (CO₂ asszimiláció) ez az alga aktív lineáris elektrontranszportláncsal rendelkezik és CO₂-ot asszimilál a Calvin ciklusban. Mixotróf és fotoheterotróf nevelésnél, a glioxilsav-ciklus és a glükoneogenezis együtműködésével,

acetátot asszimilál szénhidrátokká. A glioxilsav-ciklus működéséhez ATP-t igényel, redukáló erőt azonban nem, ellentétben a Calvin-ciklussal, amelynek mindkét metabolitra szüksége van. Az acetát metabolizmushoz szükséges megnövekedett ATP/NADPH arány miatt feltételeztük, hogy a fotoheterotróf algában a lecsökkent NADPH fogyasztás miatt a NADPH felhalmozódik és ezáltal az elektrontranszportlánc két fotokémiai rendszer közötti szakasza tartósan redukált állapotba kerül. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy (1) a redox regulált state 1/state 2 átmenetek ill. a két fotokémiai rendszer mennyiségi arányának megváltozása szerepet játszanak-e a metabolikus adaptációban; (2) a PS I/PS II arány megváltozásában van-e hatása a fotoszintetikus elektrontranszportlánc redox állapotának a két fotokémiai rendszert felépítő fehérjék szintézisére ill. az azokat kódoló gének expressziójára; (3) mely elektrontranszportlánc komponens tehető felelőssé a redox regulált folyamatok kiváltásában; (4) a ciklikus elektrontranszport által hajtott ciklikus fotofoszforiláció résztvesz-e a sejt megnövekedett ATP/NADPH követelményének kielégítésében a metabolikus adaptáció során.

Alkalmazott módszerek

Chlamydomobrya stellata nevelési körülményei

Chlamydomobrya stellata zöldalgát $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényen, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten, pH 6,8-on tenyésztettük. Az autotróf nevelésnél a tenyészeteket 5% CO_2 -ot tartalmazó levegővel buborékolattuk. A fotomixotróf tenyészetekhez a CO_2 buborékolatás mellett 20 mM Na-acetátot adtunk. Az alga által felhasznált acetátot 30 %-os ecetsavval pótoltuk, amelyet egy automata buretta adagolt az acetát felvétellel járó pH emelkedésnek megfelelően. A fotoheterotróf alga tenyésztése a fotomixotróféval egyezett meg, azzal a különbséggel, hogy a tenyészetet CO_2 mentes levegővel buborékolattuk. A levegőt 40%-os KOH oldaton való átbuborékolatással tettük CO_2 mentessé.

A fluoreszcencia indukció és a fluoreszcencia emissziós spektrum mérése

A fluoreszcencia indukciót szobahőmérsékleten mértük PAM-101/102/103 típusú klorofil fluorométerrel (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). 2 ml, 10-20 $\mu\text{g/ml}$ klorofil koncentrációjú, közvetlenül a tenyésztő edényből kivett mintát pipettáztunk a mintatartóba. Az F_0 értéket 3 perc sötétadaptálás után, gyenge, 1,6 kHz-cel modulált vörös fényrel mértük.

Az F_{\max} értéket 0,4 s hosszú, erős, telítési fehér fényimpulzussal határoztuk meg. A Kautsky görbe felvételéhez, az F_i és F_p paraméterek meghatározásához a nevelőfényvel azonos, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aktinikus fényvel világítottuk meg a mintát 5 s hosszan az F_0 szint meghatározását követően.

A fluoreszcencia emissziós spektrumokat 77 K hőmérsékleten mértük egy házi építésű fluoriméterben. Az alga tenyészetekből azonos mennyiségű klorofillt tartalmazó térfogatokat rétegeztünk egy golyos korongra, amelyet egy dewar edény aljára helyeztünk cseppfolyós nitrogénben. A mintát egy Corning 4-96 szűrőn keresztül kék fényvel világítottuk meg és a kibocsátott fluoreszcencia fény intenzitását 600-750 nm hullámhosszak között mértük meg. Az alga fluoreszcenciáját a mintához adott, ismert mennyiségű, Rhodamin G-6 fluoreszcens festék 575 nm-es fluoreszcencia sáv intenzitására normáltuk.

