

**Photoprotektive Mechanismen der Alge *Euglena gracilis* in Abhängigkeit vom Carotinoidgehalt: Untersuchungen zur nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyll a - Fluoreszenz**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Maria Doege

geb. am: 02. Mai 1967 in Büttstedt

Gutachter:

1. Prof. K. Humbeck
2. Prof. E. Ohmann
3. Prof. Ch. Wilhelm

Halle(Saale), den 24.03.99

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Anzucht des Algenmaterials	7
2.1.1	Nährlösungen	7
2.1.2	Anzuchtbedingungen	8
2.2	Methoden	8
2.2.1	Bestimmung der Zellzahl	8
2.2.2	Lichtmessung	9
2.2.3	Chloroplastenisolierung aus <i>Euglena gracilis</i>	9
2.2.4	Belichtung von Zellen und Chloroplasten	10
2.2.5	Bestimmung der optischen Dichte von Algensuspensionen	11
2.2.6	Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung	11
2.2.7	Pigmentanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	12
2.2.8	Polarographische Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung und Atmungsaktivität intakter Zellen	13
2.2.9	Bestimmung der Aktivität von PS I und PS II in Chloroplasten von <i>Euglena gracilis</i>	13
2.2.10	Fluoreszenzuntersuchungen	14
2.2.10.1	Pulse-Amplituden-Modulations-Meßprinzip (PAM)	14
2.2.10.2	Aufnahme der Emissions- und Excitationsspektren bei 293 K und 77 K am Fluorometer	17
2.2.11	Absorptionsspektren bei Raumtemperatur	17
2.2.12	Kolorimetrische Bestimmung der Methylsulfinsäurekonzentration (Nachweis der Hydroxylradikalbildung)	18
2.2.13	Proteinbestimmung	18
2.2.14	Elektrophorese der Pigment-Proteinkomplexe	18
2.2.15	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	20
2.2.16	Selektiver Proteinnachweis durch Western-Blot-Analyse	20
2.2.17	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	21
3.	ERGEBNISSE	22
3.1	Einfluß von Licht auf photosynthetische Leistungen und Strukturen	22
3.1.1	Die Pigmentausrüstung von <i>Euglena gracilis</i> und Abhängigkeit photosynthetischer Parameter von der Lichtintensität während des mixotrophen Wachstums	22

3.1.2	Auswirkungen von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf mixotroph gewachsenen Zellen von <i>Euglena gracilis</i>	25
3.1.3	Einfluß von DTT auf qN und die Pigmente	28
3.2	Blockierung der Carotinoidbiosynthese während es mixotrophen Wachstums - Einfluß von Licht auf carotinoidverarmte Zellen	29
3.2.1	Einfluß des Carotinoidgehaltes auf strukturelle und physiologische Komponenten photosynthetischer Membranen	29
3.2.1.1	Hemmung der Carotinoidbiosynthese durch unterschiedliche Norflurazonkonzentrationen	29
3.2.1.2	Immunologische Quantifizierung von Proteinen der photosynthetischen Membran in Abhängigkeit vom Carotinoidgehalt	31
3.2.2	Die Lichtsättigungskurve carotinoidverarmter Zellen	32
3.2.3	Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Licht	33
3.2.4	Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die PS I-Aktivität	35
3.3	Carotinoide - antioxidativer Schutz vor Radikalen	36
3.4	Der nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz in <i>Euglena gracilis</i>	38
3.4.1	Der dunkelinduzierte Quench der Chlorophyllfluoreszenz in <i>Euglena gracilis</i>	38
3.4.2	Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten auf qN und das „recovery“ im Vergleich zur Dunkelinkubation bei unbehandelten Zellen von <i>Euglena gracilis</i>	40
3.4.2.1	Der Quench der Chlorophyllfluoreszenz	41
3.4.2.2	Relaxation der Fluoreszenzparameter und die HWZ des „recovery“	43
3.4.2.3	Einfluß des Phosphataseinhibitors (NaF) auf die Relaxation der Fluoreszenz	45
3.4.2.4	Einfluß von Nigericin	46
3.4.2.5	Zusammenfassende Charakterisierung des nichtphotochemischen Quench in <i>Euglena gracilis</i>	48
3.5	Untersuchungen an carotinoidverarmten Zellen von <i>Euglena gracilis</i> - Einfluß der Pigmentausstattung auf Komponenten des nichtphotochemischen Quench	49
3.5.1	Der nichtphotochemische Quench carotinoidverarmter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen von <i>Euglena gracilis</i>	49
3.5.2	Vergleich des „recovery“ carotinoidverarmter und unbehandelter Zellen	54
3.5.3	Einfluß von Nigericin auf den Quench der Chlorophyllfluoreszenz carotinoidverarmter Zellen	56

3.5.4	Der photochemische und nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz unbehandelter und carotinoidverarmerter Zellen in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität	57
3.5.5	Zusammenfassende, vergleichende Darstellung von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen	63
3.6	Analyse der Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren	67
3.6.1	Messung der Tieftemperaturspektren nach erfolgter Belichtung	67
3.6.2	Zur Rolle des PS I bzw. PS II an der Fluoreszenzemission von <i>Euglena gracilis</i> bei RT und 77 K	68
3.6.2.1	Einfluß von DCMU auf das Emissionsspektrum (Raumtemperatur) der Chlorophyllfluoreszenz	71
3.7	Isolierung und Charakterisierung der Pigment-Proteinkomplexe von <i>Euglena gracilis</i>	72
3.7.1	Isolierung und immunologische Charakterisierung einzelner Pigment-Proteinkomplexe	72
3.7.2	Absorptionsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe	73
3.7.3	Emissions- und Excitationsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe bei RT und 77 K	75
3.8	Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die Fluoreszenzemission und auf strukturelle Komponenten der photosynthetischen Membranen	80
3.8.1	Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren carotinoidverarmerter Zellen von <i>Euglena gracilis</i>	80
3.8.2	Isolierung der Pigment-Proteinkomplexe bei carotinoidverarmten Zellen- Vergleich der Apoproteine unbehandelter und carotinoidverarmerter Zellen	83
3.8.3	Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren der Pigment-Proteinkomplexe carotinoidverarmerter Zellen	84
4.	DISKUSSION	88
5.	ZUSAMMENFASSUNG	111
6.	LITERATUR	

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

$\Phi_{OX}$	Quotient: Sauerstoffentwicklungsrate/Lichtintensität
$\Phi_P$	Quantenausbeute der Photosynthese(entspricht „yield“)
$\lambda_{Em}$	Wellenlänge der gemessenen Fluoreszenzemission
$\lambda_{Peak}$	Maximum der Absorption
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AL	aktinisches Licht
ATP	Adenosintriphosphat
Car	Carotinoide
Chl	Chlorophyll
CP	Chlorophyll-Protein
D1	zentrales 32 kDa Protein des PS II
DAD	Diodenarray-Detektor
DCMU	3,4-Dichlorphenyl-N,N-dimethylharnstoff
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DD	Diadinoxanthin
DT	Diatoxanthin
DTT	Dithioerythritol
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ELIP	„early light induced protein“
Fm	maximale Fluoreszenz
Fo	Fluoreszenz im Grundzustand
FR	Far red, langwelliges Rotlicht mit einem Maximum bei 730 nm
Fv	variable Fluoreszenz
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoffprotonen
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HWZ	Halbwertszeit
IML	„intermittend light“
kDa	Kilodalton
LHC	Lichtsammelkomplex(e) des PS I / PS II
Lhcb1-6	Nomenklatur der Proteine des LHC II nach JANSSON (1994)
min	Minuten
MSA	Methylsulfinsäure
n	Stichprobenumfang; Anzahl der Einzelerperimente
n.b.	nicht bestimmt
NaF	Natriumfluorid
Neo	Neoxanthin
NF	Norflurazon
OD	optische Dichte
P680	primärer Akzeptor des PS II

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PFD	Photonenflußdichte
PQ	Plastochinon
PSI / PS II	Photosystem I /Photosystem II
$Q_A / Q_B$	primärer Akzeptor des PS II / sekundärer Akzeptor des PS II
qE	$\Delta$ pH-abhängiger Quench der Chlorophyllfluoreszenz
$qE_{SV}, qT_{SV}, qI_{SV}$	Berechnungen der Komponenten nach Stern-Volmer
qF	Anteil von qN mit schneller Relaxationskinetik
qI	photoinhibitorischer Quench der Chlorophyllfluoreszenz
qM	Anteil von qN mit mittlerer Relaxationskinetik
qN	nichtphotochemischer Quench
qP	photochemischer Quench der Chlorophyllfluoreszenz
qS	Anteil von qN mit langsamer Relaxationskinetik
qT	Quench der Chlorophyllfluoreszenz durch „state transitions“
RC	Reaktionszentrum, -zentren
Rec.	„recovery“
RT	Raumtemperatur
S	Standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
$SV_0$	Stern-Volmer Quotient des $F_0$ -Quench
$SV_m$	Stern-Volmer Quotient des $F_m$ -Quench
$t_{50\%}$	Zeit in der 50% der gemessenen Fluoreszenzlöschung erreicht sind
Tab.	Tabelle
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan
y	„yield“, Quantenausbeute der Photosynthese

# 1. EINLEITUNG

Carotinoide sind mit ihrem Vorkommen in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen wahrscheinlich die am weitesten verbreiteten natürlichen Pigmente. Neben der Verantwortlichkeit für die Farbenvielfalt der Natur nimmt ihre kommerzielle Bedeutung als Färbe- bzw. Antioxidationsmittel immer weiter zu. In den vergangenen Jahrzehnten sind große Fortschritte im Wissen um die biologische Funktion der Carotinoide, insbesondere innerhalb photosynthetischer Organismen, erreicht worden.

Die photosynthetischen Strukturen von höheren Pflanzen, Algen und phototrophen Bakterien enthalten eine Reihe von Pigmenten, die Chlorophylle bzw. Bakteriochlorophylle sowie verschiedene Carotine und Xanthophylle (GOODWIN, 1980; SZABOLCS 1990; YOUNG, 1993; BRITTON et al., 1995). Diese Pigmente sind an Proteine gebunden sind also Pigment-Proteinkomplexe und fungieren als strukturelle und funktionelle Komponenten innerhalb der Thylakoidmembran. Die Funktion der Carotinoide innerhalb der Photosynthese ist abhängig von der Lokalisation und Orientierung zu anderen Komponenten, speziell zu den Chlorophyllen bzw. Bakteriochlorophyllen.

Zum einen übernehmen die Carotinoide eine wichtige Rolle bei der Lichtsammelung als akzessorische Pigmente (PETERMANN et al., 1997). Die von den Carotinoiden aufgenommene Lichtenergie, führt zum Übergang dieser Moleküle in den angeregten Singulett-Zustand und im weiteren zur Übertragung der Energie auf die Chl a-Moleküle. Diese Antennenfunktion der Carotinoide ist als Singulett-Singulett Energietransfer beschrieben (WASIELEWSKI et al., 1986; MOORE et al., 1990; FRANK UND COGDELL, 1993, 1996; HORTON et al., 1996) und erweitert den effektiven Spektralbereich der Photosynthese und somit die ökologische Potenzbreite der durch ihren Besitz ausgezeichneten Organismen. Folglich ist bei schwachen Lichtintensitäten die Hauptfunktion der Lichtsammel-Komplexe (LHC) die Lichtabsorption und effektive Übertragung der Energie an die Reaktionszentren.

Carotinoide sind für die funktionelle Integrität einzelner Pigment-Proteinkomplexe essentiell. Dies konnte durch in vitro Rekonstitutionsexperimente (PLUMLEY UND SCHMIDT, 1987, 1995; MEYER et al. 1996), durch Untersuchungen an Mutanten der Carotinoidbiosynthese (HUMBECK et al., 1989) und durch Inhibierung der Carotinoide durch Norflurazon (MARKGRAF UND OELMÜLLER, 1991; BOLYCHEVTSEVSA et al., 1995; MARQUARDT, 1998) verdeutlicht werden.

Eine in den letzten Jahren weit häufiger diskutierte Rolle der Carotinoide ist ihre Schutzfunktion gegenüber exzessivem Licht. In Algen und Pflanzen ist der Schutz der Thylakoidmembranen insbesondere der Reaktionszentren vor Photooxydation durch Carotinoide von enormer Bedeutung. Ohne diese Funktion wäre eine Photosynthese unter aeroben Bedingungen nicht denkbar.

Aber auch in nichtphotosynthetischen Organismen sind Carotinoide wichtig beim Schutz gegen durch Singulett-Sauerstoff verursachte photooxidative Schäden. Viele nichtphotosynthetischen Bakterien oder Pilze bedienen sich des Schutzes von Carotinoiden, wenn sie unter Licht und Sauerstoffanwesenheit wachsen.

Allgemein wird die photoprotektive Rolle der Carotinoide in photosynthetischen Systemen durch den Quench des angeregten Triplett-Zustandes der Chlorophylle bzw. die Entgiftung von Singulett-Sauerstoff (SIEFERMANN-HARMS, 1987; FRANK UND COGDELL, 1993; FRANK et al. 1994, 1996; YOUNG UND FRANK; 1996) aufgrund des langen konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems

bestimmter Carotinoidmoleküle (Anzahl der Doppelbindungen > 10) (FRANK et al., 1994) erklärt. Innerhalb der Reaktionszentren des Photosyntheseapparates scheint  $\beta$ -Carotin eine wichtige photoprotektive Rolle bei der Entsorgung des Triplett-Zustands der Chlorophylle oder bei der Entgiftung von Singulett-Sauerstoff (FRANK UND COGDELL, 1993; FOYER UND HARBINSON, 1994; TELFER et al., 1994) zu übernehmen.

Ein andere antioxidative Funktion von  $\beta$ -Carotin und ähnlich konjugierten Carotinoidmolekülen wurde von BURTON (1990) identifiziert. Das Vorhandensein der Doppelbindungen im Molekül dieser Chromophoren ermöglicht die Reaktion mit Peroxidradikalen. Jedoch scheint die Fähigkeit membrangebundener Carotinoide, freie Radikale zu entsorgen, begrenzt (SIEFERMANN-HARMS, 1990).

In letzter Zeit wird die strukturelle Rolle der Carotinoide innerhalb der Thylakoidmembran stärker betrachtet. Die Anreicherung bestimmter Carotinoide, z.B. Zeaxanthin in der lipiden Phase der Thylakoidmembran führt zur Abnahme der Membranfluidität, einer Zunahme der Thermostabilität und einer Reduzierung der Anfälligkeit zur Lipidperoxidation (GRUSZECKI UND STRZALKA, 1991; HAVAUX UND GRUSZECKI, 1993; MOSKALENKO UND KARAPETYAN, 1996; HAVAUX UND TARDY, 1997; TARDY UND HAVAUX, 1997; HAVAUX, 1998). Mit der Abnahme der Membranfluidität wird die Permeation kleiner Moleküle, z. B. Sauerstoff, erschwert (SUBCZYNSKI et al., 1991). Für den Schutz der Chloroplastenmembran vor Photodestruktion könnte dies von enormer Bedeutung sein, da zum einen die Sauerstoffkonzentration und zum anderen auch die Penetration von reaktiven Sauerstoffspezies ins Innere der Thylakoidmembran gesenkt wird.

Wohl am häufigsten in den vergangenen Jahren diskutiert ist die dissipative Funktion des Zeaxanthins innerhalb der Xanthophyllzyklus-Pigmente. Zeaxanthin entsteht durch Deepoxidierung des Violaxanthins. Als Intermediat tritt Antheraxanthin auf (YAMAMOTO, 1979; HAGER, 1980; DEMMIG-ADAMS, 1990; PFÜNDEL UND BILGER, 1994). Unterschiedliche Modelle (DEMMIG-ADAMS, 1990; HORTON et al. 1994, 1996), auf welche später eingegangen wird, zeigen eine hinsichtlich photophysikalischer und physikochemischer Eigenschaften der Membran differenzierte photoprotektive Wirkung des Zeaxanthin sowie möglicherweise auch des Antheraxanthins (GILMORE UND YAMAMOTO, 1993; FRANK et al., 1994). Die Anregungsenergie der Pigmente wird dabei in Form von Wärme dissipiert, was sich in einem nichtphotochemischen,  $\Delta$ pH-abhängigen Quench (qE) der Chlorophyllfluoreszenz widerspiegelt. Die Deepoxidase wurde als lumenales 43 kDa Protein identifiziert (ARVIDSSON et al., 1996; BUGOS UND YAMAMOTO, 1996; ROCKHOLM UND YAMAMOTO, 1996), welches Ascorbat als Cofaktor benötigt und ein pH-Optimum bei 5 hat.

Ein weiterer Xanthophyllzyklus ist für unterschiedliche Algen beschrieben worden. Hierbei wird das Monoepoxid Diadinoxanthin in das epoxidfreie Diatoxanthin überführt (HAGER, 1980; DEMERS et al., 1991; ARSALANE et al., 1994; OLAIZOLA et al., 1994). In Folge dieser Pigmentumwandlung tritt ebenfalls eine nichtphotochemische Löschung der Fluoreszenz auf. Ebenso wie die Violaxanthin-Deepoxidase wird die Diadinoxanthin-Deepoxidase durch DTT inhibiert (OLAIZOLA et al., 1994).

Der Xanthophyllzyklus scheint die nichtphotochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz zu regulieren, wobei möglicherweise aber auch eine Interaktion der LHC beteiligt sein kann (HORTON UND RUBAN, 1994; HORTON et al., 1996).

PFÜNDEL UND BILGER (1994) vertreten die Hypothese, daß alle photosynthetischen Organismen, welche zur reversiblen Pigmentumwandlung im Xanthophyllzyklus befähigt sind, eine intrinsische LHC II-Typ Antenne (Chl a/b-Antenne der höheren Pflanzen oder Chl a/c-Antenne der Xanthophyceae) besitzen.

Für viele Algengruppen sind membranintegrale Lichtsammelkomplexe beschrieben worden (SIEFERMANN-HARMS, 1985; WILHELM, 1990; SCHMITT et al. 1993), welche ebenfalls einen Xanthophyllzyklus aktivieren (HAGER, 1980). In Rotalgen und Cryptophyten konnte dagegen keine Xanthophyllzyklus-Aktivität nachgewiesen werden (HAGER, 1980), ebenso enthalten diese Gruppen keinen typischen membranintegrierten LHC, welcher mit dem PS II assoziiert ist (SIEFERMANN-HARMS, 1990; WILHELM, 1990). Der membranintrinsische LHC der Cryptophyten überträgt Energie an das PS I und unterscheidet sich funktionell vom PS II assoziierten LHC (WILHELM, 1990; BÜCHEL UND WILHELM, 1993). Dieses konnte auch für den LHC von Rotalgen beschrieben werden (WOLFE et al., 1994).

Thermale Dissipation von Anregungsenergie spiegelt sich in einem nichtphotochemischen Quench der Chl a-Fluoreszenz wider, welcher sowohl im RC II (WEIS UND BERRY, 1987; KRIEGER UND WEIS, 1992; BRUCE et al., 1997) als auch in den Antennen (DEMMIG-ADAMS 1990; RUBAN et al., 1992) stattfinden kann. Die Dissipation übermäßig absorbiertes Lichtenergie in Form von Wärme wird generell als wichtiger Mechanismus beim Schutz des PS II vor exzessivem Licht angesehen. Prinzipiell dient der nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz der Maximierung der Effizienz der Photosynthese bei Schwachlicht und der Minimierung der Schädigung des Photosyntheseapparates bei hohen Lichtintensitäten.

Eine nichtphotochemische Löschung der Chl a-Fluoreszenz resultiert aus unterschiedlichsten Mechanismen innerhalb der Thylakoidmembran (KRAUSE UND WEIS, 1991; DAU, 1994a; HORTON, 1995; POŠPIŠIL, 1997), wobei der Hauptanteil des nichtphotochemischen Quench über die Konzentration der Protonen  $[H^+]$  im Thylakoidlumen reguliert wird (BRIANTAIS et al., 1979; KRAUSE et al., 1988; CROFTS UND HORTON, 1991; RUBAN UND HORTON, 1995). Dieser  $\Delta pH$ -abhängige Anteil des nichtphotochemischen Quench ( $qE$ ) setzt schon nach kurzer Belichtungsdauer ein und klingt mit einer Halbwertszeit von 1 min-2 min im Dunkeln ab (QUICK UND STITT, 1989; WALTERS UND HORTON, 1991). Eine Unterscheidung von  $qE$  in eine Zeaxanthin abhängige und eine Zeaxanthin unabhängige Komponente, wurde von BILGER et al. (1989) und DEMMIG-ADAMS et al. (1990) veröffentlicht.

Neben dem durch Ansäuerung des Thylakoidlumens verursachten Quench der Fluoreszenz ist eine zweite Komponente ( $qT$ ) beschrieben worden (WALTERS UND HORTON, 1991), deren Ursache „state transitions“ (BENNETT, 1983; WILLIAMS UND ALLEN, 1987) sein sollen. Dabei kommt es zur Phosphorylierung des trimeren LHC II (LHCb1; LHCb2) durch eine Kinase, deren Aktivität durch den Reduktionsgrad des PQ-Pools reguliert wird (ALLEN, 1992). Diese Phosphorylierung bewirkt eine laterale Wanderung des zusammen mit dem PS II in den Granathylakoiden angereicherten LHC II zum PS I in den Stromathylakoiden (ALLEN, 1992). HARRISON UND ALLEN (1993) konnten bei Grünalgen eine 30%ige Reduktion der PS II Fluoreszenz aufgrund von „state transitions“ beschreiben.

Als eine dritte Komponente der nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz kann eine Reduktion der PS II Fluoreszenz aufgrund photoinhibitorischer Prozesse angesehen werden. Eine mögliche Funktion von Xanthophyllzyklus-Pigmenten innerhalb der Regulation photoinhibitorischer Prozesse postulierten DEMMIG und BJÖRKMAN (1987), wobei dem

Zeaxanthin selbst die Rolle eines direkten Quenchers zugeschrieben wird (OWENS et al., 1992; FRANK et al., 1994). JAHNS UND MIEHE (1996) diskutieren die photoprotektive Bedeutung des Zeaxanthins, welches unter photoinhibitorischen Bedingungen verstärkt im RC II gebunden wird. Untersuchungen von DEMMIG-ADAMS et al. (1998) bringen Argumente für eine mögliche Rolle des Zeaxanthins innerhalb der Photoinhibierung in Schattenpflanzen bei. Wie auch DEPKA et al. (1998), welche für *Chlamydomonas* die Konversion von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin unter photoinhibitorischen Bedingungen beschreiben und somit dem Zeaxanthin eine wichtige Rolle innerhalb photoinhibitorischer Prozesse zuordnen, konnten auch DEMMIG-ADAMS et al. (1998) eine Zunahme des Zeaxanthins auf Kosten des  $\beta$ -Carotins beobachten.

