

**Az aszkorbát (C-vitamin) bioszintézise és  
szerepei a fotoszintézisben és a zöldségek hidrogéntermelésében**

**Tóth Szilvia Zita**

SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT  
NÖVÉNYBIOLÓGIAI INTÉZET

SZEGED, 2021

## I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

### I. 1. A C-vitamin (aszorbát) antioxidáns és más élettani szerepei

Az aszorbát (Asc) az egyik legismertebb vitamin. Az emberi szervezet nem képes előállítani, ezért a növények Asc-tartalma táplálkozási szempontból igen nagy jelentőséggel bír.

Az Asc ismertsége ellenére még számos kérdés vár megválaszolásra élettani szerepeit, transzportját és metabolizmusát illetően. Növényekben és zöldségekben az Asc legismertebb szerepe a fotoszintézis során a kloroplasztiszokban és a mitokondriumokban a légzés melléktermékeként képződött reaktív oxigénformák (ROS) felhalmozódásának megakadályozása, enzimatis és nem-enzimatis mechanizmusok által (Foyer és mtsai, 2020). Emellett Asc számos reakcióban vesz részt a növényi sejtben. Működhet chaperoneként az enzimek aktív centrumában található  $\text{Fe}^{2+}$ -centrumokat stabilizálva, katalitikus szereppel bírhat, vagy szubsztrátként vehet részt a különböző enzimatis reakciókban. A 2-oxoglutarát-függő dioxigenázok (2-ODD) aktív centrumában Fe található, amelyet az Asc chaperonként stabilizál. A növényekben számos 2-ODD enzim található, amelyek részt vesznek az etilén, az abszcizinsav és a gibberellin bioszintézisében, valamint az auxin degradációjában. A 2-ODD enzimek részt vesznek különböző szekunder metabolitok, mint például az antocianinok és a glükozinolatok bioszintézisében is (Smirnov, 2018, Tóth és mtsai, 2018).

A violaxantin-deepoxidáz (VDE) a kloroplasztisz tilakoid lumenjében található enzim, amely a violaxantin zeaxantinná történő, fényfüggő átalakítását végzi (Hallin és mtsai, 2016). Magasabbrendű növényekben a VDE enzim által katalizált folyamatban az Asc redukálószerként vesz részt. A zeaxantin felhalmozódása növeli a fotoprotektív szereppel bíró hődisszipáció mértékét (nem-fotokémiai kioltás, NPQ; Holt és mtsai, 2005), valamint a zeaxanthin a ROS-ok semlegesítésében is részt vesz (Dall'Osto és mtsai, 2012). Zöldségekben az Asc szerepe az NPQ-ban nem ismert, ezért részletesen megvizsgáltuk ezt a kérdést.

A hőstressz az egyik leggyakoribb, növényeket érő stresszhatás, mely a fotoszintetikus hatékonyság jelentős csökkenését eredményezi. A vízbontó komplex (OEC) különösen érzékeny: hőstressz hatására az OEC-t stabilizáló fehérjék leválnak, majd a Mn-centrum inaktiválódik. PhD tanulmányaim során felfedeztük, hogy amennyiben az OEC inaktív, nagy mennyiségben jelen lévő, alternatív donorok szolgáltatnak elektronokat a II. fotokémiai rendszer (PSII) számára. Feltételeztük, hogy ez az alternatív elektrondonor az Asc (Tóth és mtsai, 2007). Célul tűztem ki e hipotézis és az alternatív PSII elektrontranszport élettani szerepének vizsgálatát.

### I. 2. Az aszorbát metabolizmusa magasabb rendű növényekben és zöldségekben

Az Asc bioszintézise a magasabb rendű növényekben a Smirnov-Wheeler útvonalon zajlik (Wheeler és mtsai, 1998). A folyamat során a citoplazmában a D-glükóz-6-P különböző intermediereken keresztül GDP-L-galaktózzá alakul. Ezt követi az Asc-bioszintézis első

elkötelezett lépése, amelyet a *VTC2* és *VTC5* gének által kódolt enzim, a GDP-L-galaktóz foszforiláz (GGP) katalizál. A képződött L-galaktóz 1-P ezután L-galaktózzá, majd L-galaktono-1,4-laktonná alakul a citoplazmában. Az utolsó lépés a mitokondriumban történik meg, ahol az I. mitokondriális komplexhez kapcsolódó L-galaktono-1,4-lakton-dehidrogenáz az L-galaktono-1,4-lakton Asc-tá történő oxidációját katalizálja (Wheeler és mtsai, 2015; 1. ábra).

Az Asc-bioszintézis sebességét a GDP-L-galaktóz-foszforilázt kódoló *VTC2* gén expressziós szintje nagy mértékben meghatározza, amely erősen függ a fényintenzitástól, és áttételesen a fotoszintetikus elektrontranszporttól (Kiyota és mtsai, 2006). Magasabb rendű növényekben az erős fényintenzitás (Dowdle és mtsai, 2007; Müller-Moulé és mtsai, 2003) és más stresszfaktorok hatására mintegy két-háromszorosára nő az Asc-tartalom néhány nap leforgása alatt. Magasabb rendű növényekben a *VTC2* gén expresszióját és ezáltal az Asc bioszintézist a cirkadián óra is szabályozza (Dowdle és mtsai, 2007).

Az Asc bioszintézise és szabályozása kevésbé ismert nem edényes növényekben. A zöldségek mintegy századannyi Asc-ot tartalmaznak, mint a magasabb rendű növények (Wheeler és mtsai, 2015), ezért felmerül a kérdés, hogy ezek a fajok hogyan tudnak megbirkózni a környezeti stresszhatásokkal ilyen alacsony Asc-tartalom mellett.

Az Asc mennyiségét nem csak a bioszintézise, hanem annak regenerációja is szabályozza. Az Asc különféle reakciókban monodehidroaszorbát (MDA) majd dehidroaszorbát (DHA) oxidálódik, amelyek reduktázok segítségével alakulhatnak vissza Asc-tá. Ha a DHA nem redukálódik, visszafordíthatatlan hidrolízisen megy keresztül, amelynek eredményeként az Asc mennyisége csökken. Magasabb rendű növényekben az Asc lebomlása elsősorban DHA-n keresztül történik, amelynek a végtermékei az L-treonát és az oxalát, melléktermékként pedig  $H_2O_2$  képződhet. Az Asc lebomlása sötétben fokozottabb, mint fényben, valamint az Asc lebomlása az érés során fokozódik, és a keletkezett ROS-ok hozzájárulnak a sejtfalak fellazulásához (Dumville és Fry, 2003).