Az oxigénfejlődés mérése

Az oxigénfejlődés sebességét Clark-típusú oxigén elektróddal (Hansatech, Kings Lynn, England) mértük a nevelőközegben, 10-20 μg klorofill/ml koncentrációjú intakt alga sejteken, 25 °C-ra termosztált mintatartóban, telítési fényintenzitáson fehér fényben. A PS II aktivitását 500 μM fenil-p-benzokinon jelenlétében mértük.

A termolumineszcencia mérése

A termolumineszcencia méréseket házi építésű berendezéssel végeztük. A 10 $\mu\text{g/ml}$ klorofill koncentrációjú mintákat 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű fehér fényvel világítottunk meg -80 °C hőmérsékleten a mintatartóban. Megvilágítás után a mintákat sötétben 20 °C/min sebességgel melegítettük fel +80 °C hőmérsékletre és a hőmérséklet függvényében megmértük a kibocsátott termolumineszcencia fény intenzitását.

Fényindukált citokróm f abszorpció változás mérése

3 ml 10 $\mu\text{g/ml}$ klorofill koncentrációnak megfelelő sejtuszpenziót egy xenon villanólámpából származó, 50 ms hosszú, Schott RG 645 szűrőn keresztül vezetett telítési fényfelvillanással gerjesztettünk egy 1 cm-es üvegeküvetában. A Baush & Lomb monokromátorból származó, 554 nm hullámhosszúságú mérőfényt az aktinikus gerjesztő

fényre merőlegesen vezettük a mintába, és egy végablakos, az aktinikus fénytől interferencia szűrővel védett EMI 9890B fotoelektron sokszorozóval detektáltuk. A jel/zaj arány növelésére 20, egymást 3 s sötét várakozás után követő mérést átlagoltunk.

A PS I, PS II és a citokróm b_6/f komplex spektrofotometriás meghatározása

A PS I mennyiségét a PS I klorofill a reakciócentruma, a P700 kémiailag oxidált (kálium-ferricianiddal), majd redukált (nátrium-aszkorbáttal) formái abszorpciós spektrumának különbségéből határoztuk meg ($\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A PS II reakciócentrumok mennyiségét a sejtek citokróm b_{559} tartalma alapján mértük meg, melyet a citokróm b_{559} oxidált és redukált állapotban mért spektrumainak különbségéből határoztuk meg ($\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A citokróm b_6/f komplex mennyiségét a sztöchiometriai viszonyok figyelembe vételével a kémiailag redukált és oxidált citokróm f ($\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és b_6 ($\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) különbségi spektrumaiból számoltuk.

Az ATP és NADPH mennyiségének meghatározása

A sejtek ATP tartalmát perklórsavas extrakció után luciferin/luciferáz rendszerben, Sigma ATP Bioluminescens Kit alkalmazásával, házi készítésű luminométer segítségével határoztuk meg.

A redukált NADP tartalmat az algasejtek alkalikus extraktumából ciklikus enzimreakció segítségével határoztuk meg a következő reakció elegyben: 500 μM dikloro-fenol-indofenol/ 15 mM Tris (pH 8,0)/ 3 mM glükóz-6-foszfát/ 0,5 mg/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz / 50 μM fenazin-metaszulfát. A DCPIP redukcióját a 600 nm-en bekövetkező abszorpció változás mérésével követtük nyomon.

Fényindukált P700 abszorpció változás mérése

A P700 redox állapotát a 820 nm-en mérhető abszorpció változás mérésével követtük nyomon az erre a célra kifejlesztett ED-820T emitter-detektor egységgel kiegészített PAM 101 klorofill fluorométerben (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). A méréshez az algatenyészetekből 2 cm átmérőjű szűrőpapírra, azonos klorofill mennyiséget tartalmazó

mintákat rétegeztünk, és azt illesztettük az emitter-detektor egység fényvezetőjének végéhez. A P700-at telítési fehér fényvel oxidáltuk, majd a megvilágítást lekapcsolva ms-os időfelbontásban mértük a P700 sötét redukcióját. A P700 lineáris elektrontranszport általi redukciójának kiküszöböléséhez 10 μM DCMU-t, a ciklikus elektrontranszport gátlásához 50 μM metilvöröst adtunk.