Viele Untersuchungen der letzten Jahre waren der Frage der Lokalisation des  $\Delta$ pH-abhängigen Quench gewidmet. Prozesse im RC II, welche zur nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz führen, werden durch einen bei niedrigem pH induzierten Austausch von  $\text{Ca}^{2+}$  gegen  $\text{H}^+$  auf der Lumenseite der Thylakoidmembran induziert (KRIEGER UND WEIS, 1992; 1993). In der Folge führt dies zur Inaktivierung des wasserspaltenden Komplexes (DEBUS, 1992). Die durch den Verlust von  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelöste Inaktivierung des Manganclusters verhindert den Übergang von Elektronen zum Tyr-Z, damit wird der oxidierte Zustand des  $\text{P680}^+$  stabiler. Das Freiwerden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflusst Redoxprozesse an der Donor- wie auch an der Akzeptorseite des RC II (KRIEGER UND WEIS, 1992; 1993; KRIEGER et al., 1993; 1995; ANDRÉASSON et al., 1995; JOHNSON et al., 1995). Die nun anschließende Reduktion des  $\text{P680}^+$  kann über verschiedene Wege erfolgen. Zum einen kann  $\text{P680}^+$  durch  $\text{Q}_\text{A}^-$  oder  $\text{Pheo}^-$  reduziert werden (SCHREIBER UND NEUBAUER, 1987; KRIEGER UND WEIS, 1992; 1993). Eine weitere Möglichkeit der Reduktion des  $\text{P680}^+$  ist als zyklischer Elektronentransport um das PS II (FALKOWSKI et al., 1986b; SCHREIBER UND NEUBAUER, 1989; MEUNIER UND BENDALL, 1993) beschrieben worden. Weiterhin kann der Singulett- oder Triplett-Zustand des primären Elektronenakzeptors (RAMM UND HANSEN, 1993) thermal dissipiert werden. All dieses führt zum Grundzustand des  $\text{P680}$ . Im Grundzustand ist der primäre Elektronendonator  $\text{P680}$  dann in der Lage, Energie der Antennen zu übernehmen. Dieses bewirkt einen Quench der Fluoreszenz.

Während KRIEGER und WEIS (1992) den  $\Delta$ pH-abhängigen Quench von Fm im RC II lokalisieren, betonen Horton und Mitarbeiter die wichtige Rolle des LHC II für das Auftreten quencherender Mechanismen (HORTON et al., 1991; RUBAN et al., 1992a,b; WALTERS UND HORTON, 1993; HORTON et al., 1994; RUBAN et al., 1994; WALTERS et al., 1996; HORTON et al., 1996; RUBAN et al., 1997).

Zwei unterschiedliche molekulare Mechanismen des  $\Delta$ pH-abhängigen Quench innerhalb des LHC II in vivo werden diskutiert. Zum ersten wurde, basierend auf einer starken Korrelation von qE und dem Gehalt an Zeaxanthin -durch Deepoxidation aus Violaxanthin entstanden- der Xanthophyllzyklus für die Entwicklung des nichtphotochemischen Quench verantwortlich gemacht (DEMMIG-ADAMS, 1990; DEMMIG-ADAMS UND ADAMS III, 1996). Ebenso konnte auch eine Korrelation dieses Quench zum Gehalt von Antheraxanthin gezeigt werden (GILMORE UND YAMAMOTO, 1992). Dabei wird angenommen, daß der erste angeregte Singulett-Zustand des Chl a direkt von Zeaxanthin gequencht werden kann (DEMMIG - ADAMS UND ADAMS, 1992). Generell ist ein Singulett-Singulett Energietransfer vom Chl a auf Zeaxanthin in vitro möglich (OWENS et al., 1992; FRANK et al., 1994), konnte jedoch in vivo bisher noch nicht gezeigt werden. Allerdings ist es anhand bisher vorliegender Daten nicht möglich, Rückschlüsse über eine

direkte oder indirekte Rolle des Xanthophyllzyklus bzw. des Zeaxanthins innerhalb des nicht-photochemischen Quench abzuleiten.

Ein zweiter denkbarer molekularer Mechanismus wird von Horton und Mitarbeitern (HORTON et al., 1991, 1994; RUBAN UND HORTON, 1995) diskutiert. Nach diesen Autoren führt die Ansäuerung zu einer Protonierung der LHC-Proteine und zu nachfolgenden strukturellen Veränderungen derselben. Durch diese strukturellen Veränderungen ist die Möglichkeit der Aggregatbildung des LHC gegeben. Das Vorhandensein von bestimmten Carotinoiden fördert (Zeaxanthin) oder inhibiert (z.B. Violaxanthin; Neoxanthin) die Ausbildung der LHC II Aggregate (RUBAN et al., 1993). Somit können in Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter Carotinoide und dem Grad der Ansäuerung des Thylakoidlumens vier unterschiedliche Zustände des LHC II postuliert werden, welche sich durch unterschiedliche Fluoreszenz- und Wärmedissipationsseigenschaften auszeichnen. Der physikalische Mechanismus der Löschung der Chlorophyllfluoreszenz innerhalb der Aggregate ist noch unklar. Denkbar ist, daß durch Assoziation von Chl a und Zeaxanthin ein Singulett-Singulett-Energietransfer auf Zeaxanthin abläuft oder das Entstehen von Chlorophyll-Dimeren am Fluoreszenzquench beteiligt ist (HORTON UND RUBAN, 1994; HAGEN et al., 1995).

Gerade im Bereich der Algen sind weitere Untersuchungen notwendig um konkrete Aussagen über quenchende Mechanismen zu erzielen. Durch veränderte Pigmentausstattung oder Vorhandensein eines durch Dunkelheit zu induzierenden Quench zeigen sich deutliche Unterschiede im Fluoreszenzverhalten von Algen gegenüber höheren Pflanzen. Möglicherweise beruhen diese auch auf abweichenden photoprotektiven Regulationsmechanismen. Man darf nicht vergessen, daß bisher nur wenige Algen untersucht wurden. Es ist daher notwendig, weitere Gruppen in Untersuchungen einzubeziehen. Auch vom phylogenetischen Standpunkt wäre das außerordentlich wichtig.

Weiterhin ist im Vergleich zu den Informationen über die Einflüsse der Umwelt auf die Regulation und den qualitativen und quantitativen Gehalt der Carotinoide in höheren Pflanzen über die Bedeutung dieser Pigmente in Algen und Cyanobakterien wenig bekannt. Dieses gilt auch für Modifikationen des Pigmentstatus von Algenklassen, welche sich in ihrer Pigmentausstattung, mit Ausnahme der Grünalgen, stark von der höheren Pflanze unterscheiden (GOODWIN, 1980; LIAAEN-JENSEN 1985; BJØRNLAND, 1990; YOUNG, 1993). Besonderes Interesse beansprucht in diesem Zusammenhang die Euglenophyta, die in vieler Hinsicht der Chlorophyta an die Seite gestellt werden. In der Pigmentausstattung weichen sie jedoch ab und sind mit den chromophyten Algen vergleichbar (YOUNG, 1993).

Weitere Arbeiten sind notwendig, um die Funktion der Carotinoide innerhalb photoprotektiver Mechanismen dieser weit verbreiteten Organismengruppen zu verstehen.

Auf Grund der Arbeit von PANZER (1990), welche die Empfindlichkeit der Alge *Euglena gracilis* gegenüber Lichtstreß durch den Carotinoidgehalt modifizieren und somit eindeutige Schutzeffekte des Carotinoidgehaltes z.B. auf die Rubisco beschreiben konnte, interessierte uns die Frage, welcher Art dieser Schutzeffekt der Carotinoide in dieser Alge sein könnte. Fungiert wie bei höheren Pflanzen und Grünalgen eine reversible Pigmentumwandlung als Schutzmechanismus auf veränderte Lichtbedingungen? Welche Rolle übernehmen die Carotinoide generell innerhalb photoprotektiver Mechanismen? Durch photoheterotrophes Wachstum dieser Grünalge in Gegenwart von Inhibitoren der Carotinoidbiosynthese stehen uns Zellen zur Verfügung, welche stark im Carotinoidgehalt modifiziert waren, jedoch unter nahezu identischen Anzucht-

bedingungen gewachsen waren, wie die Kontrollkultur. Ein weiterer Vorteil dieser Alge war die problemlose und reproduzierbare Isolierung von Chloroplasten.

Im Vergleich zu höheren Pflanzen gibt es gerade bei Untersuchung der Algen hinsichtlich der Regulationsmechanismen in Bezug auf übermäßige Anregung noch viele offene Fragen. *Euglena* unterscheidet sich neben einer dritten Chloroplastenmembran (GIBBS, 1978) sowie in einer abweichenden Ausstattung endogener Enzyme der Stressabwehr (SHIGEOKA et al., 1987; ASADA UND TAKAHASHI, 1987), auch durch den geringen Chl b-Gehalt und die abweichende Carotinoidausstattung (CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986a; BRANDT UND WILHELM, 1990) sowie das Fehlen von Granathylakoiden (SALVADOR et al., 1971; WINTER UND BRANDT, 1986) von höheren Pflanzen und anderen Grünalgen. Die dritte Chloroplastenmembran führte zur Vermutung, daß diese Alge möglicherweise einen eukaryotischen Endosymbionten aufgenommen hat (KNOLL, 1992). Einerseits weist *Euglena* viele Eigenschaften, wie z.B. die Verwandtschaft der LHC I- und LHC II-Proteine mit denen der höheren Pflanzen, auf andererseits gibt es wie beschrieben viele Unterschiede. Gerade diese letzten zwei Punkte machten es wahrscheinlich, daß *Euglena* auch hinsichtlich der Regulationsmechanismen der PS II-Effizienz Unterschiede zur höheren Pflanze zeigt. In Anbetracht dieser Tatsachen erhofften wir von unsere Untersuchungen Informationen über die Entwicklung photoprotektiver Mechanismen in Chloroplasten. Durch die Möglichkeit der Carotinoidverarmung sollte die Rolle der Carotinoide innerhalb dieser Regulationsmechanismen untersucht werden. Angesichts der diskutierten Modelle lag der Schwerpunkt unserer Untersuchungen auf der Analyse des nichtphotochemischen Quench von *Euglena gracilis*. In Anbetracht vieler Unterschiede zu höheren Pflanzen war eine biochemische wie auch spektroskopische Charakterisierung des Photosyntheseapparates notwendig.

Wie sich durch unsere Untersuchungen herausstellte, ist *Euglena gracilis* unter den verschiedensten Bedingungen nicht zu einer reversiblen Pigmentumwandlung befähigt. Somit wurde die Frage nach der Natur des Fluoreszenzquench zum zentralen Gegenstand unserer Untersuchungen. Durch das Fehlen eines Xanthophyllzyklus ergab sich die Möglichkeit der Analyse eines von einer reversiblen Pigmentumwandlung unabhängigen Fluoreszenzquench. Das Vorhandensein eines nichtphotochemischen Quench der Chl a-Fluoreszenz ist oft beschrieben, jedoch die molekularen Mechanismen, welche die Löschung der Fluoreszenz hervorrufen, werden umstritten diskutiert und bis heute noch nicht völlig verstanden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Chemikalien wurden generell über die Firmen MERCK, SERVA und SIGMA bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad: „research grade“ oder „pro analysi“. Für die Extraktion der Pigmente eingesetzte Lösungsmittel sowie die Lösungsmittel der mobilen Phase der HPLC wurden über Roth bezogen (Reinheitsgrad: ROTI<sup>®</sup> SOLV HPLC).

### 2.1 Anzucht des Algenmaterials

Die Untersuchungen wurden an der einzelligen Alge *Euglena gracilis*, einem Vertreter der Euglenophyceae, Wildtyp, Linie Z, Nr. 1224-5/25 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen durchgeführt. Das Wachstum der Zellkulturen erfolgte unter mixotrophen Bedingungen.

#### 2.1.1 Nährlösungen

Für die Anzucht der Zellkulturen wurde eine Nährlösung folgender Zusammensetzung verwendet: (bezogen ad 1 l)

NaCl	0,1	g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,4	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4	g
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,05	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	g
Fe-EDTA-Lsg.	1,0	ml
Spurenelementlsg.	1,0	ml
Vitamin B <sub>1</sub>	40,0	µg
Vitamin B <sub>12</sub>	2,0	µg
Glukose	10,0	g
L-Glutaminsäure	2,0	g

Die Fe-EDTA-Lösung bestand aus 0,695 g FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O und 0,930 g Na<sub>2</sub>EDTA, gelöst in 100 ml Auqa dest., die Spurenelementlösung wurde in Anlehnung an die Vorschrift von PRINGSHEIM UND WIESNER (1961) hergestellt.

ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	9,8	g
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2,2	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12,4	g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,05	g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1,25	mg
NaMoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,2	g

-----  
ad 1 l Auqa dest.

Die Experimente mit intakten Zellen wurden in einem Ruhemedium, in welchem die Zellteilung unterdrückt wurde, folgender Zusammensetzung durchgeführt:

NaCl	0,1	g
MgSO <sub>4</sub>	0,4	g
CaCl <sub>2</sub>	0,05	g

-----  
ad 1 l 0,03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH = 7,8

### 2.1.2 Anzuchtbedingungen

#### a) mixotrophe Anzucht

Für die Kultivierung der Algenzellen unter mixotrophen Bedingungen wurden 100 ml Erlenmeyer, gefüllt mit 50 ml autoklavierter Nährlösung mit 1 Million Zellen steril beimpft. Die Anzucht erfolgte in einem RUMED-Licht-Thermostaten (RUBARTH Apparate GmbH) bei 25°C. Die Lichtintensität während des Wachstums war abhängig von den Versuchsbedingungen. Die Kontrolle bzw. die Erhaltungskulturen wurden bei 25  $\mu\text{mol Photonen/m}^2/\text{s}$  angezogen und nach 6 d gerntet.

Für die Schwachlichtanzuchten bei 0,3  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , 5  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  und 10  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  wurden Bereiche im Anzuchtschrank abgedunkelt. Starklichtintensitäten wurden durch Einbau zusätzlicher Beleuchtungsquellen erreicht.

Die Anzucht der Zellen für die Chloroplastenisolierung erfolgte in 1 l Kulturgefäßen, die mit 500 ml Nährlösung gefüllt waren, bei einer Photonenflußdichte (PFD) von 25  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  und einer Anzuchtstemperatur von 25°C. Die Zellen wurden nach 72h  $\pm$  3h geerntet.

#### b) Inhibierung der Carotinoidbiosynthese während der Anzucht

Um an Zellen mit reduziertem Carotinoidgehalt arbeiten zu können, wurde die Carotinoidbiosynthese während der Kultivierung der Zellen mit Norflurazon (SAN 9789: 4-chloro-5-methylamino-2-(3-trifluorphenyl)pyridazin-3(2H)-on; SANDOZ AG) inhibiert. Das Bleichherbizid wurde in Methanol gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen vor dem Animpfen dem Nährmedium zugesetzt. Die Konzentration von Methanol überschritt nie 0,08%.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit dem Teilchen-Zähl- und Analysegerät Laborscale/PSL-1/-Analysator/PSA-1 (MEDICOR Werke, Ungarn) bestimmt. Als Elektolyt diente eine hochgereinigte 0,9% NaCl-Lösung.

### 2.2.2 Lichtmessung

Die verwendeten Lichtintensitäten wurden mit dem Lamdameter LI-185 der Firma LAMDA Inst. Cop. USA ermittelt und beziehen sich in jedem Fall auf photosynthetisch aktive Strahlung (PAR), d.h. auf den Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm. Die Lichtintensität für die in Belichtungsküvetten (BIOLYTIK GmbH, BRD) durchgeführten Versuche wurden in der Küvette mit dem Licht- und Temperaturmeßgerät Quantitherm (HANSATECH Instruments, UK) gemessen. Die Angabe der Belichtungsintensitäten erfolgt in Photonenflußdichte (PFD): in Mikromol Photonen pro Quadratmeter und Sekunde ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

### 2.2.3 Chloroplastenisolierung aus *Euglena gracilis*

Bei der Präparation von intakten Chloroplasten aus mixotrophen unbehandelten oder carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* wurde nach der von TSCHERSCH (1992) modifizierten Vorschrift nach PRICE UND REARDON (1982) bzw. GOMEZ-SILVA et al. (1985) verfahren. Alle Isolationsschritte fanden bei einer Arbeitstemperatur von 0-4°C statt, für die einzelnen Zentrifugationen wurde die Zentrifuge 3 K 12 (SIGMA) mit Ausschwingrotor verwendet.

Zunächst erfolgte ein zweimaliges Waschen, bei dem das Sediment der Zellen, nach 1minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min in K-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0; 30 mM Sorbitol) resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Das Sediment (5-7g) konnte nun im gleichen Puffer aufgenommen und mit 0,5% Trypsin (w/w) versetzt werden. Eine ca. 35minütige Inkubation unter langsamen Rühren ( etwa 250 U/min) führte zum Andauen der proteinreichen Pelli-kula, welche der Plasmamembran von *Euglena gracilis* aufgelagert ist. Die Fortschritte des Andauungsprozesses (Sphäroblastenbildung) wurden unter dem Mikroskop verfolgt. Nach der Ausbildung typischer Sphäroblasten erfolgte eine Zentrifugation (1 min) bei 5200 U/min und ein zweimaliger Waschschrift im K-Phosphat-Puffer. Anschließend wurde das Sediment in 1-2 ml TRICIN-Puffer (50 mM, pH 7,8; 330 mM Sorbitol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) resuspendiert und 30 min bei einer Drehzahl von ca. 50 U/min mit 1,0 g Glaskugeln ( $d = 0,5$  mm) magnetisch gerührt, woraus der Aufschluß der Zellen resultierte. Die somit erreichte Suspension ganzer Zellen, Chloroplasten und Zelltrümmer konnte nun bei 900 U/min 5 min zentrifugiert werden. Die im Sediment enthaltenden ganzen Zellen und größeren Zellstrukturen wurden nach zweimaligen Waschen mit TRICIN-Puffer und nochmaliger Zentrifugation verworfen. Es folgte darauf die Vereinigung der Überstände beider Zentrifugationsschritte und deren erneute einminütige Zentrifugation bei 5200 U/min. Nach Resuspension des paramylonfreien Sediments in 1-2 ml HEPES-Puffer (5 mM, pH 6,8; 300 mM Sorbitol, 5 mM Mercaptoethanol, 15 mM NaCl) folgte die Unterschichtung mit etwa 3 ml 20%igem Percoll (v/v) in TRICIN-Puffer [25 mM TRICIN, pH 8,0; 330 mM Sorbitol, 2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% BSA (w/v)]. Diese zwei Phasen wurden einer 3minütigen Dichtegradientenzentrifugation bei 5000 U/min in Polysulfon-Reagenzgläsern (NALGENE, USA) unterzogen, wodurch die aufgebrochenen Chloroplasten von den intakten getrennt wurden. Letztere sedimentierten und wurden abschließend vorsichtig in TRICIN-Puffer (25 mM TRICIN, pH 8,0; 330 mM Sorbitol, 2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% BSA ) resuspendiert und einem nochmaligen Waschschrift unterworfen, bevor endgültig die Aufnahme in TRICIN-Puffer erfolgte.

Mit diesem Verfahren ist eine Isolierung von Chloroplasten mit einem Intaktheitsgrad von  $95,7\% \pm 2,5$  ( $n=6$ ) möglich. Der Intaktheitsgrad wurde nach der Methode von LILLEY et al. (1975) bestimmt.

#### 2.2.4 Belichtung von Zellen und Chloroplasten

Das Versuchsmaterial wurde je nach Umfang des Versuchsansatzes in einer 3 ml oder 30 ml fassenden Plexiglasküvette mit magnetischem Rührer (BIOLYTIK GmbH, BRD) belichtet. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtquelle (Kaltlicht-Fiberleuchte FL-400 und Spezialoptik 400-F, HEINZ WALZ GmbH, BRD), welche in ihrer Intensität variierbar war. Das Testmaterial wurde bei 25°C (Kryostat F30, JULABO, BRD) während der Belichtung gleichmäßig, langsam gerührt. Eine CO<sub>2</sub>-Verarmung wurde durch die Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> (Endkonzentration 10 mM) verhindert.

Für die Belichtung von Zellen wurden mixotrophe Zellen abzentrifugiert (20°C, 3000 U/min; SIGMA 3K 12) und mit einer Zelldichte von 1 Million Zellen /ml in Ruhemedium überführt. Nach 2 stündiger Inkubation bei 25 µmol/m<sup>2</sup>/s und Überführen in die Küvette wurden die Zellsuspensionen belichtet. Die Belichtungsdauer und -intensität ist bei den jeweiligen Versuchen beschrieben.

Bei vergleichenden Experimenten von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen wurden die Zellen auf gleiche optischer Dichte eingestellt (OD = 1,1-1,2), was in diesem Fall auch einer identischen Zellzahl entsprach.

Bei Einsatz von Norflurazon während der Belichtung wurde der Wirkstoff in einer Konzentration von 50 µM dem Ruhemedium vor der 2 stündigen Inkubation zugesetzt.

Die Belichtung von Chloroplasten erfolgte im Reaktionsmedium nach MASON et al., (1991), wobei eine Chlorophyllkonzentration von 20 µg/ml eingestellt wurde. Dabei war es für eine optimale Aktivität der Chloroplasten von Bedeutung, daß alle nachfolgend aufgeführten Zusätze in der angegebenen Endkonzentration unmittelbar vor jeder Messung bzw. vor den Belichtungsversuchen zugegeben wurden (WALKER et al., 1987):

0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 5,0 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
 1,0 mM ATP (BOEHRINGER, BRD)  
 10,0 mM NaHCO<sub>3</sub>  
 4,0 mM Glycerat-3-phosphat (SIGMA, USA).

Neben den Belichtungsversuchen von Zellen und Chloroplasten, welche extern in Küvetten durchgeführt wurden, gab es Experimente, bei denen das Versuchsmaterial in der Probenküvette des PAM-Fluorometers belichtet oder im Dunkeln inkubiert worden sind. Dieser Versuchsaufbau erlaubte das Protokollieren der Fluoreszenzveränderung während des gesamten Versuchszeitraumes an einer Probe (vgl. Kap. 2.2.10).

## 2.2.5 Bestimmung der optischen Dichte von Algensuspensionen

Durch die Anzucht mit Norflurazon war als sekundärer Effekt der Chlorophyllgehalt dieser Zellen im Vergleich zur unbehandelten Zelle reduziert. Um bei Belichtungsversuchen gleiche Lichtwirkung zu gewährleisten, wurden die Zellsuspensionen anhand der optischen Dichte (OD = 1,1-1,2) eingestellt. Dazu wurde die Extinktion der unterschiedlichen Algensuspensionen bei 436 nm gegen Ruhemedium als Referenz vermessen.

## 2.2.6 Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung

Zum Kalibrieren der HPLC dienten authentische Farbstoffe, die vorher quantitativ bestimmt wurden. Die Chlorophyll a und b Standards (SIGMA) wurden in 100%igem Aceton gelöst und nach LICHTENTHALER (1987) bei 661,8 nm (Chl a) und 644,8 nm (Chl b) am Spektrophotometer Uvikon 931 (KONTRON, Italien) vermessen. Die Konzentrationen wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Chl a} = 11,24 \cdot A_{661,8} - 2,04 \cdot A_{644,8} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{Chl b} = 20,13 \cdot A_{644,8} - 4,19 \cdot A_{661,8} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentrationen für die Algen und Chloroplastensuspensionen erfolgte nach der Methode von ARNON (1949). Die sedimentierten Algen wurden in 80%igem Aceton und bei 4°C, 10 min im Dunkeln belassen. Nach vollständiger Extraktion der Chlorophylle und Zentrifugation (2 min bei 5000 U/min) wurde der Überstand im Photometer Uvikon 931 bei 663 nm und 645 nm vermessen. Die Berechnung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach KUBIN (1985):

$$\text{Chl a} = 11,72 \cdot A_{663} - 2,80 \cdot A_{645} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{Chl b} = 20,07 \cdot A_{645} - 3,72 \cdot A_{663} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

**Tab.1** Verwendete Carotinoidstandards; Extinktionskoeffizienten nach BRITTON (1985) \* bzw. MANTOURA UND LLEWELLYN (1983)

Carotinoid	bezogen von:	Lösungs- mittel	Wellenlänge in nm	Extinktions- koeffizient in $A_{1\text{cm}}^{1\%}$
<b>Neoxanthin</b>	PD Dr. Ruedi, ETH Zürich	Ethanol 96%	415; <u>439</u> ; 467	2243
<b>Diadinoxanthin</b>	isoliert aus Phaeo- dactylum tricornutum	Ethanol 96%	424, <u>447</u> , 482	2500
<b>Diatoxanthin</b>	siehe DD	Ethanol 96%	425, 449, 475	1634 bei 440 nm *
<b>Canthaxanthin</b>	Hoffmann-La Roche, Zürich	Petrolether (F 40 - 60° C)	466	2200
<b>β-Cryptoxanthin</b>	Hoffmann-La Roche	Petrolether	425; <u>449</u> ; 476	2386
<b>Echinenon</b>	Hoffmann-La Roche	Petrolether	<u>458</u> ; 482	2158
<b>β-Carotin</b>	Hoffmann-La Roche	Ethanol 96%	<u>450</u> , 476	2620

Die Carotinoidstandards wurden in die Lösungsmittel aufgenommen, für welche ein Extinktionskoeffizient beschrieben ist. Diese Lösungen sind am Photometer Uvikon 931 vermessen worden. Die Berechnung der Carotinoidkonzentrationen erfolgte nach BRITTON (1985). In der Tab.1 sind die Carotinoidstandards mit den verwendeten Lösungsmitteln und Extintionskoeffizienten nach BRITTON (1985; 1995) zusammenfassend dargestellt.