### **I. 3. A magas aszorbát-koncentráció lehetséges negatív hatásai növényekben**

Sokáig úgy gondolták, hogy a ROS-ok negatívan befolyásolják a sejtek működését és a növények életképességét. Az utóbbi években paradigmaváltás történt, ugyanis egyre több eredmény igazolja, hogy a ROS-ok jelentős szerepet játszanak a környezeti akklimatizációban és az ahhoz szükséges jelátvitelben (Foyer és Noctor, 2016; Mittler, 2017).

Az Asc szabályozza a kloroplasztisban található Asc-peroxidázok-ok aktivitását, amely közvetlen hatással van a  $H_2O_2$  szintre, amely retrográd szignálként működik (Maruta és mtsai, 2016). A DHA-reduktáz túlermelletése az Asc-tartalom többszörös növekedését eredményezte, de ennek következtében a növények kevésbé alkalmazkodtak az szárazságstresszhez a csökkent  $H_2O_2$ -jelátvitel miatt (Chen és Gallie, 2004). Ebben az összefüggésben a növényi antioxidáns rendszer szerepe a ROS mennyiségének szabályozása, nem pedig annak teljes semlegesítése. Ez azt is jelentheti, hogy a növények különféle szabályozási mechanizmusokat

fejleszthettek ki az antioxidánsok túltermelésének elkerülésére, mint például az Asc által a VTC2 expressziójára és transzlációjára gyakorolt negatív visszacsatolási mechanizmust (Laing és mtsai, 2015).

Az Asc feltételezett negatív szerepeit illetően figyelembe veendő az Asc redukáló tulajdonsága. A redukánsok felhalmozódása megváltoztathatja a sejtek redox egyensúlyát, ami rendkívül fontos a redox-függő szabályozás alatt álló enzimek számára. Az Asc befolyásolhatja az OEC működését is; munkásságom egyik fontos célkitűzése volt e kérdéskör részletes vizsgálata magasabbrendű növényekben és zöldségfélékben.

## II. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### II. 1. Az aszkorbát a II. fotokémiai rendszer alternatív elektrondonora

A növények és a fotoszintetizáló mikroorganizmusok végzik a napfény energiájának átalakítását, melynek során megkötik a légköri CO<sub>2</sub>-t, O<sub>2</sub>-t termelnek, valamint cukrokat és más értékes tápanyagokat állítanak elő. Az O<sub>2</sub>-fejlődésért a PSII egyik fő komponense, az OEC a felelős, amely a kloroplasztisz tilakoid membrán lumen felőli oldalán helyezkedik el. Az OEC központja a Mn-klaszter, amelyet a lumen felőli oldalon fehérje alegységek vesznek körbe (Bricker és mtsai, 2012).

Hőstressz hatására az OEC külső fehérjéi (elsősorban a PSBO) leválnak a komplexről (Enami és mtsai, 1994), ami az OEC teljes inaktivációját eredményezheti. Hőstressz hatására a PSII akceptor oldalán zajló elektrontranszport lelassul (Ducruet és Lemoine 1985), valamint a PSII fő alegységei, a PsbA (D1) és PsbD (D2) fehérjék is degradálódhatnak (Yoshioka és mtsai, 2006).

Rövid idejű hősokk hatására az OEC-k teljes mértékben inaktiválódhatnak; ennek ellenére számottevő elektrontranszport-aktivitást figyeltünk meg a kezelt levelekben (Tóth és mtsai, 2005). Kimutattuk, hogy ilyen körülmények között a vízmolekulák helyett nagy mennyiségben jelenlévő, alternatív elektrondonorok juttatnak elektronokat a PSII-höz (Tóth és mtsai, 2007). Korábbi *in vitro* tanulmányok alapján feltételeztük, hogy az Asc a PSII alternatív elektrondonora *in vivo*. Hipotézisünk vizsgálatára hőstressznek kitett Asc-hiányos (*vtc2-1* mutáns; Conklin és mtsai, 2000) és Col-0 vad típusú *A. thaliana* növények elektrontranszport folyamatait hasonlítottunk össze.

A fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok tanulmányozására a gyors klorofill *a* fluoreszcencia indukciós görbét (OJIP) használtuk (Schansker és mtsai, 2014; Tóth és mtsai, 2020). Hőkezelés hatására az OJIP kinetika jelentősen megváltozott és markáns különbségek adódtak az Asc-hiányos és vad típusú növények között. Kidolgoztam egy dupla fényimpulzuson alapuló módszert, amellyel meghatározható az elektronátadás félideje ( $t_{1/2}$ ) az alternatív donor és a PSII között. Vad típusú *A. thaliana* növényekben a  $t_{1/2}$  kb. 25 ms-nak, míg a *vtc2-1*

mutánsban kb. 55 ms-nak adódott. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az Asc a PSII alternatív elektrondonora *in vivo*.

Következtetéseinket 820 nm-es abszorbciamérések is alátámasztották, valamint termolumineszcencia mérések segítségével megállapítottuk, hogy az Asc-tól az elektronok a PSII-höz a tirozin Z<sup>+</sup> közvetítésével jutnak el (Tóth és mtsai, 2009).

## **II.2. Az aszkorbát alternatív elektrondonorként lassítja a donor-oldali fotoinhibíciót**

A természetben a hőstressz sokszor együtt jár a fénystresszel. Ez a két stresszfaktor együttesen a PSII inaktivációját és fotooxidációját okozhatják (Abrego és mtsai, 2008). Amennyiben hőstressz által inaktiválódik az OEC, a csökkent elektronellátottság miatt erősen oxidáló komponensek halmozódnak fel (Chen és mtsai, 1995), aminek következtében a PSII reakciócentrum teljes mértékben inaktiválódhat (Blubaugh és Cheniae, 1990). Ezt a folyamatot donor oldal által indukált fotoinhibíciónak nevezzük.