Fehérjék immunoblott analízise

Az azonos mennyiségű klorofillt tartalmazó tilakoid membrán fehérjéket 10-18 %-os gradiens gélen választottuk el, majd kvantitatíven nitrocellulóz membránra vittük át 25 mM Tris/ 190 mM glicin (pH 8,3)/ 20 % metanol pufferben. A PsbA fehérjét *Chlamydomonas reinhardtii* PsbA fehérje ellen termeltetett ellenanyaggal, míg a PsbB és PsaA fehérjéket *P. cruentum* PsbB és PsaA fehérjei ellen termelt ellenanyaggal jelöltük. A megfelelő fehérjéhez kötődött elsődleges antitesteket torna-peroxidázzal konjugált, kecske IgG (H+L) anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal jelöltük meg. A jelölt fehérjéket H_2O_2 jelenlétében fényérzékeny színreakcióval tettük láthatóvá. A fehérjék mennyiségét Bio-Rad denzitométerrel határoztuk meg.

A psbA és psaA mRNS-ek mennyiségének meghatározása

Az autotróf és heterotróf körülmények között nevelt algák össz RNS izolátumából S1 nukleáz analízissel határoztuk meg a *psbA* és *psaA* mRNS tartalmat. DNS próbaként *Chlamydomonas reinhardtii* *psbA* és *psaA* géneire specifikus, 70 bázispár (64 homológ és 6 nem homológ) hosszúságú oligonukleotidokat használtunk.

Eredmények és következtetések

1. Megállapítottuk, hogy a *Chlamydomonas reinhardtii* zöld algában a CO_2 fixációról az acetát metabolizmusra való áttérés következtében a sejtek ATP szintje gyorsan lecsökken a NADPH tartalom egyidejű növekedésével együtt. A glioxilsav-ciklus által előidézett ATP hiány, a Calvin-ciklus gátlása révén a PS I akceptor oldalán termelődő NADPH felhalmozódásához vezet. A NADPH koncentrációjának növekedése a PQ ill. a citokróm *b₆f* komplex redukcióját okozza a ferredoxin-plasztokinon oxidoreduktáz és/vagy a

tilakoid membránban található NADPH dehidrogenáz segítségével. Mivel a ftoheterotróf körülmények között kialakuló redukció gátolja az elektrontranszportot mind a PS I akceptor oldalán, mind a PS I és PS II között, a PS II által katalizált elektron transzport szintén résztvesz az intermedier elektrontranszport komponensek redukciójában. A NADPH akkumuláció és a lineáris elektrontranszport együttesen a két fotokémiai rendszer között elhelyezkedő elektrontranszport komponensek fokozott mértékű redukcióját idézik elő, amit a fluoreszcencia indukció F_i és F_o paramétereinek növekedése, a B TL-sáv eltűnése és a Q TL-sáv megjelenése ill. az oxigéntermelő képesség csökkenése mutat.

A ftoheterotróf körülmények között az intermedier elektrontranszport komponensekhez irányuló elektron beáramlást a megvilágítás hatására oxidálódó citokróm f sötét redukciójának felgyorsult kinetikája bizonyítja. Mivel az acetát metabolizmus citokróm f redukcióját gyorsító hatása a PQ és citokróm b_6/f komplex közötti elektrontranszportot gátló DBMIB jelenlétében nem, de a Q_B és Q_A között gátló DCMU jelenlétében megfigyelhető, megállapíthatjuk, hogy a külső forrásból származó elektronok a PQ közvetítésével jutnak a citokróm b_6/f komplexhez.

2. A két fotokémiai rendszer közötti elektrontranszportlánc komponensek (plasztokinin, citokróm b_6/f komplex) redukciója state 1/state 2 átmenetet indukál, amely a fluoreszcencia indukció maximális fluoreszcencia (F_m) értékének csökkenésében ill. a 77 K-en mért fluoreszcencia emissziós spektrumoknak a PS II-höz rendelt sávjainak gyors kioltódásában nyilvánul meg. Az autotróf-fotoheterotróf átmenet alatt megfigyelhető, a state 1/state 2 átmenetekre is jellemző, LHC II foszforiláció.
3. A fotoszintetikus elektrontranszportot gátló DBMIB és DCMU csökkentik az acetát metabolizmusnak mind a szobahőmérsékletű fluoreszcencia indukcióra, mind a 77 K-en mért fluoreszcencia emisszióra gyakorolt hatását és csökkentik a state 1/state 2 átmenet mértékét, bizonyítva, hogy a két fotokémiai rendszer között elhelyezkedő elektrontranszportlánc komponensek redox állapota a meghatározó az acetát metabolizmus által indukált state 1/state 2 átmenetben. Mivel mindkét inhibitor azonos módon, gátlólag hat a state 1/state 2 átmenetre, arra következtethetünk, hogy a gyors adaptációban szerepet játszó redox komponens a DBMIB hatóhelyénél (a citokróm b_6/f komplex Q_o kötőhelye) vagy a mögött helyezkedik el.