### 2.2.7 Pigmentanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Zur qualitativen und quantitativen Feinanalyse der Pigmente von *Euglena gracilis* sowie zur Isolierung der Standards Diadinoxanthin und Diatoxanthin aus *Phaeodactylum tricornutum* diente die RP-HPLC („reverse-phase high-performance liquid chromatography“). Die Extraktion der Pigmente erfolgte mit 100% Aceton (HPLC-SOLVENT) für 10 min bei 4°C im Dunkeln. Um die Reinheit der Proben zu gewährleisten wurden diese nach der Extraktion für 24 h bei -70°C aufbewahrt und vor Injektion 20 min bei 14000 U/min zentrifugiert (EPPENDORF Zentrifuge 5402). Die gelösten Proben wurden in ein Gradienten-System (analytische HPLC Pumpe 322, Pumpenköpfe A und B; KONTRON Instruments, Italien) mittels eines Rheodyne Probenaufgabeventils (Modell 7125; RHEODYNE Incorporated, USA) ausgestattet mit einer 20 µl Probenschleife, injiziert.

In Anlehnung an die Pigmenttrennung mittels HPLC nach HUMBECK (1989) wurde die Methode von uns so modifiziert, daß nach 33 min Laufzeit alle Pigmente von *Euglena gracilis* eluiert und die chromatographische Trennsäule auf ihre Anfangsbedingungen regeneriert war.

Als mobile Phase diente ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Methanol 75/25 (v/v) und Reinstwasser. Die polaren Eigenschaften dieser Phase wurden durch den Wassergradienten im Laufe der Trennung verändert. Begonnen wurde mit einem 7%igem Anteil von H<sub>2</sub>O, welcher linear innerhalb von 8,6 min auf 4%, nach 16 min auf 2% gesenkt wurde. Nach 17 min war die mobile Phase wasserfrei. Eine anfängliche Flußrate von 1,5 ml/min wurde nach 17,5 min auf 3 ml/min erhöht. Innerhalb von 25 min waren alle Pigmente eluiert. Anschließend wurde die Säule langsam auf ihre Ausgangsbedingungen regeneriert. Zur Entgasung der Lösungsmittel diente ein integrierter Degaser DG 1210 (UNIFLOWS, Co., Japan).

Die Separation der Carotinoide und Chlorophylle erfolgte mit einer Umkehrsäule des Typs ET 250/ 1/4“/ 4.6 Nucleosil<sup>®</sup> 120-5C<sub>18</sub> (MACHEREY-NAGEL GmbH), die in einem Säulenofen bei konstanter Temperatur (22°C) plaziert war. Detektiert wurden die getrennten Pigmente mit dem Diodenarray-Detektor (DAD 440, KONTRON Instruments, Italien), welcher neben der quantitativen Bestimmung auch eine qualitative Analyse der spektralen Eigenschaften der getrennten Substanzen ermöglichte. Die Steuerung der Anlage sowie die Datenerfassung und Auswertung wurde über das Computerprogramm DS 450-MT1-EMS (KONTRON Instruments, Italien) realisiert.

Die zur quantitativen Bestimmung nötigen Pigmentstandards (vgl. Tab.1) wurden zum Teil (Diadinoxanthin, Diatoxanthin) aus der Alge *Phaeodactylum tricornutum* nach der für dieses Objekt beschriebenen Methode nach MANTAURA UND LEWELLYN (1983) isoliert. Hierzu wurde eine semipräparative Säule genutzt (SS 250/1/2“/10 Nucleosil<sup>®</sup>7 C<sub>18</sub>; MACHEREY-NAGEL GmbH, BRD).

Identifiziert wurden die Pigmente anhand des Vergleichs spektraler Eigenschaften mit Literaturdaten und der Chromatographie der Standardsubstanzen. Die als Epoxide vorliegenden

Pigmente wurden durch Säurebehandlung in ihre Furanoxide überführt und erneut chromatographiert.

### 2.2.8 Polarographische Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung und Atmungsaktivität intakter Zellen

Für die Messung der photosynthetischen O<sub>2</sub>-Entwicklung bzw. des respiratorischen O<sub>2</sub>-Verbrauches intakter Zellen nutzten wir eine Platin-Silber-Elektrode (nach Clark). Das allgemeine Funktionsprinzip beruht auf der Fähigkeit bestimmter Metalle, Sauerstoff elektrochemisch zu reduzieren (FORK, 1972).

Die Experimente wurden mit der Sauerstoffelektrodeneinheit CB 1-D2 durchgeführt. Als Stromversorgungs- und Meßgerät diente die Einheit AI KM 2 (beide HANSATECH, UK), die Aufzeichnung der Signale erfolgte mit dem Kompensationsschreiber L-250 der Firma LINSEIS (BRD). Die Elektrodeneinheit wurde auf 25°C temperiert. Das Meßvolumen betrug 1ml. Der Chlorophyllgehalt variierte in einzelnen Experimenten überstieg jedoch nie 20 µg/ml. Die Suspension wurde während des Versuches magnetisch gerührt. Die Sauerstoffentwicklung wurde bei PFD von 1000 µmol/m<sup>2</sup>/s registriert. Für die Messung der O<sub>2</sub>-Entwicklung wurden die Proben 1 min mit Stickstoff begast, danach erfolgte die Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> (Endkonzentration: 10 mM). Vor Bestimmung des O<sub>2</sub>-Verbrauches wurden die Proben 1 min mit Luft begast und im Dunkeln gemessen. Sämtliche Proben befanden sich im Ruhemedium.

Um Fluoreszenzemission und Sauerstoffentwicklung gleichzeitig messen zu können, wurden die Lichtsättigungskurven der unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen in der Küvette RE K1-1 N (BIOLYTIK, BRD) registriert.

### 2.2.9 Bestimmung der Aktivität von PS I und PS II in Chloroplasten von *Euglena gracilis*

Die Aktivität der Photosysteme I und II wurden mit künstlichen Elektronendonatoren und -akzeptoren ermittelt (IZAWA, 1980) und anhand ihrer O<sub>2</sub>-Produktion (PS II) bzw. -Aufnahme (PS I) mit Hilfe einer Platin-Silber Elektrode (nach Clark) polarographisch (siehe auch 2.2.8) verfolgt. Das Reaktionsvolumen in der Meßküvette betrug 1 ml mit einer Chlorophyllkonzentration von 20 µg/ml. Belichtet wurden die Proben mit einer Intensität von 1000 µmol/m<sup>2</sup>/s. Die Chloroplasten befanden sich in dem unter 2.2.4 beschriebenen Reaktionsmedium. Im einzelnen hatten die Versuchsmedien folgende Zusammensetzung:

#### Aktivitätsbestimmung des PS I

Elektronendonator:	0,4 mM DCPIP 3,8 mM Na-Ascorbat
Elektronenakzeptor:	90,0 µM Methylviologen (1,1-dimethyl-4-4-dipyridylchlorid)
PS II-Hemmstoff:	10,0 µM DCMU

#### Aktivitätsbestimmung des PS II

Elektronendonator:	H <sub>2</sub> O
--------------------	------------------

Elektronenakzeptor: 0,2 mM p-Phenylbenzochinon (Stammlsg. in Methanol)  
2,0 mM K-Ferricyanid [ $K_3Fe(CN)_6$ ]

## 2.2.10 Fluoreszenzuntersuchungen

Quantitative Analysen der Fluoreszenzausbeute in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungen von Proben wurden mit dem PAM-Fluorometer (HEINZ WALZ GmbH, BRD) nach SCHREIBER et al. (1986) durchgeführt. Eine qualitative Analyse der Fluoreszenzemission war durch die Aufnahme der Fluoreszenzemissions- und -excitationsspektren bei 293 K und 77 K am LS 50B Fluorometer (PERKIN ELMER, UK) möglich.

### 2.2.10.1 Pulse-Amplituden-Modulations-Meßprinzip (PAM)

Anhand der Chl a-Fluoreszenzmessung, einer nichtinvasiven, quantitativen, sehr empfindlichen und schnellen Methode zur Untersuchung der Photosynthese sowie photoprotektiver regulatorischer Prozesse, sollten Aussagen über das Wirken Fluoreszenz quencher Mechanismen in *Euglena gracilis* gewonnen werden. Weiterhin dienten diese Untersuchungen der Charakterisierung der Reaktionen des Photosyntheseapparates unbehandelte und carotinoidverarmte Zellen auf unterschiedliche Belichtung.

Da die Fluoreszenz aus den gleichen Anregungszuständen der Chlorophylle stammt die alternativ zur Photochemie genutzt werden oder Ausgangsstufen für strahlungslose Wärmedissipation sind, bestehen zwischen der Quantenausbeute der Fluoreszenz einerseits und der photochemischen Energieumwandlung und Wärmedissipation andererseits gesetzmäßige Beziehungen.

Die Fluoreszenzmessungen wurden in einem PAM-Chl a-Fluorometer (HEINZ WALZ GmbH, BRD) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Untersuchung der Chlorophyll a-Fluoreszenz intakter Zellen befanden sich diese im Ruhemedium pH 7,8. Die Zugabe von  $NaHCO_3$  (Endkonzentration: 10 mM) sorgte für ausreichend  $CO_2$  während des gesamten Versuchszeitraumes in der Probe. Die zu untersuchenden Chloroplasten befanden sich in dem unter 2.2.4 beschriebenen Reaktionsmedium. Die Chlorophyllkonzentration betrug maximal 20  $\mu g/ml$ , in der Regel jedoch 12  $\mu g/ml$ . Bei vergleichenden Versuchen unbehandelte und carotinoidverarmte Zellen wurden diese auf gleiche optische Dichte eingestellt, was annähernd gleicher Zellzahl entsprach. Dadurch lag die Chlorophyllkonzentration der carotinoidverarmten Zellen bei durchschnittlich bei 3-4  $\mu g/ml$ . Entsprechende Konzentrationsangaben sind in den Abbildungen enthalten.

Um zu Beginn der Messungen maximale Fluoreszenz detektieren zu können und somit einen nichtgequenchten Ausgangszustand der Algen bzw. Chloroplasten zu gewährleisten, mußten diese mit FR-Licht (Fernrot-LED 102 FR HEINZ WALZ GmbH, BRD) bestrahlt werden. Die Vorinkubation mit FR-Licht wurde bis zum Erreichen eines stabilen Maximalwertes der Fluoreszenz durchgeführt.

Die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) wurde durch ein schwaches Meßlicht (Meßpulsfrequenz: 1,6 kHz) ausgelöst, ein 900 ms Blitz einer Lichtintensität von 3000  $\mu mol/m^2/s$  führte zur maximalen Fluoreszenz ( $F_m$ ) der Probe. Durch die fünfarmige Faseroptik (101-F5, HEINZ WALZ GmbH) konnte zusätzlich ein in seiner Intensität variierbares aktinisches Licht (KI 1500 electronic,

SCHOTT, BRD) geschaltet werden. Eine 5 bzw. 20minütige Belichtung der Proben mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ,  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ,  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) wurde wahlweise über das Datenerfassungssystem DA 100 Version 3.0 oder einen Kompensationsschreiber L-250 (LINSEIS, BRD) registriert. Während der Belichtungsdauer wurde alle 90 s ein Lichtblitz ausgelöst.

**Tab.2** Berechnung der einzelnen Fluoreszenzparameter sowie Angabe der Literaturzitate;  $F_m$  = maximale Fluoreszenz;  $F_o$  = Grundfluoreszenz, keine Energetisierung der Membran;  $F_m'$ ;  $F_o'$ ;  $F_s$  = Fluoreszenz im steady state bei aktinischer Belichtung

Fluoreszenzparameter	Beschreibung	Berechnung	Literatur
<b><math>F_v/F_m</math></b>	maximale Quantenausbeute des PS II, (in der Regel dunkeladaptierte Probe, bei Euglena FR inkubiert)	$(F_m - F_o)/F_m$	KITAJIMA UND BUTLER (1975); BJÖRKMANN (1987); KRAUSE UND WEIS (1991)
<b><math>F_v'/F_m'</math></b>	Quantenausbeute des PS II im gequenchten Zustand (d.h. nach Ausschalten des AL bzw. im „recovery“)	$(F_m' - F_o')/F_m'$	GENTY et al. (1989); GILMORE UND YAMAMOTO (1991); KRAUSE UND WEIS (1991)
<b>yield (<math>\Phi_P</math>)</b>	effektive Quantenausbeute des PS II einer belichteten Probe (AL an)	$(F_m' - F_s)/F_m'$	GENTY et al. (1989); GILMORE UND YAMAMOTO (1991);
<b>qP</b>	photochemischer Quench, reflektiert Oxidationsgrad des PQ-Pools	$(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$	SCHREIBER et al. (1986); BÜCHEL UND WILHELM (1993)
<b>1-qP</b>	Redoxstatus des PQ-Pools; „excitation pressure on PS II“		PARK et al. (1996)
<b>qN</b>	nichtphotochemischer Quench	$1 - (F_m' - F_o')/(F_m - F_o)$	GENTY et al. (1989); BÜCHEL UND WILHELM (1993)
<b><math>SV_m</math> (NPQ)</b>	Stern-Volmer Quotient des nichtphotochemischen Quenches von $F_m$	$F_m/F_m' - 1$	BILGER UND BJÖRKMANN (1990); GILMORE UND YAMAMOTO (1991);

<b>SV<sub>0</sub></b>	Stern-Volmer Quotient des nichtphotochemischen Quenches von Fo	$F_0/F_0' - 1$	OLAIZOLA UND YAMAMOTO (1994), THIELE et al.(1997)  GILMORE UND YAMAMOTO (1991); OLAIZOLA UND YAMAMOTO (1994), THIELE et al. (1997)
<b>qE<sub>SV</sub></b>	Energie-abhängiger Quench, verbunden mit einem transthylakoiden pH-Gradient	$F_{m'(de)}/F_{m'} - 1$ $F_{m'(de)} = F_{m'}$ deenergetisiert; erreicht durch Entkopplerzugabe	WEIS UND BERRY (1987);GILMORE UND YAMAMOTO (1991), KRAUSE UND WEIS (1991); THIELE et al. (1997)
<b>qI<sub>SV</sub></b>	Quench der Fluoreszenz durch Photoinhibierung	$F_m/F_{m'(rec)} - 1$ $F_{m'(rec)} = F_{m'}$ am Ende des „recovery“ ( 25 min FR)	KRAUSE UND WEIS (1991); THIELE et al. (1997)
<b>qT</b>	Quench der Fluoreszenz durch „state transitions“ *	$SV_m - (qI_{SV} + qE_{SV})$	QUICK UND STITT (1989); WALTERS UND HORTON (1991)

\* bei *Euglena gracilis* der Teil des nichtphotochemischen Quenches, welcher  $\Delta$ pH-unabhängig ist und mit ähnlichen Halbwertszeiten (HWZ) wie „state transitions“ relaxiert

Die Berechnung unterschiedlicher Fluoreszenzparameter wird in der Tab.2 aufgezeigt. Die Nomenklatur erfolgte in Anlehnung an VAN KOOTEN UND SNEL (1990).

Nach Belichtung der Proben wurden Experimente hinsichtlich des “recovery“ der Fluoreszenz durchgeführt. Während dieser Erholungsphase wurde die Probe mit FR bestrahlt.

Proben, die extern in Belichtungsküvetten unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt waren, wurden für die Fluoreszenzmessungen in die Küvette des PAM-Fluorometer pipettiert und nach Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> sofort vermessen.

Zur Bestimmung des  $\Delta$ pH-abhängigen Anteils des nichtphotochemischen Quenches wurde nach einer bestimmten Vorbehandlung der Probe Nigericin (Endkonzentration: 60  $\mu$ M) zugesetzt. Die Fluoreszenz wurde bis zum Erreichen eines Maximums detektiert, in der Regel war dieses 5 min nach Zugabe des Entkopplers der Fall.

Experimente zur Untersuchung des Einflusses von DTT (Endkonzentration: 50  $\mu$ M), einem Deepoxidaseinhibitor (DEMMIG-ADAMS, 1990; OLAIZOLA et al., 1994), wurden in der Belichtungsküvette des PAM-Fluorometer durchgeführt.

NaF, ein Phosphataseinhibitor, (Endkonzentration: 20 mM) wurde nach 20minütiger Belichtung bzw. Dunkelinkubation der Probe zugesetzt und der Einfluß auf die Relaxation der Fluoreszenz protokolliert.

Die Wirkung des PS II-Hemmstoffes DCMU (Endkonzentration: 50  $\mu\text{M}$ ) nach unterschiedlicher Behandlung der Algensuspension wurde nach 5minütiger Inkubation der Probe mit dem Hemmstoff gemessen.

### **2.2.10.2 Aufnahme der Emissions-und Excitationspektren bei 293 K und 77 K am Fluorimeter**

Die Fluoreszenzspektren bei Raum (293 K)- und Tieftemperatur (77 K) wurden am LS 50B Fluorimeter (PERKIN ELMER, UK) aufgenommen (PFÜNDEL UND MEISTER, 1996). Die Registriergeschwindigkeit betrug  $6,7 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , und in Abhängigkeit vom Signalrausch-Verhältnis wurden 4-10 Aufnahmen übereinander aufgenommen und geglättet. Die Messungen wurden in Heralux Quarzküvetten, Innendurchmesser 1 mm (HELLMA GmbH und Co., BRD), durchgeführt

Bei der Aufnahme der Emissionsspektren wurde eine Bandbreite von 15 nm für die Anregung und 4 nm für die Emission gewählt. Die Excitationspektren wurden mit einer Anregungsbandbreite von 4 nm und einer Emissionsbandbreite von 15 nm aufgenommen. Um den Einfluß von Streulicht zu reduzieren, wurde bei der Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren eine Filterkombination aus BG 28 (blauer Filter) und RG 1 (roter Filter) und bei den Excitationspektren eine Filterkombination BG 23 (blauer Filter) und RG 2 (roter Filter) (Filter: SCHOTT, BRD) in den Strahlengang gebracht. Wellenlängenabhängige Intensitätsschwankungen der Anregungsquelle wurden durch einen eingebauten Referenz-Photomultiplier korrigiert.

Für die Fluoreszenzmessungen an ganzen Zellen wurden die Proben unter flüssigem Stickstoff im vorgekühlten Mörsern und Pestill (77 K) pulverisiert. Unter diesen experimentellen Bedingungen ist die Fluoreszenzreabsorption bei eingesetzten Chlorophyllkonzentrationen unter  $3\mu\text{M}$  vernachlässigbar (WEIS, 1985). Die Messungen wurden bei geringeren Chlorophyllkonzentrationen durchgeführt. Diese sind der jeweiligen Graphik zu entnehmen. Einzelne Proben wurden in Glycerin vermessen (Excitationsspektrum S.70). Die zweite Ableitung einzelner Spektren erlaubte Rückschlüsse auf Fluoreszenz emittierende Komplexe (LEBEDEV et al. 1988; ŠIFFEL UND ŠESTÁK, 1988)

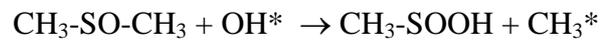
Um die Fluoreszenz der einzelnen Pigment-Proteinkomplexe zu analysieren, wurden diese nach gelelektrophoretischer Trennung in gleich großen Streifen aus dem Gel geschnitten und in die Quarzküvetten apliziert.

### **2.2.11 Absorptionsspektren bei Raumtemperatur**

Raumtemperatur-Absorptionsspektren von isolierten Pigment-Proteinkomplexen wurden mit dem Zweistrahlphotometer Uvikon 931 aufgenommen. Nach gelelektrophoretischer Trennung wurden die Pigmentproteinkomplexe aus dem Gel geschnitten und in Quarzküvetten, wobei auf eine gleichmäßige und vergleichbare Haftung des Gelstückes an der Innenwand der Küvette geachtet wurde, in einem Wellenlängenbereich von 380 - 720 nm vermessen. Als Referenz diente ein Stück Polyacrylamidgel.

### 2.2.12 Kolorimetrische Bestimmung der Methylsulfinsäurekonzentration (Nachweis der Hydroxylradikalbildung)

Hydroxylradikale reagieren mit DMSO unter Bildung eines stabilen Reaktionsproduktes -der Methylsulfinsäure- und eines Methylradikals.



Diese Reaktion kann zum quanti- und qualitativen Nachweis von Hydroxylradikalen benutzt werden, da Methylsulfinsäure mit Fast-blue-RR-Dinatriumsalz (einem -SH Reagenz) zu einem charakteristischen gelben Reaktionsprodukt (Diazosulfonderivat) umgesetzt werden kann (BABBS et al. 1989). DMSO ist auch in hohen Konzentrationen für biologische Systeme nicht toxisch, wird in Gewebe schnell aufgenommen und verteilt und ist daher ein idealer Hydroxylradikalfänger (STEINER UND BABBS, 1990; SCADUTO, 1995). Im einzelnen wurde nach den Angaben von TSCHERSCH UND OHMANN (1993) verfahren.

Der aus den belichteten Proben (Reaktionsmedium siehe 2.2.4; Reaktionsvolumen 1ml) nach dem Abzentrifugieren (4 min bei 15000 U/min; SIGMA Zentrifuge 3 K 15, Winkelrotor) erhaltene Überstand wurde mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 2,5 eingestellt. Anschließend wurden 100 µl einer 30 mM Fast-blue-RR-Salzlösung (vor Messung frisch hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt) zugegeben und 10 min im Dunkeln inkubiert. Durch Ausschütteln (Vortex 60s) wurde das in der Dunkelinkubation gebildete Reaktionsprodukt in eine Mischung aus Toluol und n-Butanol (4:1) extrahiert. Eine Zentrifugation (30 sek bei 400 U/min; SIGMA Zentrifuge 3 K 12, Ausschwingrotor) sorgte für eine bessere Trennung der entstehenden zwei Phasen. Die obere Phase wurde mit 2 ml Butanol gesättigtem Aqua dest. gewaschen (Vortex 30 sek) und noch einmal zwecks Phasentrennung zentrifugiert. Zur Stabilisierung der Farbe wurde die obere Phase abgetrennt und mit 100 µl eines Gemisches von 5% (v/v) Essigsäure in Pyridin versetzt.

Die Messung der Extinktion bei 425 nm erfolgte sofort am M-40 Spektralphotometer (ZEISS, BRD). Der verwendete Extinktionskoeffizient (TSCHERSCH, 1992) war  $2088 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.13 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951). Ihr Prinzip beruht auf der Bildung eines blauen Farbkomplexes, hervorgerufen durch die Reaktion zwischen Tyrosin und dem Phenolreagenz nach Folin. Die Absorption des Farbkomplexes wurde bei 578 nm im Spektralphotometer Uvikon 931 (KONTRON Instruments, Italien) gemessen. Der Ermittlung des Proteingehaltes lag eine mit Humanserumalbumin aufgenommene Eichkurve zugrunde.