Feltételeztük, hogy az Asc alternatív elektrondonorként védi a PSII reakciócentrumot azáltal, hogy megakadályozza a P680<sup>+</sup> túlzott mértékű felhalmozódását, amely oxidatív stresszhez, és végső soron a reakciócentrumok inaktivációjához vezet. Feltételezésünk bizonyítására vad típusú, Asc-deficiens mutáns (*vtc2-3*; Conklin és mtsai, 2000) és egy Asc-túltermelő *MIOX4* transzgenikus vonalat (Lorence és mtsai, 2004) használtunk.

Megállapítottuk, hogy hő- és fénykezelés hatására néhány perc alatt lelassul a Tyr<sub>Z</sub>-P680<sup>+</sup> elektrontranszfer, amit a PSII reakciócentrumok teljes inaktivációja és degradációja követ. Az inaktiválódás mértéke és sebessége Asc-függő. A hőkezelést követő helyreállítás szintén Asc-függő, bizonyítva, hogy az Asc alternatív elektrondonorként jelentős fotoprotektív szerepet tölt be (Tóth és mtsai, 2011; Tóth és mtsai, 2013).

## **II.3. Az aszkorbát hosszan tartó sötétségben inaktiválja a vízbontó komplexet**

A levelek öregedése egy kontrollált, aktív folyamat, amely transzkripció és metabolikus szabályozás révén lehetővé teszi a tartaléktápanyagok lebontását, szállítását és újrahasznosítását a magvakban és más növényi szövetekben (Liebsch és Keech, 2016). Az öregedés vizsgálatára gyakran alkalmazott kísérleti modellrendszer a növények több napig tartó sötétkezelése (Buchanan-Wollaston és mtsai, 2005). A hosszan tartó sötétségben bekövetkező élettani változások egyike a fotoszintetikus aktivitás csökkenése, amelyet valószínűleg az OEC inaktiválódása okoz (pl. Sobieszczuk-Nowicka és mtsai, 2018), majd megkezdődik a fotoszintetikus komplexek degradációja (Kunz és mtsai, 2009).

Korábbi *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy amennyiben az OEC külső fehérjéit kémiai kezelésekkel eltávolítják, az Asc redukálhatja a vízbontó komplexet (Tamura és mtsai, 1990). Arról azonban nem állt rendelkezésre információ, hogy az Asc *in vivo* is képes-e inaktiválni az OEC-t. E kérdés vizsgálatához a *vtc2-4* Asc-deficiens *A. thaliana* mutánst használtuk (Lim és mtsai, 2016), emellett a kísérletekbe bevontunk egy *psbo1*, valamint egy

*psbr* mutáns. A *psbo1* mutáns esetében jelentősen csökkent OEC aktivitást és lassabb növekedést figyeltek meg korábban (Allahverdiyeva és mtsai, 2009), míg a *psbr* mutáns hasonlóan viselkedik, mint a vad típus (Liu és mtsai, 2009).

A hosszan tartó sötétség a fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatását klorofill *a* fluoreszcencia segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alátámasztják, hogy sötétkezelés hatására az OEC jelentős mértékben inaktíválódik, akár már 24 óra alatt is. Megfigyeltük, hogy a hatás jóval kevésbé hangsúlyos a *vtc2-4* mutáns esetében a vad típushoz képest. A *psbo1* mutáns ezzel szemben igen érzékeny volt a sötétkezelésre, a *psbr* mutánsban pedig a vad típushoz hasonló mértékű változások következtek be.

Bizonyos másodlagos hatásokat kizárandó, megbizonyosodtunk róla, hogy a 24 órás sötétkezelés alatt nem csökkent a levelek klorofilltartalma, az Asc-tartalma, a különböző fotoszintetikus alegységek (beleértve az OEC külső fehérjéit) sem degradálódtak, valamint a kloroplasztiszok szerkezete is ép maradt.

Annak vizsgálatára, hogy az Asc nemcsak sötétben, hanem a PSBO hiányában normál körülmények között is képes redukálni a Mn-klasztert, kereszteztük a *psbo1* és a *vtc2-4* mutáns. A dupla homozigóta vonalak fenotípusa hasonló a *psbo1* mutánséhoz, a gyors klorofill *a* fluoreszcencia indukció mérések alapján viszont kijelenthető, hogy a dupla *psbo1 vtc2* mutáns fotoszintetikus fenotípusa mérsékeltebb a szimpla *psbo1* mutánséhoz képest.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy az Asc képes inaktíválni a vízbontó komplexet, és ennek megakadályozásában az OEC külső fehérjéinek fontos szerepe van, elsősorban a PSBO-nak. Feltételezhető, hogy sötétkezelés hatására az OEC külső fehérjék kötődése fellazul, vagy akár disszociálódnak is a PSII-ről, amely lehetővé teszi az Asc hozzáférését a Mn-klaszterhez, ezáltal annak redukációját (Podmaniczki és mtsai, 2021).

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy az Asc negatívan befolyásolhat bizonyos élettani folyamatokat, ezért állhat annak koncentrációja és lokalizációja erős szabályozás alatt a növényi sejtekben, amelyet feltétlenül figyelembe kell venni akkor, ha magas Asc-tartalmú növényfajták előállítását tűzzük ki célul.