4. A fotoszintetikus rendszer adaptációja az acetát metabolizmushoz hosszútávú változásokban is megnyilvánul. 12 órás ftoheterotróf nevelés alatt a 77 K-es PS II fluoreszcencia emissziós sávok a state 1/state 2 átmenet kinetikájához viszonyítva lassú sebességgel, fokozatosan az eredeti érték 20 %-ra csökkennek, és ezzel egyidejűleg a PS I-hez tartozó sáv kb. 1,4 szerez növekedést mutat. Ezzel párhuzamosan a citokróm *b₅₅₉* és P700 koncentrációjának spektroszkópiás meghatározásából számolt PS II reakciócentrum mennyiség is lecsökken, ill a PS I reakciócentrumok száma kismértékben megnövekszik, ami a PS I/PS II arány jelentős mértékű növekedéséhez vezet. A PS I/PS II arány növekedése elsősorban a PS II mennyiségének csökkenéséből adódik, és a PS I növekedése csak kis mértékben járul hozzá. A fotokémiai rendszerek arányának változása tükröződik az azokat felépítő fehérjék mennyiségének változásában is. A ftoheterotróf nevelés, amely az intermedier elektrontranszportlánc komponensek redukcióját okozza, hosszú távon drasztikusan csökkenti a PsaA és PsaB PS II fehérjék mennyiségét ill. csekély mértékben növeli a PsaA PS I reakciócentrum fehérje mennyiségét.
5. Megvizsgáltuk az acetát metabolizmus *psbA* és *psaA* reakciócentrum fehérje gének expressziójára gyakorolt hatását. A ftoheterotróf körülmények hosszútávon reverzibilisen csökkentik a *psbA* transzkript mennyiségét kb. az eredeti érték 25 %-ára, míg a *psaA* mennyisége kis mértékben emelkedik. Meghatároztuk a *psbA* mRNS élettartamát transzkripció gátlók jelenlétében, mind autotróf mind heterotróf körülmények között nevelt algákban és megállapítottuk hogy a *psbA* transzkript felezési ideje mindkét algában azonos. A *psbA* transzkript mennyiségének csökkenése valószínűleg a transzkripció sebességének csökkenéséből adódik és nem a mRNS stabilitásának csökkenéséből.
6. Az elektrontranszportlánc redox állapota és a *psbA* és *psaA* gének transzkripció sebességének változása közötti kapcsolatot DCMU és DBMIB elektrontranszport gátlók alkalmazásával vizsgáltuk. DCMU jelenlétében a *psaA* mRNS mennyiségének növekedése és a *psbA* mRNS szintjének csökkenése kisebb mértékű, mint csak acetát hatására. DBMIB jelenlétében az acetátnak a transzkript szintekre gyakorolt hatása csaknem teljesen elmarad. A DBMIB hatása a génexpresszióra és a fehérje szintézisre arra utal, hogy a state átmenetekkel megegyezően a *psbA* és a *psaA* gének expressziója redox kontroll alatt áll és az elsődleges redox szenzor a jelátviteli láncban a citokróm *b_{6/f}*

komplex. A citokróm *b₆f* komplex redukciója (acetát jelenlétében) a *psbA* transzkripcióját gátolja, a komplex oxidációja (DBMIB jelenlétében) a *psbA* transzkripcióját gyorsítja.