### 2.2.14 Elektrophorese der Pigment-Proteinkomplexe

Pigment-Proteinkomplexe aus Chloroplasten von *Euglena gracilis* wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese erhalten. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Methode eines elektrophoretischen Systems nach ANDERSON (1980). Im Unterschied zu diesem wurde von uns

kein SDS zur Solubilisierung sondern 2%iges (w/v) Decyl- $\beta$ -D-Maltosid in Probenpuffer als Detergenz in einem Verhältnis 1:40 Chlorophyll:Decyl- $\beta$ -D-Maltosid (w/w) verwendet (DREYFUSS UND THORNER, 1994). Die Durchführung der Trennung der Pigmentproteinkomplexe erfolgte in einem Midget-Elektrophoresesystem (PHARMACIA, Schweden).

Nach erfolgter Solubilisierung der Proben (5 min /Eisbad) wurde das Gelsystem, bestehend aus einem kurzen Sammelgel (0,1% SDS (w/v); max. 2 mm) und dem SDS freien Trenngel (6%iges Acrylamidgel), mit diesen beschickt. Pro Bahn wurden 10  $\mu$ g Chlorophyll aufgetragen. Die Trennung wurde bei 2-4°C im Dunkeln und konstanter Spannung (75 V) durchgeführt. Optimal waren die einzelnen Pigment-Proteinkomplexe nach 1,5 h voneinander getrennt.

Waren die Proteine der einzelnen Pigment-Proteinkomplexe Gegenstand weiterer Untersuchungen, so wurde entweder die gesamte Bahn des nativen Gels oder die ausgeschnittenen Bänder denaturiert und einer erneuten Elektrophorese (SDS-PAGE; siehe Kap. 2.2.15) unterzogen.

### Modifiziertes „Anderson-System“ zur Trennung der Pigment-Proteinkomplexe

#### Solubilisierung der Proben:

Probenpuffer:	300 mM TRIS/HCL, 13% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) Decyl- $\beta$ -D-Maltosid
Probenbehandlung:	5 min, Eisbad

#### Elektrophorese:

Trenngel 6%:	7,0 ml Acrylamid (30% : 58,4 g Acrylamid, 1,6 g N,N'-methylenbisacrylamid ad 200 ml Aqua dest.) 10,20 ml Aqua dest. 17,50 ml 430 mM TRIS/HCL, pH 9,35 17,50 $\mu$ l TEMED 0,35 ml 10% Ammoniumpersulfat (w/v)
--------------	---

#### Sammelgel:

0,96 ml Acrylamid (siehe Trenngel)
2,64 ml Aqua dest.
3,60 ml 112 mM TRIS/SO <sub>4</sub> , pH 6,14
72,00 $\mu$ l 10% SDS (w/v)
4,00 $\mu$ l TEMED
72,00 $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat (w/v)

#### Elektrodenpuffer:

„lower“:	215,0 mM TRIS/HCL, pH 9,35
„upper“:	41,0 mM TRIS/BORAT, pH 8,64

#### Bedingungen:

75 V, 1,5 h, 2-4°C, Dunkel

#### Geräte:

temperierbares Midget-Elektrophoresesystem (PHARMACIA, Schweden)

### 2.2.15 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der Thylakoidmembranen bzw. den Auswirkungen des Lichtes auf Komponenten des Photosyntheseapparates setzten wir die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) als biochemisches Trennverfahren ein. Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen wurden nach Vorschriften von LAEMLI (1970) erstellt. Dabei kam ein thermostierbares Midget-Gelelektrophoresesystem (PHARMACIA, Schweden) zum Einsatz, welches mit seinen nur 5,5 x 8,3 cm großen Gelen eine kurze Laufzeit gewährleistete. Die Trennung erfolgte in 16%igen Gelen. Die Sammelgele enthielten 5% Acrylamid. Das Probenmaterial wurde mit SDS (1,6%ig; w/v) für 15 min bei 35°C denaturiert. Als Bezugsgröße diente die Zellzahl oder der Proteingehalt.

Handelte es sich um Gelstücke des nativen Elektrophoresesystems, so wurden diese, nach erfolgter Denaturierung, an den Anfang des Trenngel der SDS-PAGE gelegt.

Die Färbung der Proteinbanden wurde wahlweise mit Coomassie-Blau oder mit Silbernitrat durchgeführt.

### 2.2.16 Selektiver Proteinnachweis durch Western-Blot-Analyse

Nach Auftrennung von Proteinproben durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (LAEMLI, 1970) wählten wir für den selektiven Proteinnachweis die Methode des Western-Blots, für die eine kühlbare Fastblot-Apparatur B 33 (BIOMETRA, BRD) für semitrockenes Bloten zur Anwendung kam.

In einem ersten Schritt erfolgte sofort nach Beendigung der SDS-PAGE ein Elektrotransfer der Proteinfragmente auf eine Nitro-Zellulosemembran NC 45 (SERVA). Auf dieser können Proteine selektiv mit Antikörpern einen hochspezifischen Antikörper-Antigen-Komplex bilden. Der visuelle Nachweis erfolgte durch Zugabe eines sekundären Antikörpers, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Dieses Enzym katalysiert eine Farbkomplex bildende Reaktion.

Die verwendeten Antikörper sind nachfolgend zusammengestellt und beschrieben:

**Tab.3** Verwendete Antikörper für selektive Proteinnachweise

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>bezogen von:</b>
<b>D1</b>	Spinacea oleracea	Prof. Dr. U. Johanningmeier
<b>CP 47</b>	Spinacea oleracea	Prof. Dr. U. Johanningmeier
<b>LHC II</b>	Machantia polymorpha	PD Dr. Ch. Schäfer
<b>LHC I</b>	Chenopodium rubrum	PD Dr. Ch. Schäfer

#### Transfer der Proteine auf Nitrozellulose NC 45

Transferpuffer: 25 mM TRIS, 150 mM Glycin, 10% Methanol (v/v)  
 Transferbedingungen: konstante Stromstärke, 75 mA, 40 min, 6°C  
 Geräte: kühlbare Fastblot®-Apparatur B33 (BIOMETRA, BRD)

Immunodetektion

TBT-Lösung:	50 mM TRIS/HCL pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,2% TWEEN 20 (v/v)
Blockierungspuffer:	20 ml TBT (TRIS-Puffer-TWEEN)-Lösung, 5% Magermilchpulver FREMA-Reform (w/v), 0,02% NaN <sub>3</sub> (w/v)
Inkubationsschritte:	<ul style="list-style-type: none"> <li>-dreimaliges Waschen mit TBT-Lösung</li> <li>-Abblocken freier Bindungsstellen mit Blockierungspuffer, 2h</li> <li>-Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper in Blockierungspuffer 0,04% (v/v)</li> <li>-dreimaliges Waschen mit TBT-Lösung, 20 min</li> <li>-Inkubation mit sekundärem Antikörper (CALBIOCHEM, USA), 90min</li> <li>-dreimaliges Waschen mit TBT-Lösung, je 15 min</li> <li>-Farbreaktion mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Nitro-blue Tetrazolium (CALBIOCHEM) in 100 mM TRIS/HCL pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>-Abstoppen des Färbvorgang mit 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA in TBT-Lösung</li> </ul>

**2.2.17 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse**

Die einzelnen Experimente wurden mehrfach wiederholt, wobei versucht wurde, biologisches Material in gleichem physiologischem Zustand zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit werden von uns Mittelwerte der erhaltenen Daten, die Anzahl der Einzelversuche (n) sowie der Standardfehler (S) des Mittelwertes (durch  $\pm$  gekennzeichnet) angegeben.

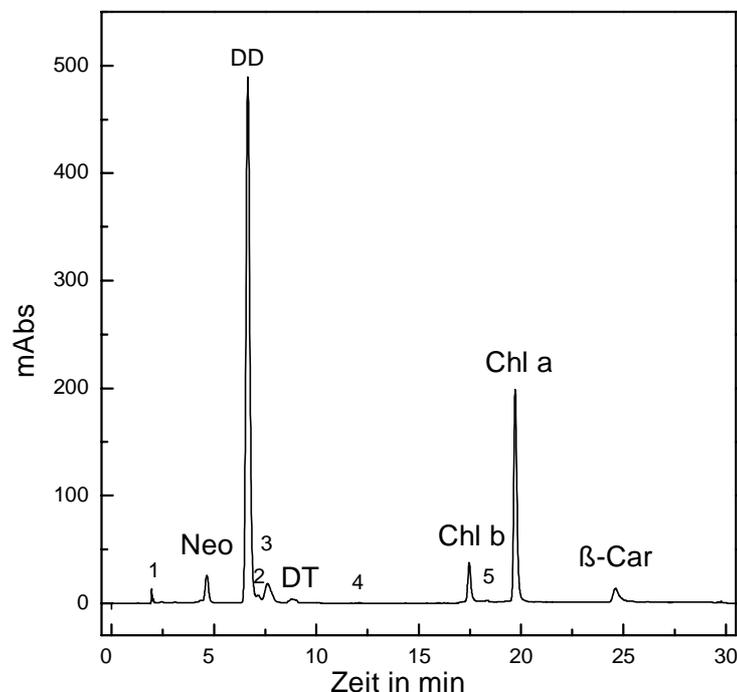
### 3. ERGEBNISSE

Im ersten Teil der Darstellung der Ergebnisse wird die Auswirkung der Variation des Anzuchtlichtes und der Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten in der stationären Phase der Algenkulturen behandelt. Schwerpunkte der Betrachtungen bilden hier der Einfluß unterschiedlicher Belichtungsintensitäten auf den Pigmentgehalt bzw. die Ausstattung mit Pigment-Proteinkomplexen sowie die Auswirkungen auf verschiedene Photosyntheseparameter.

Die weiteren Kapitel zeigen Resultate der Experimente, welche zur Klärung der Ursache des nichtphotochemischen Quench der Chlorophyllfluoreszenz dienen. Untersuchungen an carotinoidverarmten Zellen sollen den Beitrag der Carotinoide innerhalb regulatorischer, photoprotektiver Prozesse sowie die Rolle dieser Substanzen am nichtphotochemischen Quench demonstrieren. Da *Euglena gracilis* im Vergleich zu Grünalgen und höheren Pflanzen ein abweichendes Fluoreszenzverhalten zeigt, waren Experimente erforderlich, die diese Phänomene beschreiben bzw. erklären.

#### 3.1 Einfluß von Licht auf photosynthetische Leistungen und Strukturen

##### 3.1.1 Die Pigmentausrüstung von *Euglena gracilis* und Abhängigkeit photosynthetischer Parameter von der Lichtintensität während des mixotrophen Wachstums



**Abb.1** HPLC-Chromatogramm von *Euglena gracilis* (445 nm) (mixotroph, 6d, 25°C, 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )

Peak 1: Chlorophyllid a

Peak 2: Furanoxid des DD

Peak 3: cis-DD

Peak 4: Canthaxanthin

Peak 5: Echinenon

Im Gegensatz zu Vertretern der Grünalgen enthält *Euglena gracilis* als Hauptcarotinoid Diadinoxanthin, ein Monoepoxid, welches u.a. für Algen des marinen Phytoplanktons den Diatomeen und Prymnesiophyten (LIAAEN-JENSEN, 1978) beschrieben ist. Neben dem Diadinoxanthin ist auch Diatoxanthin in *Euglena gracilis* vorhanden. Damit kommen beide Pigmente eines alternativ zum Violaxanthinzyklus beschriebenen Zweikomponenten-Carotinoidzyklus (HAGER, 1970; ARSALANE et al., 1994; OLAIZOLA et al., 1994) in dieser Alge vor. Von anderen Algen ist bekannt, das bei Vorhandensein dieses Zyklus unter exzessivem Licht eine Deepoxidase aktiviert wird, welche Diadinoxanthin in das epoxidfreie Pigment Diatoxanthin überführt.

Der Carotinidgehalt in Abhängigkeit von der Lichtintensität während des Wachstums ist in der Tab.4 dargestellt.

**Tab.4** Pigmentgehalt der Alge *Euglena gracilis*; Wachstum 6d bei unterschiedlichen Lichtintensitäten; Angaben in  $\mu\text{g}/10^6$  Zellen; Standardfehler ist in Abb.2 dargestellt

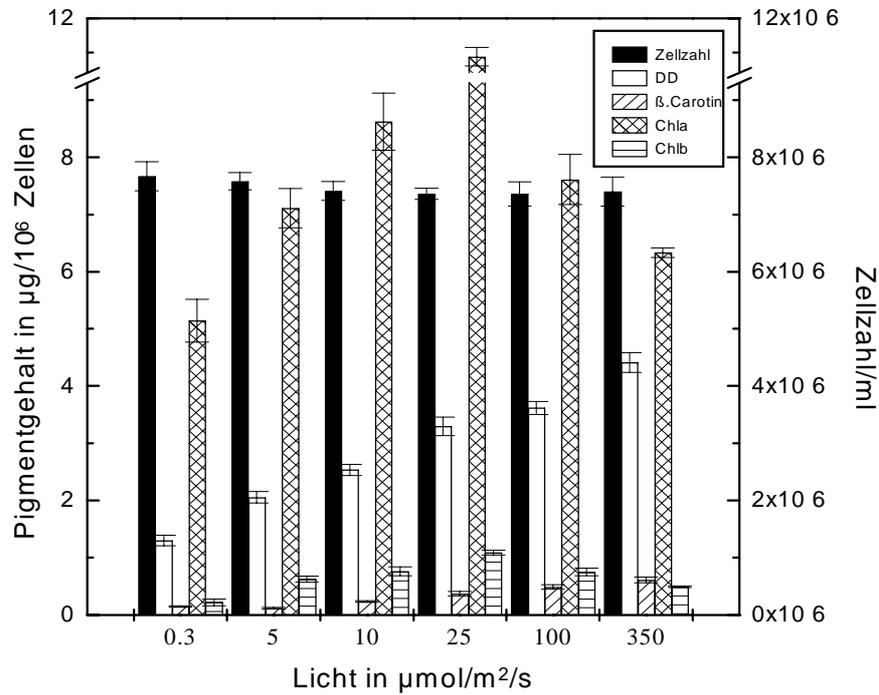
	0,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
<b>Neoxanthin</b>	0,051	0,068	0,123	0,240	0,218	0,221
<b>Diadinoxanthin</b>	1,290	2,051	2,536	3,297	3,610	4,415
<b>Diatoxanthin</b>	0,071	0,108	0,023	0,024	0,018	0,020
<b>Canthaxanthin</b>	n.b.	n.b.	n.b.	0,008	0,021	0,085
<b><math>\beta</math>-Carotin</b>	0,148	0,116	0,236	0,370	0,489	0,610
<b>Chlorophyll a</b>	5,145	7,113	8,622	10,879	7,611	6,332
<b>Chlorophyll b</b>	0,229	0,625	0,761	1,089	0,747	0,494
<b><math>\Sigma</math> Carotinoide</b>	1,560	2,340	2,918	3,930	4,418	5,449
<b><math>\Sigma</math> Car/<math>\Sigma</math> Chl</b>	0,290	0,302	0,310	0,328	0,528	0,798
<b>Chl a / Chl b</b>	23,230	11,360	11,340	9,980	10,180	12,800

Außer den in der Tab.4 zusammengefaßten Pigmenten wurden in sehr geringen Mengen auch Echinenon und  $\beta$ -Cryptoxanthin gefunden. Echinenon hatte einen Anteil von 0,09% und  $\beta$ -Cryptoxanthin von 0,05% am Gesamtcarotinidgehalt bei einer Anzucht der Algen bei 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

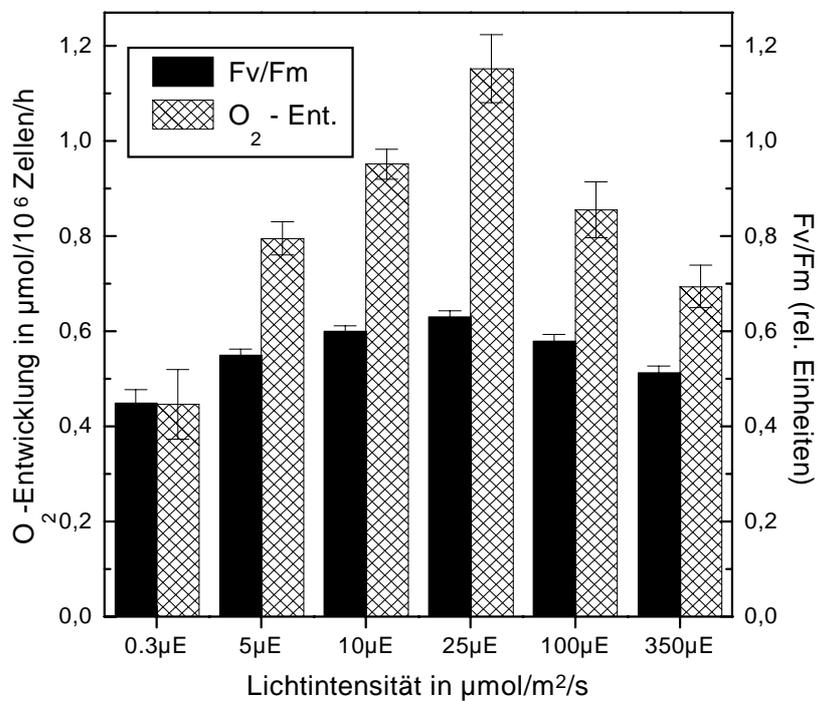
Die in Abb.2 dargestellten Ergebnisse zeigen den Einfluß des Lichtes auf das Wachstum und verschiedene Pigmente der Algen. Unabhängig von der Belichtungsintensität verhielt sich die Zellzahl pro Milliliter Anzuchtmedium. Eine massive Zunahme des Diadinoxanthin und des  $\beta$ -Carotins in Abhängigkeit von der Intensität des Anzuchtlichtes wird deutlich. Ebenso nahm Canthaxanthin mit steigender Belichtungsintensität zu (Tab.4). Die Chlorophylle a und b erreichten bei einer Anzucht bei 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  die maximalen Werte und somit lag unter diesen Bedingungen das niedrigste Chl a/b-Verhältnis vor. Charakteristisch war, daß das Chlorophyll a/b-Verhältnis höher ist als bei höheren Pflanzen und vielen Grünalgen. Der Gehalt an Neoxanthin lief parallel zu dem der Chlorophylle und zeigte die gleiche Abhängigkeit vom Anzuchtlicht. Mit zunehmender Lichtintensität stieg das Verhältnis vom Gesamtcarotinidgehalt zum Gesamtchlorophyllgehalt.

Für höhere Pflanzen ist das Verhältnis von  $\Sigma\text{Chl}/\Sigma\text{Car}$  mit 5,5-5,4 beschrieben (BASSI et al. 1993; FLACHMANN, 1997). Für die Anzuchtintensitäten bis 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  lag dieser zwischen

3,4-3,0. Erst bei den höheren Lichtintensitäten (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und 350  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) sank dieses Verhältnis auf 1,88 bzw. 1,2 (nicht dargestellt).



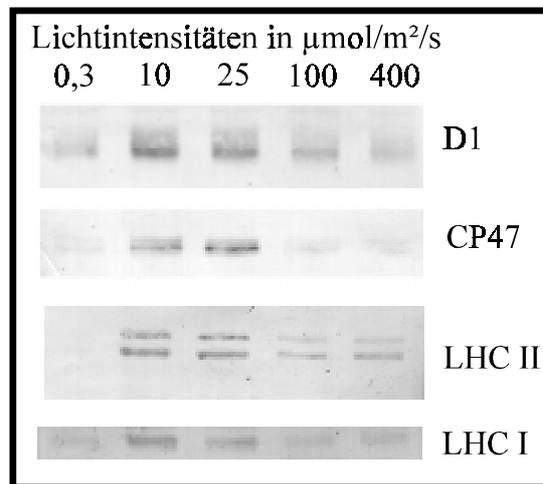
**Abb.2** Einfluß der Lichtintensität auf einzelne Carotinoide und Chlorophylle sowie die Zellzahl/ml Kulturmedium während des mixotrophen Wachstums ; n = 5-12



**Abb.3** Einfluß der Lichtintensität auf den Quotienten Fv/Fm (rel. Einheiten) sowie auf die photosynthetische Sauerstoffentwicklung in  $\mu\text{mol}/10^6$  Zellen/h während des mixotrophen Wachstums; n = 4

Eine Belichtung mit einer Intensität über  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  führte zu einer Abnahme des Quotienten  $F_v/F_m$  und zur Reduzierung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung (vgl. Abb.3). Parallel dazu war der Chlorophyllgehalt verringert.

Weiterhin verursachte eine Belichtung bei höheren Intensitäten als  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  Algenzellen, mit einem reduzierten Gehalt an D1-Protein, CP47, LHC II und LHC I. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Algen generell bei  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  angezogen (Abb.4).



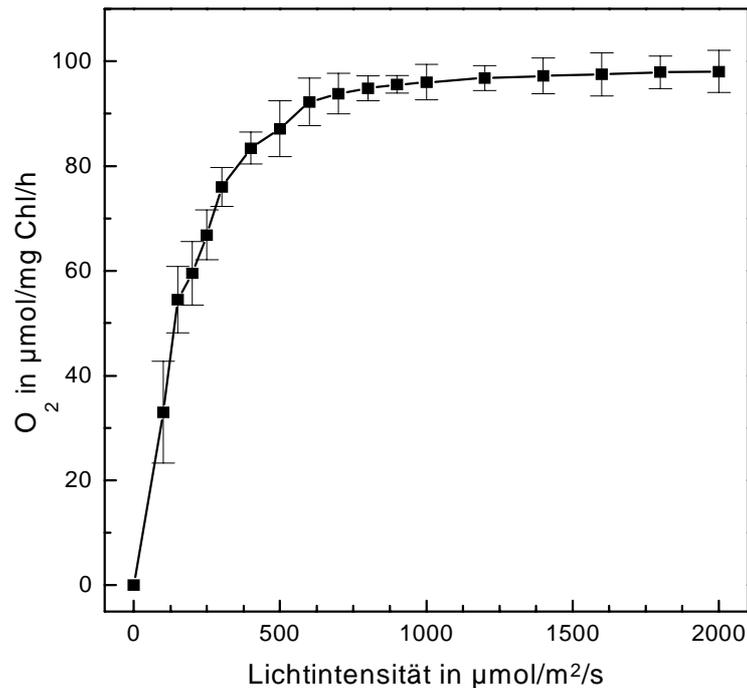
**Abb.4** Immunologische Untersuchung des D1-Protein, des CP47, des LHC II und des LHC I nach Anzucht unter unterschiedlichen Lichtintensitäten; pro Bahn wurden die Proteine aus  $10^6$  Zellen aufgetragen

### 3.1.2 Auswirkungen von unterschiedlichen Lichtintensitäten auf mixotroph gewachsenen Zellen von *Euglena gracilis*

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß eine Verminderung des Carotinoidgehaltes durch Einsatz eines Phytoendesaturaseinhibitors die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Licht stark erhöht (PANZER, 1990). Ausgehend von der beabsichtigten Aufklärung der Rolle der Carotinoide bei photoprotektiven Prozessen war es notwendig, die Auswirkungen von Licht unterschiedlicher Intensitäten auf photosynthetische Parameter unbehandelter Zellen zu untersuchen. Maßgeblich für die Auswahl der eingesetzten Lichtintensitäten war die Sättigung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung (siehe Abb.5).

Wir wählten für die Belichtungsversuche Intensitäten a) unterhalb der Lichtsättigung (10 und  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ); b) im Bereich der Lichtsättigung (290 und  $630 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) und c)  $1400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  als Starklicht aus.

Die Messung der Chlorophyll a-Fluoreszenz erlaubt Einblicke in die Nutzung absorbiertes Lichtenergie zur Photosynthese (KRAUSE UND WEIS, 1991). Emittiert wird die Raumtemperaturfluoreszenz hauptsächlich aus dem PS II. Die Löschung der Chlorophyll a-Fluoreszenz ist zum einen photochemischer, zum anderen nichtphotochemischer Natur. Der nichtphotochemische Quench spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Pflanzen vor exzessivem Licht (DEMMIG-ADAMS, 1990; HORTON et al., 1994).