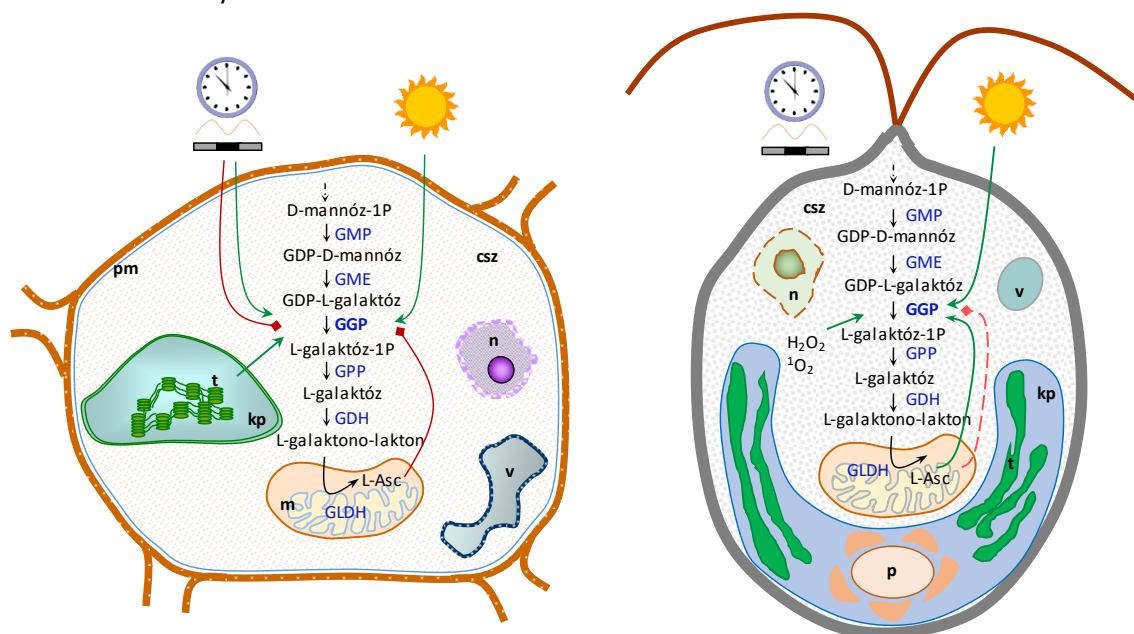
#### **II.4. Az aszkorbát bioszintézisének szabályozása zöldalgákban**

Zöldalgákban megtalálhatók a Smirnoff-Wheeler útvonal génjeinek homológjai (Urzica és mtsai, 2012), azonban működésére kísérletes bizonyíték nem állt rendelkezésre, valamint a bioszintézis szabályozásának elemei sem voltak ismertek.

A zöldalgák Asc-bioszintézisének tanulmányozására mesterséges mikroRNS (amiRNS) technikával lecsökkentettük a *VTC2* expresszióját, *Chlamydomonas reinhardtii*-t használva modellszervezetként. A *VTC2*-amiRNS vonalak fokozott stresszérzékenységet mutattak, amely lassabb növekedésben, a klorofilltartalom és a fotoszintetikus elektrontranszport csökkenésében, valamint prolin-akkumulációban nyilvánul meg.

Ezt követően megvizsgáltuk a fotoszintézis és az Asc-bioszintézis kapcsolatát. Megállapítottuk, hogy a növényekkel ellentétben a lineáris elektrontranszport zöldalgákban nem elengedhetetlen az Asc-bioszintézishez, valamint ROS-ok közvetlenül is indukálják a bioszintézist.

Megvilágítás hatására az Asc mennyisége mintegy ötszörösére növekedett két órán belül, majd sötétben az Asc mennyisége szintén mintegy két órán belül a felére csökkent. Ennek oka lehet közvetlen fény szabályozás, illetve a megvilágítás hatására képződő ROS-ok is serkenthetik az Asc bioszintézist. Növényekben az Asc bioszintézis cirkadián szabályozás alatt áll (Dowdle és mtsai, 2007). A *C. reinhardtii*-ban azonban folyamatos megvilágítás alatt periodicitás nem volt megfigyelhető, tehát zöldalgákban az Asc-bioszintézis valószínűleg nem áll cirkadián szabályozás alatt.



1. ábra. Az Asc-bioszintézis lépései és szabályozása magasabb rendű növényekben és zöldalgákban. Rövidítések: GMP: GDP-mannóz pirofoszforiláz; GME: GDP-mannóz-3',5'-epimeráz; GGP: GDP-L-galaktóz foszforiláz; GPP: L-galaktóz-1-foszfát foszfatáz; GDH: L-galaktóz dehidrogenáz; GLDH: L-galaktono-lakton dehidrogenáz; csz: citoszol; kp: kloroplasztisz; m: mitokondrium; n: nukleusz; p: pirenoid; pm: plazmamembrán; t: tilakoid; v: vakuólum (Tóth és mtsai, 2018).

Magasabb rendű növényekben az Asc negatív visszacsatolással szabályozza a *VTC2* expresszióját és a GDP-L-galaktóz foszforiláz transzlációját (Laing és mtsai, 2015). Ezzel szemben megállapítottuk, hogy *C. reinhardtii*-ban élettanilag releváns mennyiségű Asc hozzáadásával a *VTC2* expressziója jelentősen megnő és az Asc-bioszintézis fokozódik (1. ábra), amely arra enged következtetni, hogy zöldalgákban az Asc bioszintézise pozitív visszacsatolás által is szabályozódik.

Megállapítottuk tehát, hogy a zöldalgák Asc-bioszintézisének szabályozása jelentősen eltér a magasabbrendű növényekétől, ami lehetővé teszi az Asc koncentrációjának rendkívül

gyors és nagymértékű megemelkedését, amely elengedhetetlen a környezeti stresszadaptációhoz (Vidal-Meireles és mtsai, 2017).

## II.5. Az aszkorbát szerepe az algák nem-fotokémiai kioltásában

A zöldalgák VDE enzime (CrCVDE) a tilakoid membrán sztóma oldalán helyezkedik el, ellentétben a növények VDE enzimével, amely a lumenben található (Li és mtsai, 2016). A CrCVDE működéséhez szükséges kofaktort vagy reduktánst még nem azonosítottak, és nem volt ismert, hogy az Asc közvetve vagy közvetlenül befolyásolja-e a működését, illetve, általában véve a fotoprotekciós folyamatokat. E kérdések megválaszolására egy inszerciós VTC2 mutánst azonosítottunk és jellemeztünk.

Normál fényintenzitáson (kb.  $100 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a *Crvtc2-1* mutáns kb. 10%-nyi Asc-ot tartalmazott a CC-4533 vad típushoz képest, amely változatlan maradt fénystressz és  $\text{H}_2\text{O}_2$ -kezelés esetén is. A *Crvtc2-1* mutáns növekedési üteme és a fotoszintetikus apparátus összetétele nagyon hasonló volt a vad típuséhoz normál nevelési körülmények között.