7. Megvizsgáltuk a PS I által katalizált ciklikus elektrontranszport acetát metabolizmusban betöltött szerepét. A *Chlamydomonas stellata* az acetátot a glioxilsav-cikluson keresztül asszimilálja, ami fokozott ATP felhasználást jelent a redukáló erők termelésének igénye nélkül. Ilyen körülmények között a ciklikus fotofoszforiláció, amely lehetővé teszi az ATP termelést NADPH előállítás nélkül is, kedvezőbb a sejt számára. A lineáris és ciklikus elektrontranszport versengenek a PQ molekulákért, ezért a PQ PS II általi fotoredukciója (az acetát metabolizmus következtében kialakuló elektronbeáramlással együtt) megbontja a két fotokémiai rendszer egyensúlyát. A redukcióra adott gyors válaszként kialakuló és az LHC II foszforilációjával együttjáró state 1/state 2 átmenet csökkenti a PS II látszólagos abszorpció hatáskeresztmetszetét ill. hosszabb távon, a PS II gének expressziójának gátlása a feleslegessé váló PS II mennyiségét csökkenti. Ezzel párhuzamosan az első fotokémiai rendszer számának és antennaméretének kismértékű növekedése az elnyelt fényenergiából való nagyobb arányú részesedését eredményezi. Mindezek a változások lehetővé teszik a ciklikus elektrontranszport kialakulását. A fotoheterotróf algában a ciklikus elektrontranszport sebességének növekedését mutatja a megvilágítás hatására oxidálódó P700 DCMU jelenlétében mért és MV-nel gátolható sötét redukciójának felgyorsult kinetikája. A fokozott ciklikus elektrontranszport megnöveli a ciklikus fotofoszforiláció kapacitását, amit a lineáris fotofoszforilációt gátló DCMU, ill. az oxidatív fotofoszforilációt gátló KCN jelenlétében mérhető ATP képződés sebességének megnövekedése bizonyít.

Tudományos közlemények

(A tézisek alapját képező közleményeket * jelöli)

1. Demeter, S., Goussias, Ch., Bernát, G., Kovács, L. & Petrouleas, V. (1993) Participation of the $g = 1.9$ and $g = 1.82$ EPR forms of the semiquinone-iron complex, $Q_A^{\cdot-}Fe^{2+}$ of photosystem II in the generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively. *FEBS Lett.* 336, 352-356

2. Hedge, U., Padhye, S., Kovács, L., Vozár, A. & Demeter, S. (1993) Modification of histidine residues of photosystem II by diethyl-pyrocabonate inhibits the electron transfer between the primary (Q_A) and secondary (Q_B) quinone acceptors. *Z. Naturforsch.* 48c, 896-902
3. Demeter, S., Janda, T., Kovács, L., Mende, D. & Wiessner, W. (1995) Effects of in vivo CO₂-depletion on electron transport and photoinhibition in the green algae, *Chlamydomobrya stellata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 166-171
4. Demeter, S., Janda, T. & Kovács, L. (1995) Photoinhibition in CO₂-depleted green algae, *Chlamydomobrya stellata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Phytopath. Hung.* 30, 71-80
5. Demeter, S., Nugent, J. H. A., Kovács, L., Bernát, G. & Evans, M. C. W. (1995) Comparative EPR and thermoluminescence study of anoxic photoinhibition in Photosystem II particles. *Photosynth. Res.* 46, 213-218
6. Kovács, L., Hedge, U., Padhye, S., Bernát, G. & Demeter, S. (1996) Effects of Potassium-(picrate)-(18-crown-6) on the Photosynthetic Electron transport. *Z. Naturforsch.* 51c, 539-547
7. Seregélyes, Cs., Mustárdy, L., Ayaydin, F., Sass, L., Kovács, L., Endre, G., Lukács, N., Kovács, I., Vass, I., Kiss, Gy. B., Horváth, G. V. & Dudits, D. (2000) Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel non-symbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. *FEBS Lett.* 482, 125-130
8. Kovács, L., Wiessner, W., Kis, M., Nagy, F., Mende, D. & Demeter, S. (2000) Short- and long-term redox regulation of photosynthetic light energy distribution and photosystem stoichiometry by acetate metabolism in the green alga, *Chlamydomobrya stellata*. *Photosynth. Res.* 65, 231-247
9. Bernát, G., Padhye, S., Barta, Cs., Kovács, L. & Demeter, S. (2001) Chemical probes for water-oxidation: Synthetic manganese complexes in photoactivation of water splitting complex and as exogenous electron donors to photosystem II. *Z. Naturforsch.* 56c, 755-766