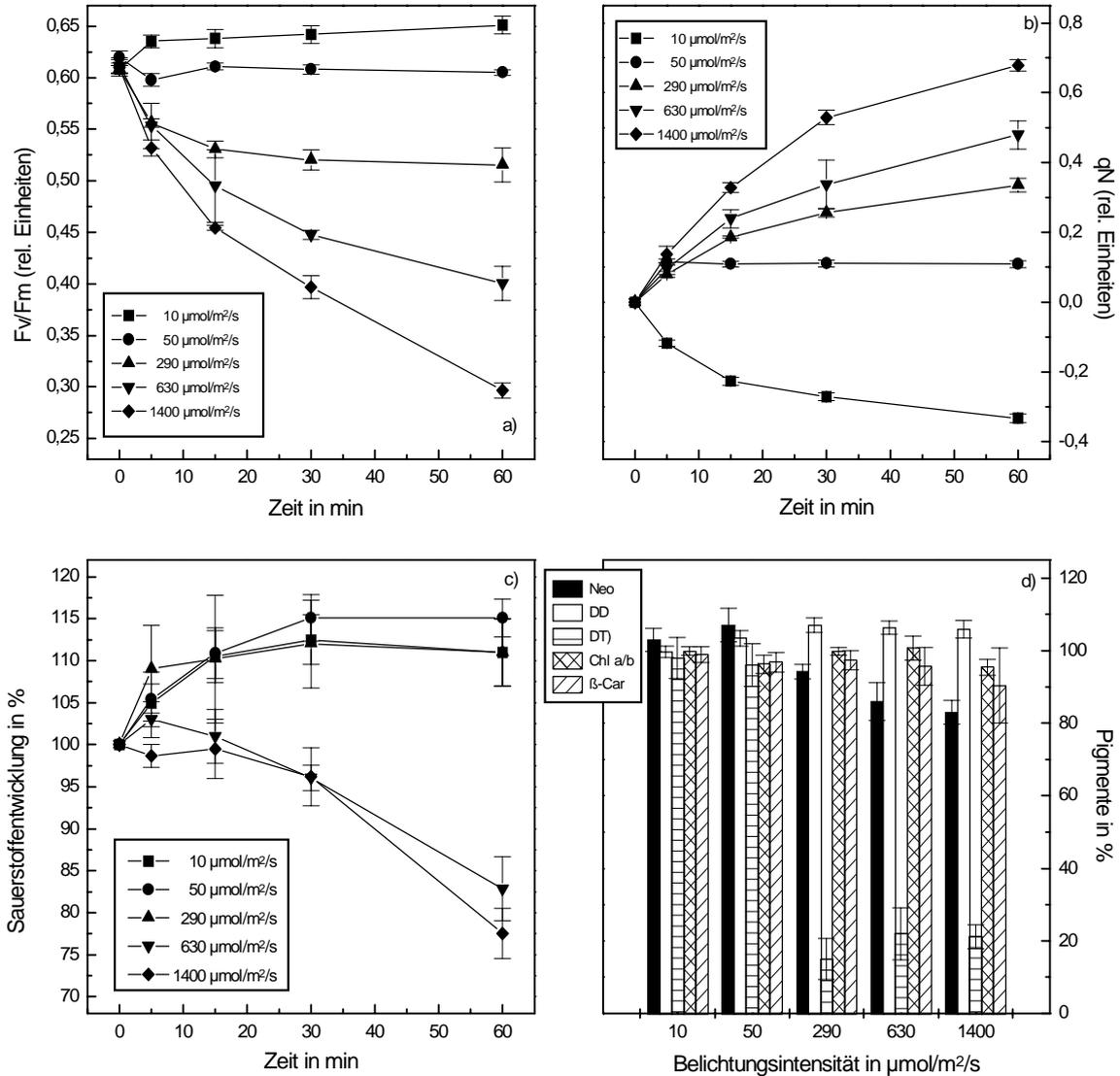
**Abb.5** Lichtsättigungskurve der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung mixotropher Zellen von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration 20µg/ml; n = 5

In den Abb.6 a) bis c) ist die Auswirkung unterschiedlicher Belichtungsintensitäten auf den Quotienten  $F_v/F_m$  im Dunkeln bzw.  $F_v'/F_m'$  bei Belichtung als Maß für die Quantenausbeute des PS II (KRAUSE UND WEIS, 1991; SCHREIBER et al., 1995), die nichtphotochemische Löschung der Fluoreszenz und die photosynthetische Sauerstoffentwicklung dargestellt. Vor Beginn der Belichtungsexperimente wurden die Zellen 30 min dunkeladaptiert.

Das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz sinkt a) mit zunehmender Belichtungsdauer der unterschiedlichen Belichtungsintensitäten und b) bei zunehmender Belichtungsintensität. Der gleiche Zusammenhang zeigte sich bei der nichtphotochemischen Löschung der Fluoreszenz. Dieses galt jedoch nicht für die Belichtung mit Schwachlicht (10 µmol/m²/s). Schwachlicht führte offenbar zu einer Effektivierung des Photosyntheseapparates von *Euglena gracilis*. Der Quotient  $F_v/F_m$  stieg in den ersten Minuten der Belichtung an und blieb auf diesem Niveau konstant. Der negative Wert für den nichtphotochemischen Quench führte zu der Aussage, daß auch im dunkeladaptierten Zustand eine Energetisierung der photosynthetischen Membranen ähnlich wie bei *Phaeodactylum tricornutum* (TING UND OWENS, 1993) oder *Chlamydomonas reinhardtii* (ENDO UND ASADA, 1996) vorliegen muß oder ein anderer,  $\Delta pH$ -unabhängiger Mechanismus zur Fluoreszenzabnahme führt.

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung nimmt bei einer Belichtungsintensität von 630 µmol/m²/s nach 60minütiger Belichtung um 15,2% deutlich ab. Bei der Belichtung mit Starklicht (1400 µmol/m²/s) (Abb.6 c) zeigte sich die höchste Schädigung. Es ist offensichtlich, daß es unter diesen Belichtungsbedingung zum Auftreten photoinhibitorischer Prozesse kommt. Der Anstieg der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung bei schwächeren Belichtungsintensitäten wies auf eine Optimierung der Photosynthese, im Vergleich zur dunkeladaptierten Probe durchschnittlich um 10% hin. Bei einer Belichtung mit 10 µmol/m²/s wurde diese Optimierung auch bei Betrachtung der Fluoreszenzdaten offenbar. Die Belichtung mit 50 bzw. 290 µmol/m²/s führte zu keiner Erhöhung des Quotient  $F_v/F_m$ , jedoch war ein Anstieg der Sauerstoffentwick-

lung festzustellen. Im Vergleich zur Sauerstoffentwicklung war die Fluoreszenz ein empfindlicherer Parameter, um Änderungen in der Photochemie des PS II zu registrieren.



**Abb.6** Einfluß von 60minütiger Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten auf Fv/Fm 6a); qN 6b); Sauerstoffentwicklung (100%:  $97,9 \pm 2,5 \mu\text{mol/mg Chl/h}$ ) 6c) und den Pigmentgehalt (100% siehe Tab.4) 6d) unbehandelter Zellen von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration  $20\mu\text{g/ml}$ ; n=4-7

Zu einer Reduzierung des D1-Protein als dem zentralen Protein des PS II (Daten nicht gezeigt) kam es innerhalb 60minütiger Bestrahlung mit Starklicht nicht.

In Abb.6 d) ist der Einfluß des Lichtes auf die wichtigsten Pigmente dargestellt. Der Chlorophyllgehalt der Proben blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant.

Ab einer Belichtung mit der Intensität von  $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  kam es zu einer Erhöhung des Diadinoxanthins um ca. 6%. Der Gehalt an Diatoxanthin war dagegen extrem reduziert. Es kam unter keiner der eingesetzten Lichtintensitäten zu einer Zunahme des Diatoxanthins. Dieses müßte jedoch der Fall sein, wenn in *Euglena gracilis* ein Diadinoxanthinzyklus aktiviert werden könnte. Um diesen Fakt zu untermauern und um auszuschließen, daß eine mögliche Erhöhung des DT

durch dessen starken Abbau überlagert ist, wurde der Einfluß von DTT auf die Fluoreszenzparameter untersucht.

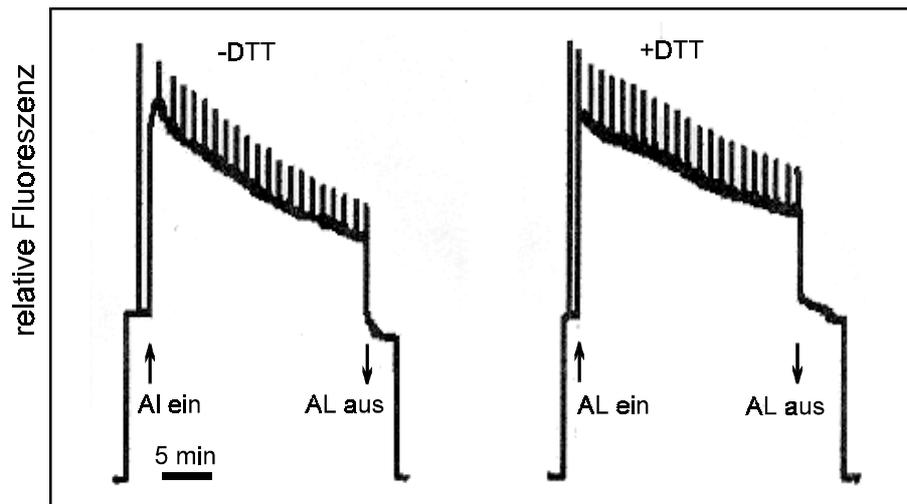
### 3.1.3 Einfluß von DTT auf qN und die Pigmente

Im Unterschied zu den unter 3.1.2 vorgestellten Ergebnissen wurden diese Versuche in der Belichtungsküvette der PAM durchgeführt.

DTT inhibiert die Violaxanthin-Deepoxidase (DEMMIG-ADAMS, 1990; PFÜNDEL UND BILGER 1994). Die Inhibierung der Carotinoid-Deepoxidation durch DTT wurde auch für den Diadinoxanthinzyklus nachgewiesen (OLAIZOLA et al. 1994).

Für diese Versuche wählten wir eine mittlere Belichtungsdauer und -intensität, um die Effekte der Photoinhibierung und dem damit verbundenen Auftreten von  $qI_{SV}$ , einem möglichen Teil des nichtphotochemischen Quench, möglichst gering zu halten. Innerhalb der 21minütigen Belichtung mit  $600 \mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2/\text{s}$  kommt es zu einer 46% Löschung der maximalen Fluoreszenz.

Die Abb.7 zeigt einen Fluoreszenzverlauf mit und ohne DTT. Trotz Anwesenheit der Substanz während der Belichtung trat ein Quench der Chlorophyllfluoreszenz auf.



**Abb.7** Wirkung von DTT ( $50 \mu\text{M}$ ) auf die Chlorophyll a-Fluoreszenz von *Euglena gracilis* während 20minütiger Belichtung mit einer Intensität von  $600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; Chl-Konzentration  $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; Proben 10 min vor Belichtung dunkeladaptiert

Die Tab.5 enthält die Daten unterschiedlicher Fluoreszenzparameter und den prozentualen Gehalt von Diadinoxanthin und Diatoxanthin nach der Belichtung. Im Vergleich zur unbehandelten Probe ist der qN um 16,1% geringer. 83,9% der nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz sind DTT insensitiv. Der  $F_0$ -Quench ist um 55,30% verringert. Generell zeigt auch dieser Versuch, daß sich qN unabhängig von einer Pigmentumwandlung entwickelt.

Um sicher zu sein, daß DTT in die Zelle aufgenommen wird, wurde dieser Versuch an Chloroplasten wiederholt (Daten nicht gezeigt). Das Experiment bestätigte die dargestellten Ergebnisse.

**Tab.5** Lichtinduzierte Veränderungen von Chlorophyll a-Fluoreszenzparametern und dem Gehalt von Diadino- bzw. Diatoxanthin ohne DTT und in Anwesenheit von DTT (50 $\mu$ M) während der Belichtung mit 600  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s (20 min); Proben 10 min vor Belichtung dunkeladaptiert

	-DTT	+DTT
Fv/Fm	0,619	0,615
qN	0,519	0,435
NPQ (SVm)	0,578	0,401
SV <sub>o</sub>	0,132	0,059
Fv'/Fm'	0,470	0,487
qP	0,276	0,298
yield	0,130	0,145
Diadinoxanthin%	101,660	102,960
Diatoxanthin%	19,670	19,280

### 3.2 Blockierung der Carotinoidbiosynthese während es mixotrophen Wachstums - Einfluß von Licht auf carotinoidverarmte Zellen

Da *Euglena* keine Pigmentumwandlung unter verschiedenen Belichtungsbedingungen zeigt und somit die schützende Wirkung der Carotinoide noch unklar erscheint, schien es uns um so wichtiger a) die protektiven Effekte der Carotinoide auf die Stabilität struktureller Chloroplastenkomponenten und b) die Abhängigkeit der nichtphotochemischen Löschung der Fluoreszenz vom Carotinoidgehalt zu untersuchen.

#### 3.2.1 Einfluß des Carotinoidgehaltes auf strukturelle und physiologische Komponenten photosynthetischer Membranen

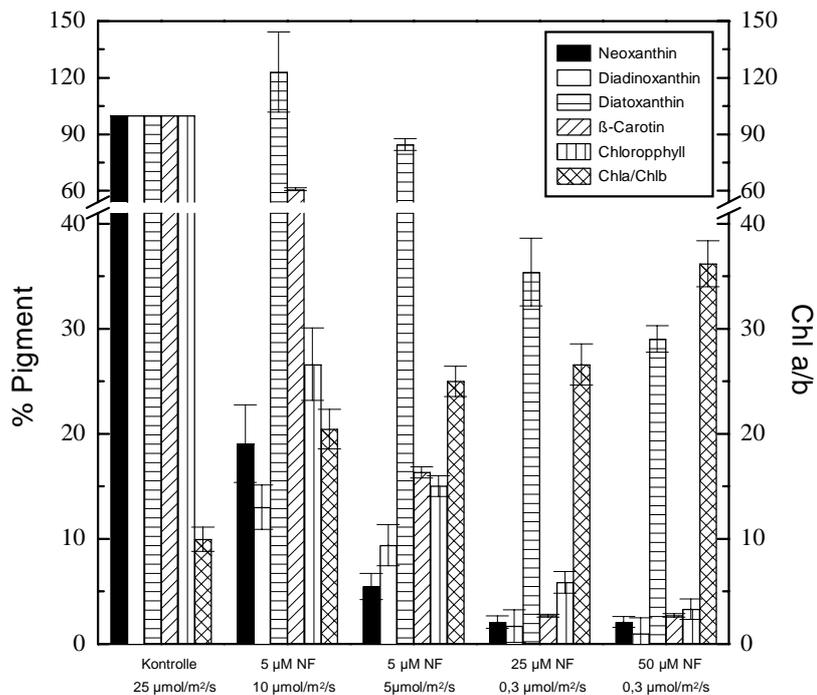
##### 3.2.1.1 Hemmung der Carotinoidbiosynthese durch unterschiedliche Norflurazonkonzentrationen

Die Blockierung der Carotinoidebiosynthese auf der Stufe des Phytoens ist durch Norflurazon (ein Wirkstoff aus der Gruppe der 2-Phenylpyridazinone) zu erreichen (VAISBERG UND SCHIFF, 1976; SANDMANN, 1980). Der I<sub>50</sub>-Wert für die photosynthetische Sauerstoffentwicklung bei *Euglena* liegt bei 20  $\mu$ M NF und für die Hemmung der Ergrünung bei 0,35  $\mu$ M (PANZER 1990).

Zunächst sollte geklärt werden, welchen Einfluß ein differenzierter Carotinoidgehalt auf photosynthetische Strukturen besitzt.

In der Abb.8 ist der Carotinoidgehalt in Abhängigkeit von der Norflurazonkonzentration im Nährmedium während des mixotrophen Wachstums im Vergleich zur Kontrolle (Wachstum ohne Norflurazon) dargestellt. Der Einsatz von Norflurazon erforderte eine Verringerung der Intensität des Anzuchtlichtes, um sekundäre Folgeschäden der Carotinoidreduzierung möglichst gering zu halten. Da die Zellen während des mixotrophen Wachstums mit einer externen C-Quelle versorgt werden, ist das Wachstum nicht von der bei diesen Bedingungen geringen CO<sub>2</sub>-

Assimilation begrenzt. Um den Einfluß niedriger Belichtungsintensitäten zu untersuchen, wurden Zellen bei gleicher Norflurazonkonzentration, jedoch unterschiedlichen Lichtintensitäten angezogen. Eine Verringerung des Lichtes während des Wachstums führte zur zusätzlichen Reduzierung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes. Der Gehalt von Chlorophyllen und Carotinoiden ist bei gleicher Norflurazonkonzentration und geringerer Lichtintensität auf 50,13% bzw. 55,0% reduziert. Auch das Fv/Fm-Verhältnis und die photosynthetische Sauerstoffproduktion waren durch die Erniedrigung des Anzuchtlichtes verringert (Tab.6). Die höchste Lichtintensität, welche ein Wachstum bei Anwesenheit von Norflurazon erlaubte, war  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .



**Abb.8** Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen des Phytoendesaturaseinhibitors Norflurazon auf den Pigmentgehalt und das Chl a/b Verhältnis während des mixotrophen Wachstums im Vergleich zur unbehandelten Kultur (Kontrolle) (erhöhte NF-Konzentrationen erfordern die Verminderung des Anzuchtlichtes); absolute Werte siehe Tab.6;  $n = 3-6$

Mit steigender Norflurazonkonzentration sank der Gehalt der Carotinoide Neoxanthin und Diadinoxanthin. Dieser Abnahme folgte die Reduzierung des Chlorophyllgehaltes. Mit zunehmender Norflurazonkonzentration stieg das Chlorophyll a/b-Verhältnis. Die Summe der Carotinoide war bei der Anzucht mit  $5 \mu\text{M}$  NF und  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  im Vergleich zur Kontrolle um 79,5%, die der Chlorophylle um 69,8% verringert, jedoch das Verhältnis von Chlorophyll zu Carotinoide verringert sich nur wenig. Das Verhältnis von Diadinoxanthin zu Diatoxanthin sank von 173 in der Kontrolle auf 5,3 in der höchsten Norflurazonkonzentration (nicht dargestellt). Der Diatoxanthingehalt nahm bei der Anzucht mit  $5 \mu\text{M}$  Norflurazon und einer Intensität des Anzuchtlichtes von  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  um 21,5% zu und war bei höheren Konzentrationen von Norflurazon im Vergleich zu anderen Carotinoiden weniger reduziert.

Die Tab.6 enthält den Gehalt an Carotinoiden nach Anzucht in Gegenwart unterschiedlicher NF-Konzentrationen und die Auswirkungen des Carotinoidmangels auf das Verhältnis von Fv/Fm sowie die photosynthetische Sauerstoffentwicklung.

Höhere NF-Konzentrationen führten zu einem völligen Verlust der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung.

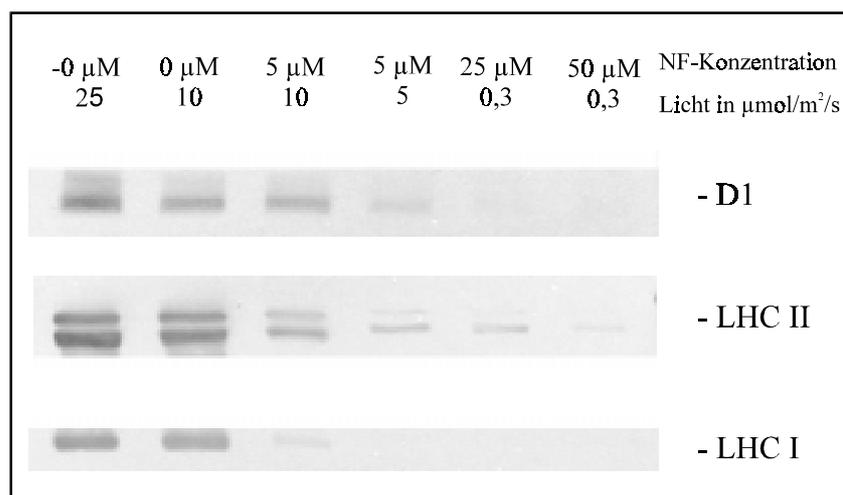
**Tab.6** Gehalt von Carotinoiden und Chlorophyllen in  $\mu\text{g}/10^6$  Zellen nach 6-tägigem Wachstum von *Euglena gracilis* in Gegenwart unterschiedlicher Norflurazonkonzentrationen und differenziertem Anzuchtlicht sowie der Einfluß des unterschiedlichen Carotinoidgehaltes auf Fv/Fm und die photosynthetische Sauerstoffentwicklung in  $\mu\text{mol O}_2/\text{h}/10^6$  Zellen, n = 3-6

	-NF / 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{S}$	+5 $\mu\text{M}$ NF 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	+5 $\mu\text{M}$ NF 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	+25 $\mu\text{M}$ NF 0,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	+50 $\mu\text{M}$ NF 0,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
<b>Neoxanthin</b>	0,23 $\pm$ 0,009	0,05 $\pm$ 0,002	0,01 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,0004	0,005 $\pm$ 0,0006
<b>Diadinoxanthin</b>	3,28 $\pm$ 0,015	0,48 $\pm$ 0,025	0,30 $\pm$ 0,020	0,056 $\pm$ 0,0020	0,033 $\pm$ 0,0008
<b>Diatoxanthin</b>	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,018	0,06 $\pm$ 0,005	0,008 $\pm$ 0,0001	0,006 $\pm$ 0,0007
<b><math>\beta</math>-Carotin</b>	0,37 $\pm$ 0,021	0,25 $\pm$ 0,009	0,06 $\pm$ 0,002	0,011 $\pm$ 0,0010	0,011 $\pm$ 0,0020
<b><math>\Sigma</math> Carotinoide</b>	3,91 $\pm$ 0,068	0,80 $\pm$ 0,057	0,44 $\pm$ 0,030	0,080 $\pm$ 0,0030	0,055 $\pm$ 0,0041
<b><math>\Sigma</math> Chlorophyll</b>	11,9 $\pm$ 0,091	3,59 $\pm$ 0,211	1,80 $\pm$ 0,056	0,705 $\pm$ 0,0520	0,399 $\pm$ 0,0211
<b>Chl a/b</b>	9,98 $\pm$ 0,851	20,4 $\pm$ 0,815	25,0 $\pm$ 0,659	26,61 $\pm$ 0,958	36,19 $\pm$ 1,2100
<b>DD/DT</b>	172 $\pm$ 2,140	20,8 $\pm$ 0,560	17,3 $\pm$ 0,960	7,60 $\pm$ 1,1000	5,33 $\pm$ 0,3020
<b>Fv/Fm</b>	0,62 $\pm$ 0,009	0,49 $\pm$ 0,014	0,38 $\pm$ 0,024	0,306 $\pm$ 0,0230	0,201 $\pm$ 0,0210
<b>O<sub>2</sub>-Produktion</b>	1,15 $\pm$ 0,110	0,35 $\pm$ 0,038	0,26 $\pm$ 0,060	-	-

Die Reduzierung der Chlorophylle ist als sekundärer Effekt der Norflurazonbehandlung beschrieben (FEIERABEND UND WINKLER-HEUSENER, 1982) und vermutlich allein der Tatsache geschuldet, daß die Schutzfunktion der Carotinoide, ein Ableiten exzessiver Energie von den Chlorophyllen, ausgeschaltet ist.