Mixotróf módon, közepes fényintenzitáson ( $100 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) nevelt algakultúrák esetében intenzív megvilágítás alatt ( $530 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) az NPQ értéke jelentősen magasabb volt a *Crvtc2-1* mutánsban, mint a kontroll törzsben. A violaxantin deepoxidáció nem különbözött a kontroll törzs és a *Crvtc2-1* mutáns között, tehát az Asc-hiány nem befolyásolta a CrCVDE enzim aktivitását. Az  $530 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitáson történő megvilágítás hatására mérsékelt fotoinhibíció következett be, amely kissé erőteljesebb volt a *Crvtc2-1* mutánsban, mint a vad típusban.

Megfigyeltük, hogy  $\text{H}_2\text{O}_2$  hozzáadásával az NPQ értéke jelentősen megnőtt a vad típusban, valamint kataláz hatására lecsökkent a *Crvtc2-1* vonalban, a de-epoxidációs index pedig változatlan maradt. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az Asc-hiány hatására oxidatív stressz lép fel, amely az NPQ, azon belül is a fotoinhibíciós NPQ (qI) növekedéséhez vezetett.

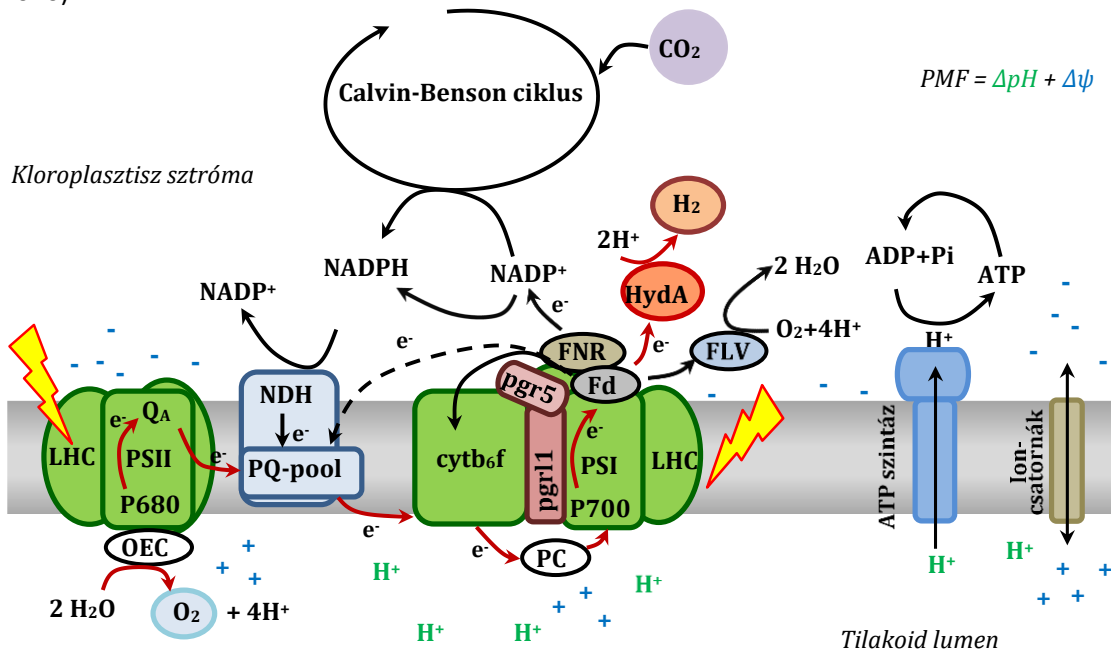
Fotoautotróf módon nevelt kultúrák esetében az energia -függő NPQ érték (qE, Peers és mtsai, 2009) megemelkedett, hasonló mértékben a vad típusú és a *Crvtc2-1* mutánsban, amely azt bizonyítja, hogy az Asc zöldalgákban nem szükséges az energiafüggő-kioltás kialakulásához sem.

Tehát az Asc fotoprotekcióban betöltött szerepeit illetően igen jelentős eltéréseket fedeztünk fel a magasabb rendű növények és a zöldalgák között. Megállapítottuk, hogy a zöldalgák esetében az Asc nem befolyásolja a violaxantin-deepoxidációt, ellenben az Asc fontos szerepet tölt be a szabadgyökök által indukált fotoinhibíciós kioltási mechanizmus (qI) mérséklésében (Vidal-Meireles és mtsai, 2020).



## II.6. Az aszkorbát hatása a zöldalgák hidrogéntermelésére

A zöldalgák a fotoszintézisükhöz kapcsolatosan, hipoxiás környezetben a sötét-fény átmenet során  $H_2$ -t termelnek az I. fotokémiai rendszer (PSI) akceptor oldalán található [Fe-Fe]-típusú HydA hidrogenáz enzimük segítségével. A folyamat élettani szerepe abban rejlik, hogy a Calvin-Benson ciklus fényben történő aktiválódásáig a  $H_2$ -termelés mintegy biztonsági szelepként védi a fotoszintetikus elektrontranszportot a túlzott gerjesztéstől (Godaux és mtsai, 2016).



**2. ábra.** A zöldalgák fotoszintetikus elektrontranszportláncja és  $H_2$ -termelése. Aerob körülmények között az elektrontranszportlánc működése a magasabbrendű növényekéhez hasonló. Hipoxiás körülmények között hidrogenázok (HydA) fejeződnek ki és a vízbontásból, valamint esetlegesen a keményítőtömbből származó elektronok a  $H_2$ -termelésre fordítódnak a Calvin-Benson ciklus aktiválódásáig. A pgr1 és a pgr5 részt vesznek a PSI ciklikus elektrontranszportban, amelyek, csakúgy, mint a flavo-diiron (FLV) komplexek, a HydA-val versengenek az elektronokért (Tóth és Yacoby, 2019). Rövidítések: cytb<sub>6</sub>/f: citokróm b<sub>6</sub>/f komplex; Fd: ferredoxin; LHC: klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexek; PC: plasztocianin; PQ: plasztokinon; PSI: I. fotokémiai rendszer; PSII: II. fotokémiai rendszer; P680: a PSII elsődleges elektrondonora; P700: a PSI elsődleges elektrondonora; Q<sub>A</sub>: a PSII elsődleges kinon akceptora.

A *C. reinhardtii* hidrogenáza a működéséhez szükséges elektronokat közvetlenül a Fd-től kapja (2. ábra; Happe és mtsai, 1994). A természetben a  $H_2$ -termelés azonban csak pár percig tart, amely a hidrogenázok  $O_2$ -érzékenységének, valamint a kompetitív folyamatok működésének köszönhető (Tóth és Yacoby, 2019). A  $H_2$ -termelés folyamatát régóta próbálják hatékonyabbá és folyamatossá tenni, annak érdekében, hogy teljes mértékben megújuló és tiszta energiaforráshoz jussunk. Megfigyelték, hogy az algakultúrákat kénmegvonásnak teszik ki, a  $H_2$ -termelés folyamata napokig tart (Melis és mtsai, 2000).

Kénmegvonás hatására a fotoszintetikus aktivitás jelentősen csökken, amely a Rubisco degradációjának, majd a különféle fotoszintetikus komplexek lebomlásának köszönhető (Zhang és mtsai, 2002). Másrészt a légzés aktív marad, amely a PSII-aktivitás csökkenésével együtt

hipoxia kialakulását eredményezi, lehetővé téve az O<sub>2</sub>-érzékeny hidrogenázok kifejeződését (Zhang és mtsai, 2002). A H<sub>2</sub>-termeléshez szükséges elektronok többnyire a fennmaradó PSII-aktivitásból származnak, de a keményítő lebomlása is jelentősen hozzájárulhat a H<sub>2</sub>-termeléshez, nemcsak reduktánsok biztosításával, hanem a hipoxia kialakulásának elősegítésével is (Chochois és mtsai, 2009). A H<sub>2</sub>-termelési periódus általában pár napig tart, majd ezt követően sejtalál következhet be (Toepel és mtsai, 2013).

A PSII-aktivitás csökkentése elengedhetetlen lépés a H<sub>2</sub>-termelés megindulásához. Az általános vélekedés szerint a fotoszintetikus aktivitás elvesztése a PsbA (D1) fehérje korlátozott turnoverének tudható be (Zhang és mtsai, 2002; Antal és mtsai, 2015). Irodalmi adatok azonban azt is valószínűsítik, hogy a PSII-aktivitás csökkenése szabályozott folyamat, valamint hogy ebben a folyamatban a szabadgyökök jelentős szerepet játszanak (González-Ballester és mtsai, 2010). Mindezek alapján célul tűztük ki e folyamat részletes megismerését.

A kísérletek során az algákat kénmentes acetát-tartalmú tápoldatban mostuk, N<sub>2</sub>-gázzal átfúvattuk őket, majd lezárt állapotban 100 μmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> megvilágításnak tettük ki. 48 óra után már jelentős mennyiségű H<sub>2</sub>-t detektáltunk, és az O<sub>2</sub> koncentrációja igen alacsony volt. Az irodalmi adatokkal összhangban, a kénmegvonás jelentős keményítő-felhalmozódást, majd annak lebomlását, valamint a sejtosztódás leállítását eredményezte (pl. Zhang és mtsai, 2002). ICP-OES mérések alapján megállapítottuk, hogy 48 órával a sejtek kénmentes tápoldatba történő áthelyezése után a sejtszámra vonatkoztatott kén tartalom mérsékelten, mindössze kb. 25% -kal csökkent.

A kénmegvonás hatására a PsbA mennyisége folyamatosan csökkent. Hasonló ütemben csökkent a PSBO mennyisége is, viszont a PSII egyik belső antennájaként szereplő fehérje, a CP43, valamint a Rubisco igen gyorsan degradálódott, míg a Cytb<sub>6</sub>f egyik alegysége, a PetB és a PSII egyik fő alegysége, a PsaA stabil maradt. Linkomicin jelenlétében, amely gátolja a kloroplasztiszban kódolt fehérjék bioszintézisét, a PsbA mennyisége gyorsabban csökkent, mint hiányában.

Megfigyeltük, hogy a kénmegvonás hatására a *VTC2* expressziója megemelkedik, ennek következtében pedig az Asc-tartalom 48 órán belül kb. 50-szeresére nőtt. Számos, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> által indukált gén expressziója megnőtt, tehát nagy valószínűséggel oxidatív stressz történik a kénmegvonás során, ami az Asc-bioszintézis indukációjához vezet.

Magasabb rendű növényekben az Asc bizonyos körülmények között inaktíválhatja az OEC-t (II.3.). *C. reinhardtii*-ban néhány mM-nyi külsőleg hozzáadott Asc hatására az OEC aktivitása erőteljesen csökkent, illetve folyamatosan csökkenés volt tapasztalható a kénmegvonás során is, tehát a zöldalgák Mn-komplexe különösen érzékenynek bizonyult az Asc redukáló hatására. Az OEC inaktivációját követően az Asc elektronokat szolgáltathat a Tyr<sup>z+</sup> számára zöldalgákban is, ez a folyamat azonban igen lassú a vízbontásból származó elektrontranszportozóhoz képest. Ennek következtében szabadgyökök keletkeznek, majd donor

oldal által indukált fotoinhibíció léphet fel, csakúgy, mint magasabb rendű növények esetében (II.2.).

Kénmegvonás hatására tehát a következő folyamatok játszódhatnak le a zöldalgákban i) az algasejtek fokozzák a kén felvételét a környezetből, ii) minimalizálják a sejtek kén tartalmának csökkenését a sejtosztódás leállításával, iii) mivel a sejtosztódás leáll, feleslegben lévő redukálóanyagok felhalmozódnak, amelyek kezdetben keményítő-bioszintézisre fordítódnak, iv) a PSII túlzott gerjesztése miatt  $^1\text{O}_2$  képződik, amely az Asc-bioszintézis fokozódásához vezet, v) A mM koncentráció-tartományban felhalmozódott Asc inaktiválja az OEC-t vi) ezáltal a PSII reakciócentrumok donor oldali fotoinhibíció által károsodnak és lebomlanak, vii) az  $\text{O}_2$ -termelés csökkenése hozzájárul a hipoxia kialakulásához, amely lehetővé teszi a HydA kifejeződését és a  $\text{H}_2$ -termelés megindulását, amely a fotoszintetikus elektrontranszport biztonsági szelepeként működik. E lépéseknek köszönhetően a kénmegvonás által okozott károsodás mérséklődik, és a sejtek helyreállhatnak, amennyiben a kén újra elérhetővé válik. Eredményeink cáfolják tehát azt a korábbi vélekedést, mely szerint a PsbA lenne a kénmegvonás elsődleges célpontja.