Um die Zellen weiter zu charakterisieren, wurden das D1-Protein und die LHC-Proteine immunologisch untersucht.

### 3.2.1.2 Immunologische Quantifizierung von Proteinen der photosynthetischen Membran in Abhängigkeit vom Carotinoidgehalt



**Abb.9** Einfluß des Carotinoidgehaltes von *Euglena gracilis* auf den Gehalt an D1-Protein, LHC II und LHC I (Western-Blots); 1 Mill. Zellen pro Bahn

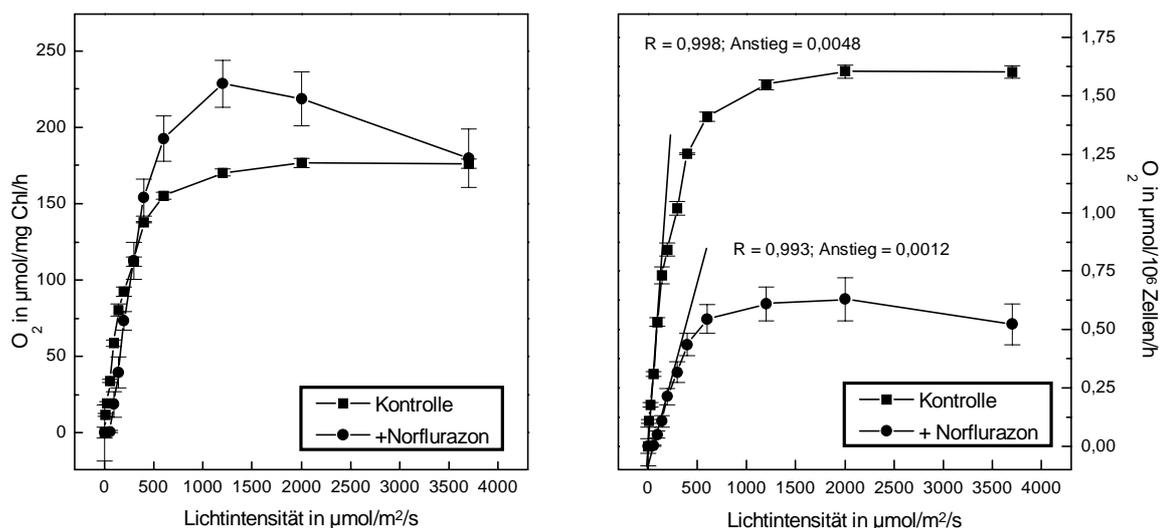
Für die weiteren Untersuchungen war eine genauere Charakterisierung der carotinoidverarmten Zellen hinsichtlich einzelner Membrankomponenten von Bedeutung. In der Abb.9 sind

die Western-Blots vom D1-Protein, LHC II und LHC I (Beschreibung der Antikörper siehe Tab.3) enthalten.

Carotinoide sind essentiell für den Aufbau aktiver PS II Einheiten (HUMBECK, 1989). In Anbetracht des drastischen Absinkens des Quotienten Fv/Fm und der Sauerstoffproduktion war anzunehmen, daß eine Blockierung des Carotinoidgehaltes zu einer starken Schädigung photosynthetischer Strukturen führt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse macht deutlich, daß die Carotinoide auch in *Euglena gracilis* essentiell für den Aufbau von aktiven PS II-Einheiten sind. Das Fehlen der Pigmente führt zur Reduzierung der LHC und des D1-Proteins. Dieses erklärt auch das Sinken von Fv/Fm sowie die Abnahme bzw. den Verlust der photosynthetischen Sauerstoffproduktion. Auch bei der niedrigsten Norflurazonkonzentration ist der Gehalt am D1-Protein bereits verringert. Eine zu starke Blockierung der Carotinoidbiosynthese führte zu Zellen, die nicht mehr photosynthetisch aktiv sind und allein aufgrund ihres mixotrophen Wachstums existieren können. Für die weiteren Experimente an carotinoidverarmten Zellen wurden Algen bei einer Lichtintensität  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und Zusatz von  $5 \mu\text{M}$  NF angezogen. Diese Bedingungen erlaubten uns, mit Zellen zu arbeiten, die deutlich weniger Carotinoide besaßen zwar eine Reduzierung der LHC-Proteine aufwiesen, jedoch photosynthetisch aktiv waren und eine gut meßbare Fluoreszenz emittierten.

### 3.2.2 Die Lichtsättigungskurve carotinoidverarmter Zellen

Die in Abb.10 dargestellten Lichtsättigungskurven für carotinoidverarmte und unbehandelte Zellen wurden in einer PAM-Küvette gemessen, welche die gleichzeitige Aufnahme der Fluoreszenz- und der Sauerstoffdaten möglich machte. Die unterschiedlichen Zellen wurden auf gleiche optische Dichte eingestellt.



**Abb.10** Lichtsättigungskurven der photosynthetischen Sauerstoffproduktion von *Euglena gracilis*; Kontrolle: Anzucht bei  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  -Norflurazon; carotinoidverarmte Zelle: Anzucht bei  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  +  $5 \mu\text{M}$  Norflurazon; a) Sauerstoffproduktion pro mg Chlorophyll; b) Sauerstoffproduktion pro  $10^6$  Zellen; n = 4-5

Mixotroph angezogene Zellen besitzen eine starke Atmungsaktivität. Um bei den schwachen Lichtintensitäten korrekte Werte für die Sauerstoffentwicklung bei carotinoidverarmten Zellen zu ermitteln, wurde der Einfluß der Atmung auf die gemessene Sauerstoffentwicklung korrigiert (HEINZE et al., 1996).

Die Berechnung des Lichtsättigungs-Parameters ( $I_k$ ) nach HENLEY (1993) aus dem Quotienten der maximalen, lichtgesättigten Photosyntheserate ( $P_m$ ) und  $\alpha$ , dem Anstieg der Lichtsättigungskurve unter limiterenden Belichtungsintensitäten;  $I_k [\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}] = P_m [\mu\text{molO}_2/\text{h}] / \alpha [\mu\text{mol O}_2/\text{h} \cdot (\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s})^{-1}]$ ; ergab für die unterschiedlichen Kulturen einen Lichtsättigungs-Parameter von 333  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  für die Kontrolle und 524  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  für die carotinoidverarmten Algen.

Der linearisierte Teil der Lichtsättigungskurve unter limitierenden Belichtungsintensitäten ist ein Maß für den absorptiven Querschnitt eines Systems (MELIS et al., 1996). Der flachere Anstieg der carotinoidverarmten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verdeutlicht, daß die Carotinoidverarmung zur Verkleinerung des absorptiven Querschnitts führte und damit auch den Lichtsättigungspunkt beeinflußt.

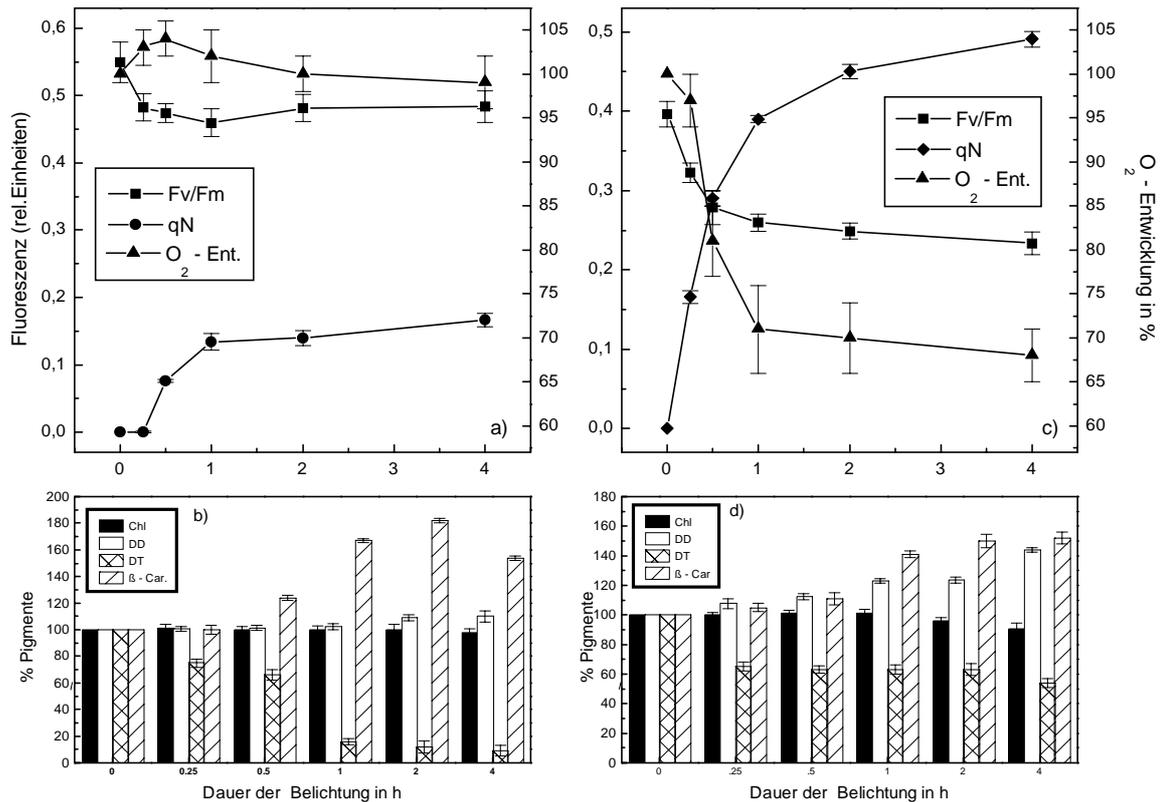
Deutlich wurde weiterhin, daß die Carotinoidverarmung schon bei kurzer Belichtung mit höheren Lichtintensitäten (ab 1200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) zur Reduzierung der Sauerstoffproduktion führte. Generell ist die photosynthetische Sauerstoffproduktion bezogen auf die Zellzahl um 2/3 im Vergleich zur Kontrolle reduziert und folgte damit der Reduzierung der Chlorophylle.

### 3.2.3 Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Licht

TREPST UND DEPKA (1997) konnten zeigen, daß eine Belichtung von mixotroph unter NF gewachsenen Chlamydomonas-Zellen die Destabilisierung der Struktur des PS II und einen D1-Abbau zur Folge hat. Diese Effekte führten sie auf das Fehlen des  $\beta$ -Carotins zurück.

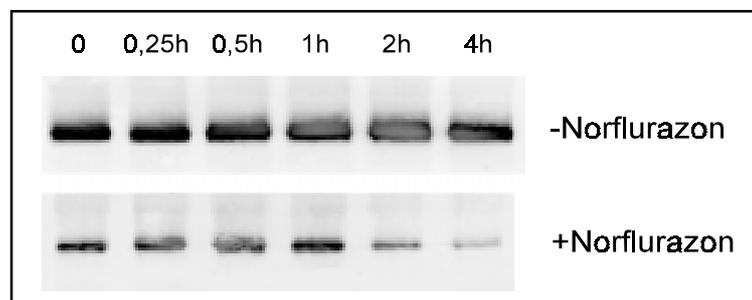
Die von uns eingesetzten stark carotinoidreduzierten Zellen besitzen jedoch noch 100% des  $\beta$ -Carotins im Vergleich zur Kontrolle, welche für diesen Versuch mit einer Lichtintensität 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  angezogen wurde (vgl. Kap. 3.1.1). Durch diese Bedingungen war die Schutzfunktion des  $\beta$ -Carotins gewährleistet, und eine mögliche protektive Funktion anderer Carotinoide konnte untersucht werden. Für die Belichtung wurde ein relativ schwaches Licht von 290  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  gewählt, da bei höheren Intensitäten eine sehr rasche Schädigung auftrat (vgl. 3.2.2). Bei der unter Norflurazon gewachsenen Probe betrug die nichtphotochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz nach 4 h Belichtung mit 290  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  0,491 im Gegensatz zu 0,167 der unbehandelten Probe. In diesem Zusammenhang muß angenommen werden, daß der Anteil von  $q_{I_{SV}}$  bei der carotinoidverarmten Zelle nach 4h sehr hoch war, da die Sauerstoffentwicklung um 30% reduziert war. Gleichzeitig wurde bei den carotinoidverarmten Zellen ein 10%iger Chlorophyllabbau registriert (Abb.11).

Bemerkenswert sind die Veränderungen der Carotinoide. Der  $\beta$ -Carotin-Gehalt stieg bei beiden Proben während der Belichtung in etwa gleichem Verhältnis (ca. 60%) an. Diadinoxanthin nahm in der unbehandelten Probe um 9,9% zu. Eine Erhöhung dieses Pigments durch Licht konnte schon in den Experimenten unter 3.1.1 und 3.1.2 gemessen werden. Bei der carotinoidverarmten Probe nahm dieses Pigment bei gleichzeitig auftretendem Chlorophyllabbau um 44% zu.



**Abb.11** Einfluß der Belichtung (4h) mit einer Intensität von  $290 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  auf Fv/Fm, qN, die photosynthetische Sauerstoffproduktion und auf den Pigmentgehalt bei a) + b) unehandelten und c) + d) carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* (beide Kulturen 6d bei  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  gewachsen); OD = 1,1; n = 3

In der Abb.12 sind die Western-Blots der Belichtungsexperimente aus Abb.11 zu sehen. Offenbar wird, daß es nur unter Bedingungen der Carotinoidverarmung zu einem D1-Abbau kommt. Damit konnte auch für *Euglena gracilis* gezeigt werden, daß durch ein Fehlen der Carotinoide die Belichtung einen D1- Abbau induziert, während der Gehalt an D1-Protein bei der unehandelten Kontrolle über den Versuchszeitraum nicht abnahm.



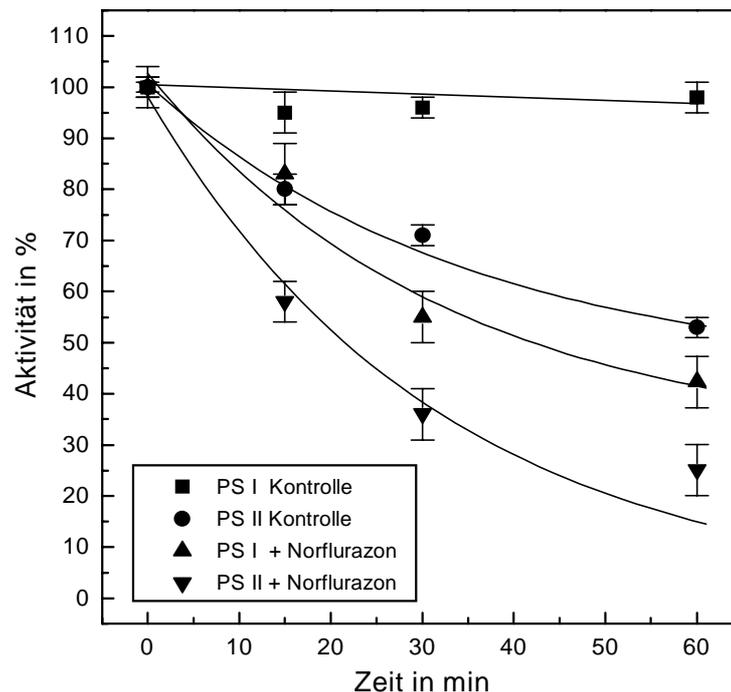
**Abb.12** Einfluß der vierstündigen Belichtung mit einer Intensität von  $290 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  auf den Gehalt des D1-Proteins von unehandelten (-NF) und carotinoidverarmten Zellen (+NF), Western-Blots; 2 Mill. Zellen pro Bahn

Eine Belichtung von Zellen, die unter optimalen Lichtbedingungen ohne Inhibitor gewachsen waren, mit Starklicht ( $1400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; 20h) in Anwesenheit von  $50 \mu\text{M}$  NF, verhinderte die beobachtete Diadinoxanthinzunahme. In Folge waren diese Zellen stärker durch die Belichtung

geschädigt als die Kontrolle ohne NF im Medium (Daten nicht gezeigt). Nach 20 h Belichtung war in diesen Zellen (+NF im Medium) noch 50% des DD und 30%  $\beta$ -Carotin, während in der Kontrolle 120% DD und 92%  $\beta$ -Carotin im Vergleich zum 0-Wert vorlagen. Das D1-Protein und die Sauerstoffentwicklung waren deutlich stärker in Gegenwart von NF geschädigt. Ursache hierfür könnte die Störung a) des hohen „turn over“ der Carotinoide oder b) der Biosynthese des Diadinoxanthins und der damit Ausbleibenden Erhöhung dieses Pigments, durch NF sein. Dieses führt zu einer stärkeren Schädigung der Zelle in Anwesenheit von NF während der Belichtung. Die Schwachlicht-Probe bei  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  in Gegenwart von NF blieb in den gemessenen Parametern über diesen Zeitraum stabil. Nachdem eine eindeutige Schutzfunktion der Carotinoide auf Strukturen des PS II nachweisbar war, stellten wir uns die Frage, ob Auswirkungen des Carotinoidmangels auf das PS I zu finden sind.

### 3.2.4 Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die PS I-Aktivität

Die PS I-Aktivität sollte an möglichst intakten photosynthetischen Strukturen gemessen werden. Dieses konnte durch die Präparation von Chloroplasten aus unbehandelten bzw. carotinoidverarmten *Euglena*-Zellen realisiert werden. Für die Präparation von Chloroplasten erwies es sich als günstig von 3d alten Zellen auszugehen, die in Gegenwart von  $12,5 \mu\text{M}$  NF gewachsen waren. Aus den unter NF-Zusatz angezogenen Zellen erhielten wir Chloroplasten, die im Durchschnitt 38% des DD und 51% des  $\beta$ -Carotin der Kontrolle enthielten.



**Abb.13** Einfluß von Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) auf die PS I- und PS II-Aktivität in unbehandelten und carotinoidverarmten Chloroplasten von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration:  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; ( $n = 3$ )

PS I-Aktivität Kontrolle: 100% =  $186,5 \mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} / \text{h}$   
 PS II-Aktivität Kontrolle: 100% =  $138,0 \mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} / \text{h}$   
 PS I-Aktivität Norflurazon: 100% =  $207,7 \mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} / \text{h}$   
 PS II-Aktivität Norflurazon: 100% =  $132,9 \mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl} / \text{h}$

In der Abb.13 ist die vergleichende Darstellung der PSI- und PS II-Aktivität der unbehandelten bzw. carotinoidverarmten Chloroplasten nach 60minütiger Belichtung mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  zu sehen.

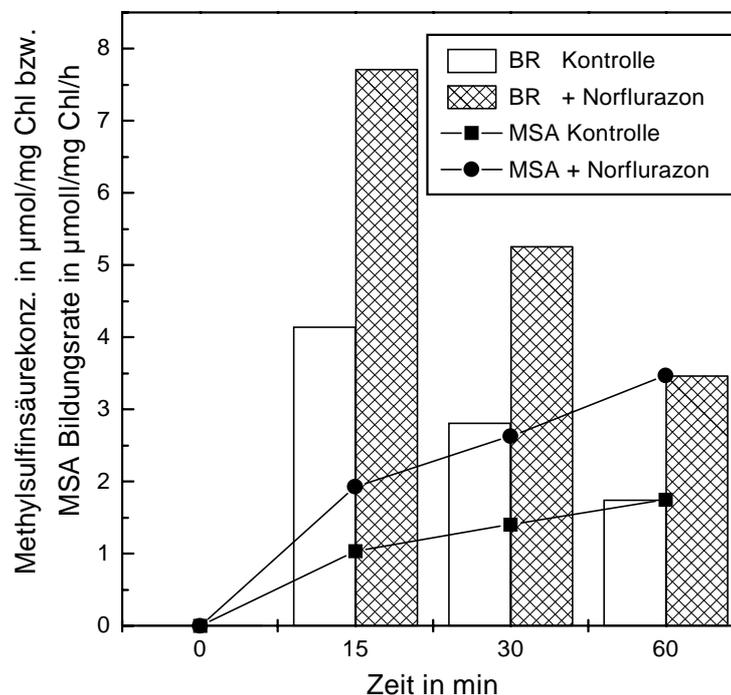
Während bei der Kontrolle die PS II-Aktivität innerhalb von 60 min auf 53% reduziert wurde, blieb das PS I in seiner Aktivität nahezu konstant (nach 60 min 98% Restaktivität). Damit wurde deutlich, daß der Ort einer primären Schädigung dem PS II zuzuordnen ist und somit ein Prozeß der Photoinhibierung im engeren Sinne vorliegt (POWLES 1984; KYLE 1987).

Der carotinoidverarmte Chloroplast zeigte eine stärkere Schädigung des PS II. Nach 60 min war noch 25,1% der Ausgangsaktivität ermittelbar.

Im Gegensatz zur Kontrolle wurde die PS I-Aktivität der carotinoidverarmten Chloroplasten drastisch durch die Belichtung mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  beeinflusst. Bei Versuchsende wurde eine Restaktivität von 42,3% gemessen. Hierdurch wurde klar, daß bei fehlendem Schutz der Carotinoide auch das PS I geschädigt wird.

### 3.3 Carotinoide - antioxidativer Schutz vor Radikalen

Aus den in Abb.14 gezeigten Daten kann man zum einen die MSA-Konzentration, zum anderen die Bildungsrate der MSA für unbehandelte und carotinoidverarmte Chloroplasten entnehmen. Mit steigender Belichtungsdauer erhöhte sich die MSA-Konzentration bei der Kontrolle und der carotinoidverringerten Probe.



**Abb.14** Einfluß von Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) auf die Konzentration und Bildungsrate der Methylsulfinsäure in un- und carotinoidverarmten Chloroplasten von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $n = 5$

Die antioxidative Schutzfunktion der Carotinoide gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, sei es durch Verhindern der Entstehung von Singulett-Sauerstoff, durch Quenchen des angeregten

Triplet-Zustands der Chlorophylle oder durch direkte Reaktion mit hochreaktiven Radikalen, wird oft diskutiert (KRINSKY et al., 1990; TELFER et al., 1994). Wir stellten uns daher die Frage, inwieweit eine solche Funktion der Carotinoide für *Euglena* nachgewiesen werden kann. Hierzu wählten wir eine Methode zur Bestimmung von Hydroxylradikalen (TSCHERSCH UND OHMANN, 1993) über die Quantifizierung der Methylsulfinsäure (MSA) aus. Das Hydroxyl-Radikal (\*OH) ist bei seiner Entstehung an die Existenz von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Superoxid-Radikal-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) gebunden und kann quasi als Produkt der monovalenten Reduktion von Wasserstoffperoxid aufgefaßt werden (CZAPSKI, 1984). Für die Schädigung photosynthetischer Strukturen im Rahmen photoinhibitorischer Bedingungen werden unter anderem reaktive Sauerstoffspezies verantwortlich gemacht (ELSTNER, 1990).

Der generelle Verlauf der Konzentrationszunahme der MSA war für beide Proben von *Euglena gracilis* gleich. Quantitativ gab es große Unterschiede. Die Radikalproduktion der carotinoidverarmten Chloroplasten war beinahe verdoppelt. Die Bildungsrate (BR), d.h. die Umrechnung der nach der jeweiligen Belichtungszeit ermittelten Konzentration auf eine Stunde, wies mit zunehmender Dauer der Bestrahlung eine deutliche Abnahme auf. TSCHERSCH (1992) schlußfolgert daraus, daß eine zunehmende Inaktivierung des Photosyntheseapparates die Hydroxylradikalbildung senkt. Die entsprechenden PS I- und PS II-Aktivitäten sind in Abb.13 dargestellt.

In Zusammenfassung unserer bisherigen Ergebnisse lassen sich folgende Fakten feststellen:

*Euglena gracilis* weicht im Pigmentstatus stark von anderen Grünalgen ab. Es kommt unter Einfluß von verschiedenen Lichtintensitäten nicht zu einer Deepoxidierung von Xanthophyllen, d.h. ein Xanthophyllzyklus wird in *Euglena gracilis* nicht aktiviert. Auch bei älteren, mixotroph bzw. autotroph angezogenen Zellen (Daten nicht gezeigt) war dieses nicht der Fall.