### III. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

\* Levelező szerzőség

Podmaniczki A, Nagy V, Vidal-Meireles A, Tóth D, Patai R, Kovács L, **Tóth SZ\*** (2021) Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. *Physiol Plantarum* 171: 232-245

IF: 4.148; Scopus - Medicine (miscellaneous): D1

Vidal-Meireles A, Tóth D, Kovács L, Neupert J, **Tóth SZ\*** (2020) Ascorbate deficiency does not limit nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 182: 597-611

IF: 6.902; Folyóirat szakterülete: Scopus - Genetics: D1

**Tóth SZ\***, Yacoby I (2019) Paradigm shift in algal  $\text{H}_2$  production: Bypassing competitive processes. *Trends Biotechnol* 37: 1159-1163

IF: 14.343; Folyóirat szakterülete: Scopus - Bioengineering: D1; Összefoglaló cikk

Nagy V, Vidal-Meireles A, Podmaniczki A, Szentmihályi K, Rákhely G, Zsigmond L, Kovács L, **Tóth SZ\*** (2018) The mechanism of photosystem II inactivation during sulphur deprivation-induced  $\text{H}_2$  production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 94: 548-561

IF: 5.726; Folyóirat szakterülete: Scopus - Genetics: D1

**Tóth SZ\***, Lőrincz T, Szarka A (2018) Concentration does matter: The beneficial and potentially harmful effects of ascorbate in humans and plants. *Antiox Redox Signal* 29: 1516-1533

IF: 5.828; Folyóirat szakterülete: Scopus - Clinical Biochemistry: D1; Összefoglaló cikk

- Vidal-Meireles A, Neupert J, Zsigmond L, Rosado-Souza L, Kovács L, Nagy V, Galambos A, Fernie AR, Bock R, **Tóth SZ\*** (2017) Regulation of ascorbate biosynthesis in green algae has evolved to enable rapid stress-induced response via the *VTC2* gene encoding GDP-I-galactose phosphorylase. *New Phytol* 214: 668-681  
IF: 7.433; Folyóirat szakterülete: Scopus - Physiology: D1
- Nagy V, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Rákhely G, Garab G, Kovács L, **Tóth SZ\*** (2016) Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H<sub>2</sub> production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ* 39: 1460-1472  
IF: 6.173; Folyóirat szakterülete: Scopus - Physiology: D1
- Fernie AR, **Tóth SZ** (2015) Identification of the elusive chloroplast ascorbate transporter extends of the substrate specificity of the PHT family. *Molecular Plant* 8: 674-676  
IF: 7.142; Folyóirat szakterülete: Scopus - Plant Science: D1; Rövid közlemény
- Tóth SZ\***, Schansker G, Garab G (2013) The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol Plantarum* 148: 161-175  
IF: 3.262; Folyóirat szakterülete: Scopus - Plant Science: D1; Összefoglaló cikk
- Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács K, Garab G, **Tóth SZ** (2012) Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Hydrogen Energy* 37: 8864-8871  
IF: 3.548; Folyóirat szakterülete: Scopus - Condensed Matter Physics: D1
- Tóth SZ\***, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiol* 156: 382-392  
IF: 6.535; Folyóirat szakterülete: Scopus – Genetics: D1
- Tóth SZ\***, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol* 149: 1568-1578  
IF: 6.235, Folyóirat szakterülete: Scopus – Genetics: D1

#### IV. IRODALOMJEGYZÉK

- Abrego D, Ulstrup KE, Willis BL, van Oppen MJH (2008) Species-specific interactions between algal endosymbionts and coral hosts define their bleaching response to heat and light stress. *Proc Biol Sci* 275: 2273-2282
- Allahverdiyeva Y, Mamedov F, Holmström M, Nurmi M, Lundin B, Styring S, Spetea C, Aro E-M (2009) Comparison of the electron transport properties of the *psbo1* and *psbo2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1230-1237
- Antal TK, Krendeleva TE, Tyystjärvi E (2015) Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. *Photosynth Res* 125: 357-381