Die Steigerung der Intensität des Anzuchtlichtes oder der Belichtung nach der Anzucht führte zu einer Erhöhung des DD. Da auch bei unter Starklicht angezogenen Algen keine Pigmentumwandlung auftrat, ist diese Erhöhung nicht als Poolerhöhung der Xanthophyllzyklus-Pigmente anzusehen.

Eine Carotinoidverarmung führte zu Zellen, welche einen reduzierten Gehalt an D1 und LHC-Proteinen aufwiesen und in Abhängigkeit von der Stärke der Inhibierung der Carotinoidbiosynthese in der Sauerstoffentwicklung sowie im Fv/Fm-Verhältnis reduziert waren. Bei Belichtung reagierten die carotinoidverarmten Zellen deutlich empfindlicher. Die Belichtung von Zellen, welche in Anwesenheit von  $5\mu M$  NF gewachsen waren, führte, im Gegensatz zur Kontrolle, zum D1-Abbau.

Der durch eine Belichtung mit Starklicht ( $1500\mu mol/m^2/s$ ) entstehende Schaden war bei den carotinoidverarmten Zellen nicht nur auf die Aktivität von PS II begrenzt, sondern auch die PS I-Aktivität nahm stark ab. Es kann von einem deutlichen Schutzeffekt der Carotinoide auf die funktionellen und strukturellen Eigenschaften von PS II und PS I ausgegangen werden. Als ein Aspekt dieser Schutzfunktion kann dabei die Verhinderung der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. deren Entgiftung angesehen werden.

Da deutliche Unterschiede im Fluoreszenzverhalten der unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen auftraten (Abb.11), kann unserer Meinung nach der schützende Effekt hinsichtlich der Radikalbildung jedoch nicht die einzige protektive Funktion der Carotinoide sein. Auf der Suche nach weiteren Schutzmechanismen der Alge gegenüber exzessivem Licht unter Beteili-

gung der Carotinoide stellte sich die Frage, inwieweit die Pigment-Proteinkomplexe in diese Funktion eingebunden sind.

Anhand von Fluoreszenzuntersuchungen sollten zum einen die Charakterisierung der nicht-photochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz und zum anderen Aussagen über die verantwortlichen Mechanismen erfolgen.

### **3.4 Der nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz in *Euglena gracilis***

Kommt es zur Lichtsättigung der Photosynthese, können Pflanzen Photodestruktionen vermeiden, indem sie überschüssige Anregungsenergie dissipieren (KRAUSE et al. 1988). Diese Induktion der Energiedissipation kann als nichtphotochemischer Quench der Chlorophyllfluoreszenz gemessen werden, von SCHREIBER et al. (1986) und VAN KOOTEN UND SNEL (1990) als  $q_N$  bezeichnet.

Eine unterschiedliche Berechnung des Effekts führt zu einer variierten Terminologie. NPQ (BILGER UND BJÖRKMAN, 1994),  $SV_n$  (GILMORE et al., 1994) oder  $q_{NSV}$  (THIELE et al., 1997)  $SV_m$  (OLAIZOLA UND YAMAMOTO, 1994) sind nach der Stern-Volmer-Gleichung kalkuliert. Diese Kalkulation erwies sich dann als günstig, wenn der Quench der Grundfluoreszenz getrennt vom Quench der maximalen Fluoreszenz betrachtet werden sollte. Die Wahl der jeweiligen Berechnung ist der entsprechenden Graphik bzw. Tabelle zu entnehmen.

WALTERS UND HORTON (1991) wie auch QUICK UND STITT (1989) konnten drei kinetisch unterschiedliche Phasen für das „recovery“ von  $q_N$  beschreiben. Die schnelle Phase wurde dem „high-energy state quenching“ (qE), die mittlere Phase der Energieumverteilung aufgrund von „state transitions“ (qT) und die langsame Phase der Photoinhibierung (qI) zugeordnet.

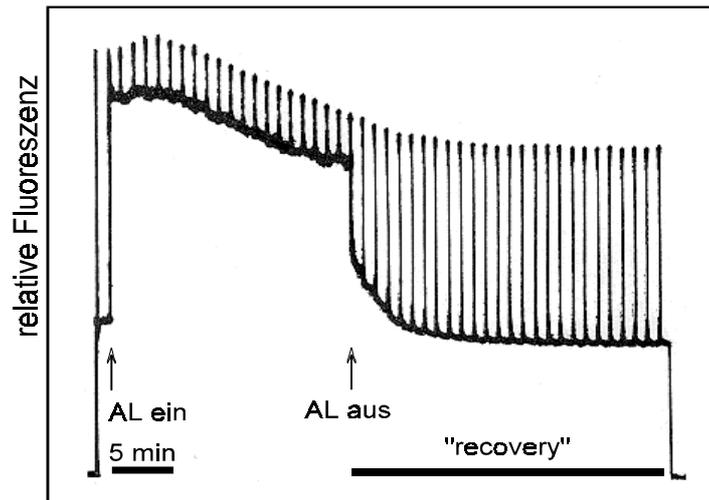
Durch Anwendung von Entkopplern wie z.B. Nigericin, welche den pH-Gradienten der Thylakoidmembran zerstören, bzw. durch die Analyse des „recovery“ von Fm, erhofften wir Rückschlüsse auf die für *Euglena gracilis* verantwortlichen Prozesse der nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz ziehen zu können.

#### **3.4.1 Der dunkelinduzierte Quench der Chlorophyllfluoreszenz in *Euglena gracilis***

Die unter 3.1.2 besprochenen Belichtungsversuche ergaben, daß die Belichtung mit Schwachlicht zu einer Optimierung der Photosynthese führt. Betrachtet man die Abb.6 und Abb.15 so wird klar, daß die dunkelinkubierte Alge *Euglena gracilis* einen gequenchten Zustand der Chlorophyllfluoreszenz aufweist. Eine Dunkelinduktion des nichtphotochemischen Quench wurde für verschiedene Algen beobachtet (TING UND OWENS, 1993; ENDO UND ASADA, 1996). WILHELM et al. (1988) beschreiben die Möglichkeit einer Energetisierung der Thylakoidmembran im Dunkeln.

Um weitere Messungen zum nichtphotochemischen Quench korrekt interpretieren zu können und die einzelnen Fluoreszenzparameter richtig zu erfassen, war es von Bedeutung, das Ausmaß und den möglichen Charakter des Dunkelquench zu klären.

In der Abb.15 ist das Fluoreszenzverhalten einer dunkelinkubierten Probe während der Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und anschließendem „recovery“ im Dunkeln dargestellt.



**Abb.15** Fluoreszenzverhalten von *Euglena gracilis* nach 5minütiger Dunkelinkubation während der Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und anschließendem „recovery“ im Dunkeln; OD = 1,1

Die maximale Fluoreszenz stieg in den ersten 5 min der Belichtung an. Danach setzte der nichtphotochemische Quench von Fm ein. Die Belichtung führt zu einem starken Anstieg der Grundfluoreszenz. Eine Erholung von Fm im Dunkeln konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden.

In der Tab.7 ist der Einfluß von Dunkel und FR-Licht („far red“; langwelliges Rotlicht, Maximum bei 730 nm) auf die maximale Fluoreszenz, die Grundfluoreszenz und das Verhältnis Fv/Fm sowie die Wirkung von DCMU und Nigericin auf Fm dargestellt.

Ein hoher Wert für Fv/Fm (0,642) wurde durch eine Inkubation mit FR-Licht erzielt. Dies galt auch für die absoluten Werte für Fm und Fo. FR-Licht kann zum einen die Chlororespiration teilweise oder vollständig inhibieren, zum anderen induziert dieses Licht, welches in erster Linie vom PS I absorbiert wird, den „state1“, den nicht gequenchten Zustand der „state transitions“. Die Zugabe von Nigericin zu der im FR-Licht inkubierten Probe veränderte diese kaum. Dunkelheit führte zu einer Löschung der Chlorophyllfluoreszenz. Schwachlicht (bis  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) hob den Quench nicht vollständig auf.

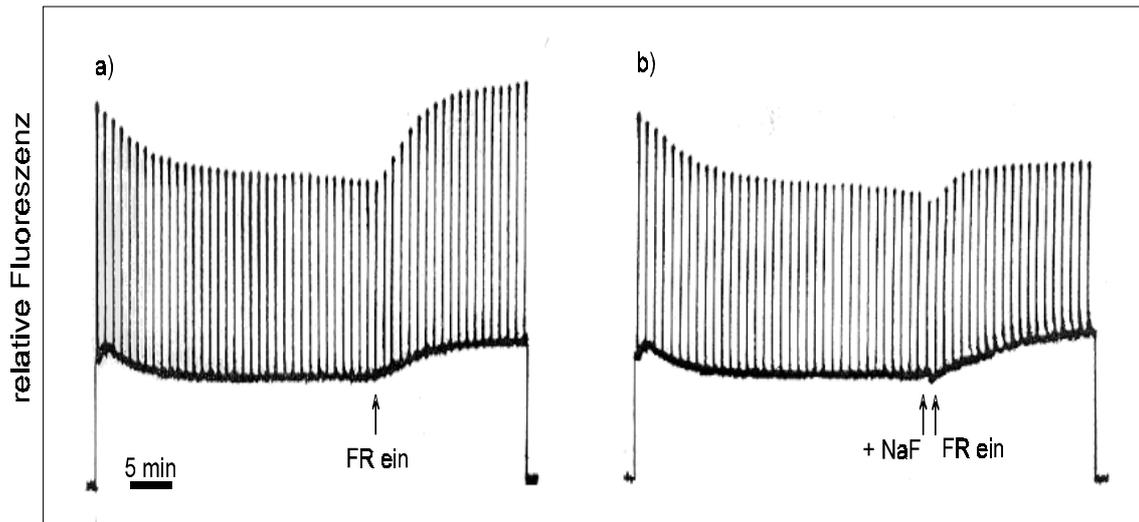
**Tab.7** Einfluß von Dunkelheit bzw. FR-Licht (Dauer 20 min) auf Fo; Fm und Fv/Fm in relativen Fluoreszenzeinheiten und die Wirkung von DCMU ( $50 \mu\text{M}$ ) bzw. Nigericin ( $60 \mu\text{M}$ ) nach Adaptation an die jeweiligen Verhältnisse auf Fm ; n = 5

	Fo	Fm	Fv/Fm
<b>Dunkel</b>	$0,297 \pm 0,03$	$0,760 \pm 0,03$	$0,609 \pm 0,009$
<b>Dunkel + DCMU</b>	-	$0,813 \pm 0,02$	-
<b>Dunkel + Nigericin</b>	$0,330 \pm 0,01$	$0,810 \pm 0,01$	$0,592 \pm 0,006$
<b>FR</b>	$0,358 \pm 0,03$	$1,000 \pm 0,02$	$0,642 \pm 0,005$
<b>FR + DCMU</b>	-	$0,990 \pm 0,03$	-
<b>FR + Nigericin</b>	$0,359 \pm 0,03$	$1,011 \pm 0,02$	$0,644 \pm 0,004$

Der Einsatz von Nigericin nach 5 min Dunkelinkubation ergab einen 38%igen Anteil von  $qE_{sv}$  am Quench von Fm (Daten nicht gezeigt). Nach 20minütiger Dunkelinkubation waren nur

21,04%  $\pm$  1,5% von  $SV_m$  (vgl. Tab.11) von einem pH-Gradienten abhängig. Der Hauptanteil des Dunkelquench von Fm nach 21 min war somit unabhängig von einer Ansäuerung des Thylakoidlumens. Nigericin beeinflusste Fo stärker als Fm. 54,4% des Quench von Fo ( $SV_o$ ) konnten durch Zusatz von Nigericin aufgehoben werden.

DCMU hob den Quench von Fm bezogen auf  $SV_m$  teilweise auf, d.h. die Inkubation einer dunkelinkubierten Probe mit DCMU führte zu einer Fm Erhöhung um 22,1%. Der maximale Fm-Wert der FR bestrahlten Probe konnte jedoch durch DCMU Einsatz nicht erreicht werden. Auf die Fm-Werte der mit FR bestrahlten Proben hatte DCMU keinen Einfluß.



**Abb.16** Einfluß der Dunkelinkubation (34 min) auf die Fluoreszenz von *Euglena gracilis* sowie der Einfluß des Phosphataseinhibitors NaF auf das „recovery“ unter FR-Licht; a) - NaF; b) + NaF; OD = 1,1

Die Abb.16 stellt den Verlauf von Fm während der Dunkelinkubation von *Euglena*-Zellen nach 10 min Vorinkubation mit FR-Licht dar. Auch während des „recovery“ war das FR-Licht zugeschaltet. Desweiteren zeigt diese Abbildung den Einfluß von NaF, einem Phosphataseinhibitor, auf die Aufhebung des Quench der Chlorophyllfluoreszenz.

In Anwesenheit dieses Inhibitors trat eine nahezu völlige Blockierung des „recovery“ auf. Nur 23,84%  $\pm$  2,1% von  $SV_m$  erholten sich unter Anwesenheit von NaF während der FR-Bestrahlung im Anschluß an die Dunkelinkubation. Dieses entspricht in etwa dem  $\Delta$ pH-abhängigen Anteil des Dunkelquenches. Dieses Ergebnis spricht für die Involvierung einer Phosphatase (ALLEN, 1992, 1995) in das „recovery“ des von einem pH-Gradienten unabhängigen Quench der Chlorophyllfluoreszenz. Beschrieben ist dies z.B. bei „state transitions“ induziert durch Schwachlicht oder Dunkelinkubation (ENDO UND ASADA, 1996).

Für alle weiteren Fluoreszenzuntersuchungen wurden die Proben bis zum Erreichen der maximal möglichen Fluoreszenz mit FR-Licht vorinkubiert (durchschnittlich 10 min).

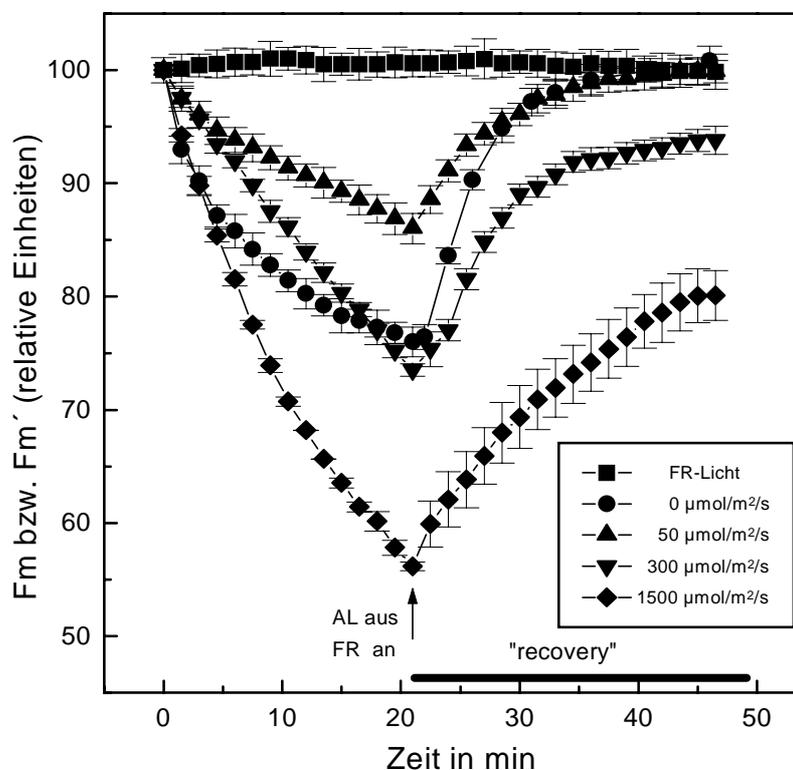
### 3.4.2 Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten auf qN und das „recovery“ im Vergleich zur Dunkelinkubation bei unbehandelten Zellen von *Euglena gracilis*

Um den nichtphotochemischen Quench weiter zu charakterisieren und eine mögliche Beteiligung von Carotinoiden an den für qN verantwortlichen Prozessen zu untersuchen wurden un-

behandelte mixotrophe Zellen (-NF gewachsen) und carotinoidverarmte Euglenen (+ 5  $\mu\text{M}$  NF in der Anzucht) -siehe Kap. 3.5- in der PAM-Küvette belichtet. Dieses gestattete uns die Fluoreszenzanalyse unmittelbar während der Belichtung und des „recovery“. Die Belichtungsbedingungen orientierten sich dabei an den Lichtsättigungskurven der Abb.10. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Lichtstärken auf den Quench zu untersuchen, wurden die Proben mit 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  belichtet.

Hinsichtlich der Aufhebung des Dunkelquenches und der Einstellung eines optimalen Fv/Fm Verhältnis, wurden die Proben vor der eigentlichen Belichtung und im „recovery“ mit FR-Licht bestrahlt (vgl. 3.4.1).

### 3.4.2.1 Der Quench der Chlorophyllfluoreszenz



**Abb.17** Einfluß unterschiedlicher Belichtungsintensitäten (50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) und der Dunkelinkubation auf die maximalen Fluoreszenz von *Euglena gracilis*; „recovery“ unter FR-Licht ; Belichtungsdauer bzw. Dunkelinkubation: 21 min; ■ nur mit FR bestrahlte Probe; OD = 1,1

Um die Stabilität der Probe für die Versuchsdauer zu kontrollieren, wurden zunächst Proben nur mit FR-Licht belichtet. In der Abb.17, die den Einfluß unterschiedlicher Behandlungen auf die maximale Fluoreszenz von *Euglena gracilis* (- NF) darlegt, ist ein solches Experiment dargestellt. Über einen Zeitraum von ca. 50 min kann die Probe als stabil bezeichnet werden, und somit konnten Einflüsse durch die Küvettengeometrie oder das Rühren der Algensuspension ausgeschlossen werden. Zum Vergleich des Dunkelquenches mit dem sich im Licht entwickelnden Quench der Chlorophyllfluoreszenz ist in der Abb.17 auch eine Probe, welche im Dunkeln inkubiert wurde, enthalten.

Durch eine Belichtung mit  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  wurde die maximale Fluoreszenz auf 88,64% gequench. In der Dunkelheit erfolgte dagegen eine Reduzierung auf 78,5%. Damit blieb dieser Quench durch Schwachlicht, im Vergleich zu dem bei Dunkelheit, innerhalb des Beobachtungszeitraumes kleiner. Die nach dem Schwachlicht anschließende FR-Bestrahlung führte in beiden Fällen zur vollständigen Erholung der maximalen Fluoreszenz.

Erst nach 15 min Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (Bereich der Lichtsättigung) konnte eine stärkere Löschung von  $F_m$  ( $F_m'_{21 \text{ min}} = 73,8\%$  von  $F_m$ ) als in der Dunkelprobe gemessen werden. Dieser Fakt ist bei der Diskussion der Anteile von  $q_{\text{ISV}}$  am nichtphotochemischen Quench von Bedeutung. Nach FR-Behandlung konnte ein Erholen auf 93,4% des Ausgangswertes gemessen werden.

Nach 21minütiger Belichtung mit Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) war die nichtphotochemische Löschung der Fluoreszenz, im Vergleich zu den anderen Belichtungsintensitäten und der Dunkelprobe sehr viel stärker.  $F_m'$  entsprach 56,2% von  $F_m$ . Schon nach kurzer Belichtungsdauer (4,5 min) war die maximale Fluoreszenz stärker als bei jeder anderen Versuchsbedingung betroffen. Im „recovery“ erreichten die Algen nur 80,1% des Ausgangswertes. Das unvollständige „recovery“ und die Verringerung von  $F_v/F_m$  war Indiz für eine starke Zunahme von  $q_{\text{ISV}}$  unter diesen Bedingungen.

In der Tab.8 sind die wichtigsten Daten dieser Belichtungsversuche zusammengefaßt. Für eine getrennte Betrachtung der Auswirkungen von Licht bzw. Dunkel auf  $F_o$  bzw.  $F_m$  sind die Stern-Volmer Kalkulationen für  $F_m$  ( $SV_m$ ) und für  $F_o$  ( $SV_o$ ) angegeben.

**Tab.8** Auswirkungen differenzierter Belichtungsintensitäten nach 21minütiger Belichtung auf Photosyntheseparameter un behandelter Zellen von *Euglena gracilis*;  $F_v/F_m = 0,643 \pm 0,005$ ;  $O_2$ -Entwicklung 100% =  $105,2 \pm 4,8 \mu\text{mol } O_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ , \* ohne FR-Vorinkubation

	$F_m'$ %	$F_o'$ %	$F_v'/F_m'$	qN	qP	$SV_m$	$SV_o$	$O_2$ %*
<b>0 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	76,00	83,08	0,609	0,279	-	0,315	0,204	100,0
<b>50 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	85,82	90,90	0,620	0,170	0,799	0,165	0,100	107,5
<b>300 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	73,80	88,90	0,568	0,346	0,337	0,355	0,124	106,3
<b>1500 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	56,22	92,64	0,409	0,640	0,073	0,758	0,079	91,1

Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf eine Fehlerangabe verzichtet. Die Abweichungen vom angegeben Mittelwert sind in der Abb.17 für  $F_m$  ersichtlich. Die Quotienten wurden aus den Einzeldaten berechnet und anschließend gemittelt.

Der nichtphotochemische Quench der Chlorophyll a- Fluoreszenz kann in vivo hauptsächlich durch drei Mechanismen verursacht werden (KRAUSE UND WEIS, 1991). Ein Energieabhängiger Quench, verursacht durch Ansäuerung der intrathylakoidalen Bereiche, ein Quench der Fluoreszenz durch „state-transitions“, reguliert durch Phosphorylierung des LHC II und ein Quench durch photoinhibitorische Prozesse konnten aufgezeigt werden (HODGES et al., 1989; QUICK UND STITT, 1989; WALTERS UND HORTON, 1991). Diese Komponenten unterscheiden sich stark in ihrer Relaxation, was Ausdruck in unterschiedlich langen Halbwertszeiten (HWZ) findet.

Thermale Energiedissipation in der Antenne sowie im Reaktionszentrum führen zu einem Anstieg in  $SV_m$  (OLAIZOLA UND YAMAMOTO, 1994). Energiedissipation im Reaktionszentrum führt zu keiner Erhöhung von  $SV_o$ , nur Energiedissipation in den Antennen führt zu einem Quench von  $F_o$ .

Die starke Reduktion des PQ-Pools erschwerte die korrekte  $F_o'$ -Bestimmung. Die Werte für  $F_o'$  wurden daher nach FR-Bestrahlung gemessen und im niedrigsten Punkt für  $F_o'$  bestimmt. FR-Licht führt zum einen zur Oxidation des PQ-Pools, zum anderen aber auch zum gleichzeitigen Einsetzen des „recovery“. Da  $F_o'$  bei alle Proben in gleicher Weise bestimmt worden ist, ist die Vergleichbarkeit der Proben untereinander gewährleistet.

Das Verhältnis von  $SV_m/SV_o$  war nach 21minütiger Dunkelinkubation am kleinsten. Bei der Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  nahm dieses Verhältnis deutlich zu. Schlußfolgernd daraus war die Annahme, daß während der Belichtung mit höheren Lichtintensitäten, im Vergleich zur Dunkelprobe und Schwachlichtprobe, ein zusätzlicher Anteil von Fm unabhängig von  $F_o$  gequench wurde.