- Blubaugh DJ, Cheniae GM (1990) Kinetics of photoinhibition in hydroxylamine-extracted photosystem II membranes: relevance to photoactivation and sites of electron donation. *Biochemistry* 29: 5109-5118
- Bricker TM, Roose JL, Fagerlund RD, Frankel LK, Eaton-Rye JJ (2012) The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1817: 121-142
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* 42: 567-585
- Chen GX, Blubaugh DJ, Homann PH, Golbeck JH, Cheniae GM (1995) Superoxide contributes to the rapid inactivation of specific secondary donors of the photosystem II reaction center during photodamage of manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry* 34: 2317-2332
- Chen Z, Gallie DR (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16: 1143-1162
- Chochois V, Dauvillée D, Beyly A, Tolleter D, Cuiñé S, Timpano H, Ball S, Cournac L, Peltier G (2009) Hydrogen production in *Chlamydomonas*: Photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiol* 151: 631-640
- Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154: 847-856
- Dall'Osto L, Holt NE, Kaligotla S, Fuciman M, Cazzaniga S, Carbonera D, Frank HA, Alric J, Bassi R (2012) Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits. *J Biol Chem* 287: 41820-41834
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnov N (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-l-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* 52: 673-689
- Ducruet JM, Lemoine Y (1985) Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol* 26: 419-429
- Dumville JC, Fry SC (2003) Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta* 217: 951-961
- Enami I, Kitamura M, Tomo T, Isokawa Y, Ohta H, Katoh S (1994) Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PSII membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or Mn? *Biochim Biophys Acta* 1186: 52-58
- Foyer CH, Noctor G (2016) Stress-triggered redox signalling: what's in pROspect? *Plant Cell Environ* 39: 951-964
- Godaux D, Bailleul B, Berne N, Cardol P (2016) Induction of photosynthetic carbon fixation in anoxia relies on hydrogenase activity and PGRL1-mediated cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 168: 648-658
- González-Ballester D, Casero D, Cokus S, Pellegrini M, Merchant SS, Grossman AR (2010) RNA-Seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. *Plant Cell* 22: 2058-2084
- Hallin EI, Hasan M, Guo K, Åkerlund H-E (2016) Molecular studies on structural changes and oligomerisation of violaxanthin de-epoxidase associated with the pH-dependent activation. *Photosynth Res* 129: 29-41
- Happe T, Mosler B, Naber JD (1994) Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 222: 769-774
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li X-P, Niyogi KK, Fleming GR (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433-436
- Kiyota M, Numayama N, Goto K (2006) Circadian rhythms of the l-ascorbic acid level in *Euglena* and spinach. *J Photochem Photobiol B Biol* 84: 197-203
- Kunz H-H, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I, Flügge U-I, Fulda M, Gierth M (2009) The ABC transporter PXA1 and peroxisomal  $\beta$ -oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. *Plant Cell* 21: 2733-274
- Laing WA, Martínez-Sánchez M, Wright MA, Bulley SM, Brewster D, Dare AP, Rassam M, Wang D, Storey R, Macknight RC, Hellens RP (2015) An upstream open reading frame is essential for feedback regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 772-786

- Li Z, Peers G, Dent RM, Bai Y, Yang SY, Apel W, Leonelli L, Niyogi KK (2016) Evolution of an atypical de-epoxidase for photoprotection in the green lineage. *Nat Plants* 2: 16140
- Liebsch D, Keech O (2016) Dark-induced leaf senescence: new insights into a complex light-dependent regulatory pathway. *New Phytol* 212: 563-570
- Lim B, Smirnoff N, Cobbett CS, Golz JF (2016) Ascorbate-deficient *vtc2* mutants in *Arabidopsis* do not exhibit decreased growth. *Front Plant Sci* 7:1025
- Liu H, Frankel LK, Bricker TM (2009) Characterization and complementation of a *psbR* mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* 489: 34-40
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004) myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol* 134: 1200-1205
- Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T (2016) Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol* 57: 1377-1386
- Melis A, Zhang LP, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 122: 127-135
- Mittler R (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci* 22: 11-19
- Müller-Moulé P (2003) Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 748-760
- Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462: 518-521
- Podmaniczki A, Nagy V, Vidal-Meireles A, Tóth D, Patai R, Kovács L, Tóth SZ (2021) Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. *Physiol Plantarum* 171: 232-245
- Schansker G, Tóth SZ, Holzwarth AR, Garab G (2014) Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the  $Q_A$  model. *Photosynth Res* 120: 43-58
- Smirnoff N (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Rad Biol Med* 122: 116-129
- Sobieszczuk-Nowicka E, Wrzesiński T, Bagniewska-Zadworna A, Kubala S, Rucińska-Sobkowiak R, Polcyn W, Misztal L, Mattoo AK (2018) Physio-genetic dissection of dark-induced leaf senescence and timing its reversal in barley. *Plant Physiol* 178: 654-671
- Tamura N, Inoue H, Inoue Y (1990) Inactivation of the water-oxidizing complex by exogenous reductants in PSII membranes depleted of extrinsic proteins. *Plant Cell Physiol* 31: 469-477
- Toepel J, Illmer-Kephalides M, Jaenicke S, Straube J, May P, Goesmann A, Kruse O (2013) New insights into *Chlamydomonas reinhardtii* hydrogen production processes by combined microarray/RNA-seq transcriptomics. *Plant Biotechnol J* 11: 717-733
- Tóth SZ, Lőrincz T, Szarka A (2018) Concentration does matter: The beneficial and potentially harmful effects of ascorbate in humans and plants. *Antioxid Redox Signal* 29: 1516-1533
- Tóth SZ, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiol* 156: 382-392
- Tóth SZ, Oukarroum A, Schansker G (2020) Probing the photosynthetic apparatus noninvasively in the laboratory of Reto Strasser in the countryside of Geneva between 2001 and 2009. *Photosynthetica* 58: 560-572
- Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol* 149: 1568-1578
- Tóth SZ, Schansker G, Garab G (2013) The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol Plantarum* 148: 161-175
- Tóth SZ, Schansker G, Garab G, Strasser RJ (2007) Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1767: 295-305
- Tóth SZ, Schansker G, Kissimon J, Kovács L, Garab G, Strasser RJ (2005) Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol* 162: 181-194
- Tóth SZ, Yacoby I (2019) Paradigm shift in algal  $H_2$  production: Bypassing competitive processes. *Trends Biotechnol* 37: 1159-1163

- Urzica EI, Adler LN, Page MD, Linster CL, Arbing MA, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, and Clarke SG (2012b) Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the *VTC2* gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase. *J Biol Chem* 287: 14234-14245
- Vidal-Meireles A, Neupert J, Zsigmond L, Rosado-Souza L, Kovács L, Nagy V, Galambos A, Fernie AR, Bock R, Tóth SZ (2017) Regulation of ascorbate biosynthesis in green algae has evolved to enable rapid stress-induced response via the *VTC2* gene encoding GDP-L-galactose phosphorylase. *New Phytol* 214: 668-681
- Vidal-Meireles A, Tóth D, Kovács L, Neupert J, Tóth SZ (2020) Ascorbate deficiency does not limit nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 182: 597-611
- Wheeler G, Ishikawa T, Pornsaksit V, Smirnov N (2015) Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Elife* 4:e06369
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnov N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393:365-369
- Yoshioka M, Uchida S, Mori H, Komayama K, Ohira S, Morita N, Nakanishi T, Yamamoto Y (2006) Quality control of photosystem II: cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *J Biol Chem* 281: 21660-21669
- Zhang L, Happe T, Melis A (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 214: 552-561