Zu einer Pigmentumwandlung kam es auch unter diesen Belichtungsbedingungen nicht (vgl. Kap. 3.1.2). Der Diatoxanthingehalt (nicht dargestellt) nahm unter allen Belichtungsbedingungen stark ab. Durchschnittlich waren nach 21 min Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  noch  $18\% \pm 5\%$  vorhanden. Eine DD-Erhöhung konnte auch bei diesem Experiment gemessen werden und war nach 21 min Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  am deutlichsten ausgeprägt ( $105\% \pm 2\%$  des Ausgangswertes). Der Chlorophyllgehalt blieb bei allen Proben stabil (21 min /  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  =  $98\% \pm 1.5\%$  des Ausgangsgehaltes).

Die Abnahme der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung unter Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) ist ein Indiz für das Auftreten photoinhibitorischer Prozesse unter diesen Bedingungen.

### 3.4.2.2 Relaxation der Fluoreszenzparameter und die Halbwertszeiten des „recovery“

Eine Untersuchung der Relaxation des Quench der Chlorophyllfluoreszenz sollte Aufschlüsse über das Maß der Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen am nichtphotochemischen Quench liefern.

**Tab.9** Charakterisierung des „recovery“ der Fluoreszenz nach Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten anhand verschiedener Fluoreszenzparameter sowie die Anteile von  $qI_{SV}$  am Gesamtquench der Chlorophyllfluoreszenz; Halbwertszeiten (HWZ) des gesamten „recovery“ nach 25 min, HWZ in min;  $F_v/F_m = 0,643 \pm 0,005$ ;  $n = 5-7$

	$F_{m\text{Rec}}\%$	$F_{o\text{Rec}}\%$	$(F_v/F_m)_{\text{Rec}}$	$qI_{SV}$ absolut	$qI_{SV}\%$	HWZ in min
<b>0 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$100,80 \pm 1,3$	$102,80 \pm 0,6$	$0,643 \pm 0,006$	-	-	4,60
<b>50 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$99,86 \pm 1,8$	$100,00 \pm 2,0$	$0,641 \pm 0,005$	$0,002 \pm 1,8 \times 10^{-5}$	$1,21 \pm 0,9$	3,95
<b>300 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$93,38 \pm 2,0$	$98,97 \pm 2,1$	$0,619 \pm 0,009$	$0,071 \pm 8 \times 10^{-4}$	$20,00 \pm 1,2$	5,15
<b>1500 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$80,10 \pm 3,1$	$95,90 \pm 3,2$	$0,573 \pm 0,010$	$0,248 \pm 0,025$	$32,80 \pm 2,5$	7,66

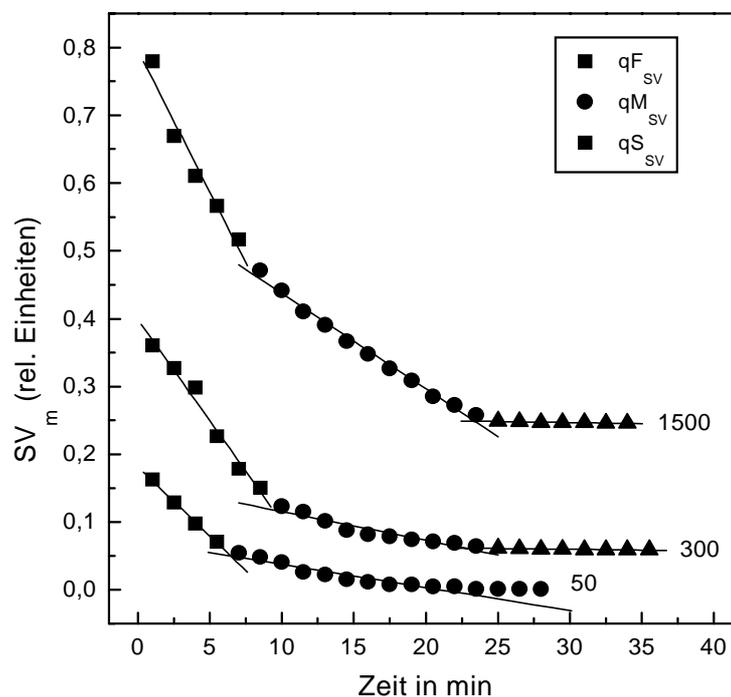
In der Tab.9 sind verschiedene Fluoreszenzparameter nach 25minütigen „recovery“ zusammengefaßt. Der Wert  $qI_{SV}$  diente als Maß für die Beteiligung photoinhibitorischer Prozesse am Quench der Chlorophyllfluoreszenz (THIELE et al., 1997). In die Stern-Volmer Gleichung gingen die Initialfluoreszenz (Fm) und  $F_m'$  nach 25minütigem „recovery“ ein (vgl. Tab.2). Ein weiteres Indiz für Photoinhibierung war der Quotient  $(F_v/F_m)_{\text{Rec}}$  (KRAUSE UND WEIS, 1991). Es muß nochmals erwähnt werden, daß es unter den hier eingesetzten Belichtungsvarianten zu keinem

detektierbarem D1 Abbau kam (vgl. Kap. 3.1.2). Desweiteren sind der Tab.9 die Halbwertszeiten des „recovery“ zu entnehmen. Die Daten wurden anhand des Stern-Volmer Quotienten  $SV_{\max}$  graphisch ermittelt.

QUICK UND STITT (1989) analysierten ihre Dunkelrelaxationsdaten durch lineare Extrapolation jeder Phase des Dunkel-„recovery“ gegen die Zeit und stellten folgende Beziehung auf:  $(1-qN) = (1-qN_f) \times (1-qN_m) \times (1-qN_s)$ . Diese Methode der Kalkulation gilt solange, wie die Relaxation der  $qN$ -Komponenten linear ist.

WALTERS UND HORTON (1991) überarbeiteten die Daten nach der Funktion des „exponential decay“. Die Auftragung von  $qN$  erfolgte semilogarithmisch. So bestimmten sie unterschiedlich schnell relaxierende Anteile von  $qN$  und deren HWZ und konnten für die 3 unterschiedlichen kinetischen Phasen der Relaxation der Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln Halbwertszeiten von ca. 1 min für die schnelle Relaxation ( $qN_f$ , f: fast), ca. 5-10 min für die mittlere ( $qN_m$ , m: medium) und 30 min und mehr für die langsame Phase ( $qN_s$ , s: slow) des „recovery“ beschreiben (HORTON UND HAGUE, 1988).

Wurden unsere Daten ( $SV_m$ ), welche exponentiell fallende Kurven ergaben, semilogarithmisch aufgetragen, so erhielten wir im Gegensatz zu WALTERS UND HORTON (1991) eine Gerade. Verständlich wird dieses, wenn man bedenkt, daß in höheren Pflanzen die Involvierung des Carotinoidzyklus zu einem quantitativ hohen und schnellen Löschen der Fluoreszenz ( $qN_f$ ) führt. Dieser sehr schnell relaxierende Anteil (HWZ ca. 1 min) des nichtphotochemischen Quench war in *Euglena gracilis* anteilig sehr gering bzw. fehlte vollständig.



**Abb.18** Lineare Anpassung der  $SV_m$  „recovery“-Daten (vgl. Abb.17) nach 21minütiger Belichtung von *Euglena gracilis* mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ,  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), „recovery“ mit FR-Licht

In der Abb.18 sind die  $SV_m$  Daten des „recovery“ zusammengefaßt. Man erkennt in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität zwei bzw. drei lineare Phasen, eine schnelle Phase der Re-

laxation von Fm ( $q_{F_{SV}}$ ), eine mittlere Phase ( $q_{M_{SV}}$ ) und eine langsame Phase ( $q_{S_{SV}}$ ). Die Regressionskoeffizienten für alle linearisierten Daten liegen im Bereich von -0,949 bis -0,998.

Nach Analyse der einzelnen Komponenten des Quench von Fm in Anlehnung an QUICK UND STITT (1989) konnten die Anteile der einzelnen Komponenten am Gesamtquench berechnet sowie deren HWZ graphisch ermittelt werden (Tab.10).

Die schnelle Relaxation eines Teils des nichtphotochemischen Quench (HWZ < 1 min), wie sie für höhere Pflanzen beschrieben ist (WALTERS UND HORTON, 1991; QUICK UND STITT, 1989), ist bei *Euglena gracilis* offenbar deutlich verlangsamt bzw. nicht vorhanden. Die mittlere Phase entsprach der für „state transitions“ beschriebenen HWZ. Für den Anteil der Löschung der Fluoreszenz, welcher innerhalb des 25 minütigen „recovery“ nicht aufgehoben wurde, müssen photoinhibitorische Prozesse (HWZ > 30 min) (WALTERS UND HORTON, 1991) verantwortlich gemacht werden (siehe Kap. 3.4.2.3).

**Tab.10** Komponenten des nichtphotochemischen Quench berechnet durch lineare Extrapolation und Verrechnung der einzelnen Phasen nach QUICK UND STITT (1989); HWZ in min,  $q_{F_{SV}}$ : schnelle Phase;  $q_{M_{SV}}$ : mittlere Phase;  $q_{S_{SV}}$ : langsame Phase

	$q_{F_{SV}}\%$	HWZ in min	$q_{M_{SV}}\%$	HWZ in min	$q_{S_{SV}}\%$	HWZ in min
<b>50 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$64,5 \pm 1,5$	2,6	$35,4 \pm 7,9$	6,5	-	-
<b>300 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$52,4 \pm 7,1$	4,0	$28,9 \pm 5,6$	6,7	$18,6 \pm 1,4$	> 30
<b>1500 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$27,5 \pm 10,3$	3,1	$30,6 \pm 2,8$	7,4	$41,9 \pm 0,1$	> 30

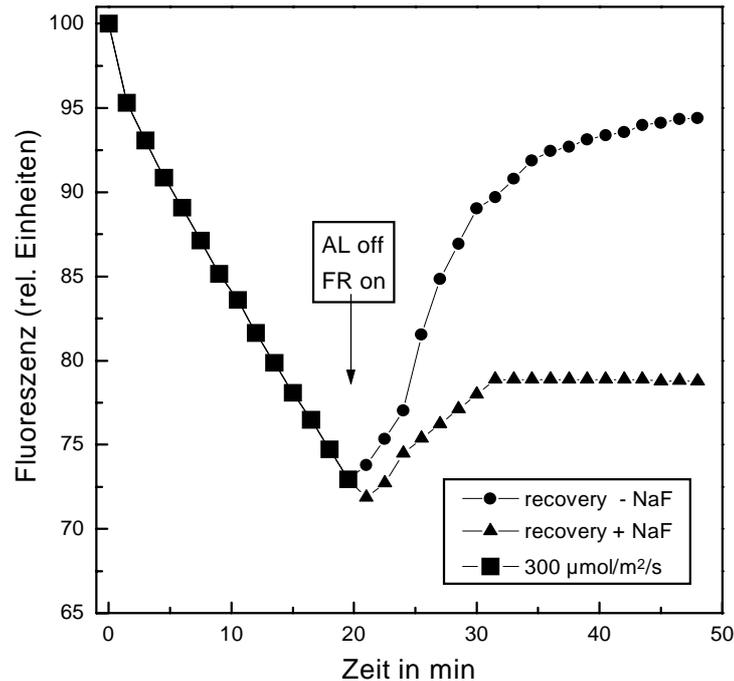
### 3.4.2.3 Einfluß des Phosphataseinhibitors (NaF) auf die Relaxation der Fluoreszenz

Der Einsatz eines Phosphataseinhibitors (vgl. 3.4.1) sollte Aufschluß geben, ob das „recovery“ nach der Belichtung von einer Phosphataseaktivität abhängig ist. Nach WALTERS UND HORTON (1991) ist der Quench der Fluoreszenz, welcher innerhalb von 5-10 min relaxiert, bei niedrigen Lichtintensitäten auf „state transitions“ zurückzuführen. Ein Anteil des bei *Euglena* gemessenen Quench erholt sich in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität mit einer HWZ von 6,5 min - 7,4 min innerhalb dieses Bereiches.

In Grünalgen (z.B. *Dunaliella salina*) kann die Fluoreszenzemission vom PS II bis zu 30% durch lichtinduzierte „state I-state II transitions“ reduziert werden (HARRISON UND ALLEN, 1993).

In der Abb.19 ist der Einfluß von NaF auf das „recovery“ der maximalen Fluoreszenz dargestellt. Belichtet wurde die Probe 21 min mit einer mittleren Lichtintensität ( $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Die Zugabe von NaF erfolgte sofort nach Ausschalten des aktinischen Lichtes.

Durch die Belichtung einer Probe mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  wurde die maximale Fluoreszenz auf  $73,8\% \pm 0,6\%$  des Ausgangswertes gelöscht. Die Grundfluoreszenz nahm auf  $93,38\% \pm 2,0\%$  des Ausgangswertes ab. Der Zusatz von NaF nach Belichtung verhinderte die Relaxation von Fm zu einem großen Teil. Ein  $31,52\% \pm 5,6\%$ iger Anteil von  $SV_m$  (ohne Berücksichtigung von  $q_{I_{SV}}$ ) relaxierte in Anwesenheit von NaF, was einer Erholung um 22,09% von Fm entsprach.



**Abb.19** Einfluß des Phosphataseinhibitors NaF (20 mM) auf das „recovery“ von Fm nach 21minütiger Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; Chl-konzentration:  $12 \mu\text{g}/\text{ml}$

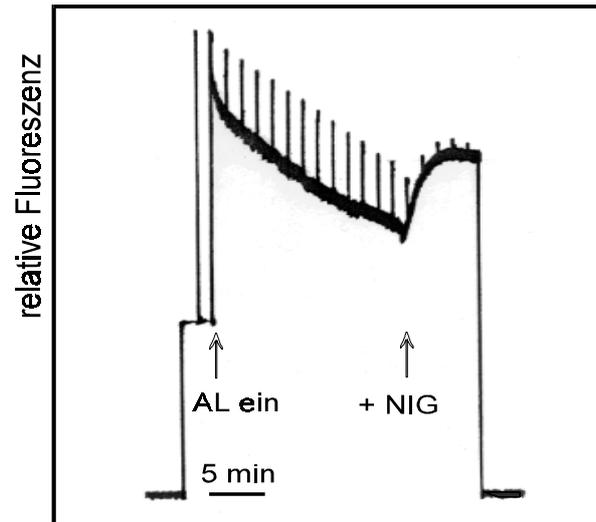
Nach 25minütigem „recovery“ der Probe ohne NaF war  $F_o'$  auf  $98,97\% \pm 2,1\%$  des Ausgangswertes ( $F_o$ ) relaxiert (siehe Tab.9). Die Anwesenheit von NaF während der Relaxationsphase verhinderte das „recovery“ von  $F_o$  nahezu vollständig. So relaxierten in Anwesenheit des Inhibitors nur  $23,4\%$  von  $F_o'$  im Vergleich zur Erholung von  $F_o'$  bei der Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

#### 3.4.2.4 Einfluß von Nigericin

Der Hauptanteil der lichtinduzierten Löschung der Chlorophyllfluoreszenz ist bei höheren Pflanzen von einem Protonengradienten in der Thylakoidmembran abhängig (RUBAN UND HORTON, 1995b). So werden diese Prozesse allgemein als qE beschrieben. Es ist generell akzeptiert, daß eine Ansäuerung des Thylakoidlumens den qE-Mechanismus steuert. Die Art des Mechanismus ist jedoch umstritten.

Da beim „recovery“ der Fluoreszenz von *Euglena gracilis* der Anteil mit einer schnellen Relaxation (HWZ ca. 1 min) sehr gering war, stellte sich uns die Frage, inwieweit der Fluoreszenzquench  $\Delta\text{pH}$ -abhängig ist. Es sollte untersucht werden, ob differenzierte Belichtung Einfluß auf den Anteil von qE hat. Dazu wurden die Proben mit den beschriebenen Lichtintensitäten belichtet. In der 20. Belichtungsminute wurde der Entkoppler Nigericin ( $60 \mu\text{M}$ ) zugesetzt. Die Nigericin-Versuche wurden mit Chloroplasten bei Einsatz einer geringeren Konzentration von Nigericin ( $5 \mu\text{M}$ ) wiederholt und bestätigten die an der Zelle gemessenen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

In der Abb.20 ist die Wirkung des Nigericins auf den Quench der Chlorophyllfluoreszenz nach 20minütiger Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  dargestellt. Der stationäre Zustand der Fluoreszenz (steady state Fluoreszenz;  $F_s$ ) erhöhte sich. Das Ausmaß der Erholung von Fm nach 25 min „recovery“ von Fm wurde jedoch nicht erreicht.



**Abb.20** Einfluß von Nigericin ( $60 \mu\text{M}$ ) auf die PS II-Fluoreszenz von *Euglena gracilis*; Belichtung  $300 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ; Zugabe von Nigericin in der 20. Belichtungsminute

Photoinhibitorische Prozesse können auch in Anwesenheit des Entkopplers die Fluoreszenz weiter löschen und somit zum Verfälschen des für  $qE$  gemessenen Wertes bei höheren Lichtintensitäten führen. Um maximale Entkopplerwirkung zu erzielen, war eine 4minütige Inkubation notwendig. Somit wäre es denkbar, daß der Anteil von  $qE$  bei Belichtungsintensitäten, welche photoinhibitorische Prozesse auslösen, etwas größer sein kann als hier dargestellt.

In der Tab.11 sind die absoluten und relativen Daten für die Anteile von  $qE$  am Gesamtquench der Chlorophyllfluoreszenz in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität zusammengefaßt.

**Tab.11** Einfluß von Nigericin ( $60 \mu\text{M}$ ) auf die PS II-Fluoreszenz; Anteil des  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Quench an  $\text{SV}_m$ ;  $n = 3-5$

	$\text{SV}_m$	$qE_{\text{SV}}$	$qE_{\text{SV}}\%$
<b>0 <math>\mu\text{mol/m}^2/\text{s}</math></b>	$0,315 \pm 0,043$	0,066	$21,04 \pm 1,50$
<b>50 <math>\mu\text{mol/m}^2/\text{s}</math></b>	$0,165 \pm 0,041$	0,117	$71,00 \pm 3,92$
<b>300 <math>\mu\text{mol/m}^2/\text{s}</math></b>	$0,355 \pm 0,020$	0,123	$34,91 \pm 3,95$
<b>1500 <math>\mu\text{mol/m}^2/\text{s}</math></b>	$0,758 \pm 0,059$	0,105	$13,92 \pm 1,54$

Anhand der Daten wird ersichtlich, daß der im Schwachlicht ( $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ) auftretende Quench der Chlorophyllfluoreszenz zum größten Teil abhängig vom Aufbau eines transthylakoiden Protonengradienten ist. Mit zunehmender Belichtungsintensität sank der Anteil an  $qE_{\text{SV}}$ . So war bei der Belichtung mit Starklicht noch  $13,92\% \pm 1,54\%$  von  $\text{SV}_m$  vom Aufbau eines Protonengradienten abhängig.

Bis in die Bereiche der Lichtsättigung ist eine Zunahme des absoluten Wertes von  $qE_{\text{SV}}$  an  $\text{SV}_m$  zu verzeichnen. Durch die Belichtung mit Starklicht war auch dieser verringert. Die Dominanz photoinhibitorischer Prozesse unter diesen Bedingungen wird erneut deutlich.

### 3.4.2.5 Zusammenfassende Charakterisierung des nichtphotochemischen Quench in *Euglena gracilis*

Die bis hier unter 3.4.1 und 3.4.2 dargestellten Daten lassen folgende Schlüsse zu:

*Erstens:* *Euglena gracilis* entwickelt während der Dunkelinkubation einen nichtphotochemischen Quench der Chlorophyllfluoreszenz. Nach 5 min Dunkelinkubation konnten durch Entkopplerzusatz  $38\% \pm 2.1\%$  dieses Quench aufgehoben werden. Trotz Anwesenheit des Entkopplers nahm der Quench nach Erreichen eines Plateaus weiter zu. Nach 21minütiger Dunkelinkubation waren nur noch  $21,04\% \pm 1,5\%$  durch einen Entkoppler aufhebbar. Somit war der Hauptanteil des Quench unabhängig von einer Ansäuerung des Thylakoidlumens. Der sowohl  $\Delta\text{pH}$ -abhängige als auch der  $\Delta\text{pH}$ -unabhängige Dunkelquench waren durch FR-Licht reversibel bzw. konnten durch eine FR-Vorinkubation verhindert werden.

Bei Dunkelproben waren 78,9% des Gesamtquench nicht von einem pH-Gradienten abhängig. Ein quenchender Mechanismus dominierte hier die nichtphotochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz. Die HWZ des „recovery“ betrug 4,8 min. Diese entspricht der HWZ für die mittlere Relaxationsphase der Chlorophyllfluoreszenz (WALTERS UND HORTON, 1991). Im Schwachlicht (WALTERS UND HORTON, 1991) sind für diese Phase „state-transitions“ verantwortlich. U. a. zeigen ENDO UND ASADA (1996) die Entwicklung eines Fluoreszenzquench im Dunkeln, welcher durch „state-transitions“ verursacht wird. Ein weiteres Argument für „state-transitions“ als quenchenden Mechanismus im Dunkeln war die Beeinflussung des Quench durch FR sowie die Unterdrückung des „recovery“ durch Zusatz von NaF.

*Zweitens:* Es kam bei *Euglena gracilis* in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität zu einem nichtphotochemischen Quench der Chlorophyllfluoreszenz. Dieser konnte anhand der „recovery“-Daten und dem Einfluß eines Entkopplers in drei Bestandteile zerlegt werden (Kap.3.4.2.2; Tab.10; Kap. 3.4.2.4). Die Analyse der Fluoreszenzerholungsphase nach Belichtung ergab in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität Bereiche mit unterschiedlicher Relaxationskinetik. Bei der Belichtung mit  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  waren die  $\Delta\text{pH}$ -abhängige Komponente  $q_{\text{E}_{\text{SV}}}$  der Löschung der Chlorophyllfluoreszenz und  $q_{\text{F}_{\text{SV}}}$ , der am schnellsten relaxierende Anteil (HWZ : 2,65 min) annähernd gleich groß.

Der Anteil der schnell relaxierenden Phase von Fm ( $q_{\text{F}_{\text{SV}}}$ ) war nach der Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  gegenüber dem  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Anteil ( $q_{\text{E}_{\text{SV}}}$ ) erhöht.

Im Gegensatz zu höheren Pflanzen war der von einem Protonengradienten abhängige Anteil des Quench der Fluoreszenz ( $q_{\text{E}_{\text{SV}}}$ ) unabhängig von einer Pigmentumwandlung. Auch die beobachtete Diatoxanthinabnahme korrelierte nicht mit diesem Effekt. Zumal der Anteil des Diatoxanthins am Gesamtcarotinoidgehalt sehr klein ist (vgl. Kap. 3.1.1).

*Drittens:* Der relative Anteil bzw. absolute Wert von  $q_{\text{E}_{\text{SV}}}$  war bei der Dunkelinkubation am geringsten. Die Belichtung führte zu einer höheren  $\Delta\text{pH}$ -regulierten Abnahme der Fluoreszenz, d.h. daß im Licht offenbar ein deutlich stärkerer Protonengradient aufgebaut werden muß, welcher für die Löschung der Fluoreszenz verantwortlich ist.

*Viertens:* Das „recovery“ der Fluoreszenz nach Belichtung und nach der Dunkelinkubation wurde durch NaF weitgehend inhibiert. Natriumfluorid inhibiert die Relaxation von „state 2“ zu „state 1“ und führt so zur Fixierung des „state 2“. Bei Anwesenheit des Inhibitors im „recovery“ nach der Lichtwirkung konnte eine Aufhebung der Löschung der Chlorophyllfluoreszenz nur um 31,52% von  $\text{SV}_m$  der Kontrolle gemessen werden, was dem Anteil von  $q_{\text{E}_{\text{SV}}}$  unter gleichen Belichtungsbedingungen entspricht. Nach der Dunkelinkubation relaxierten unter Einfluß von NaF

23,84% von  $SV_m$ , was wiederum annähernd dem  $\Delta pH$ -abhängigem Anteil entspricht. Die NaF-Wirkung wird als Hinweis auf Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsmechanismen gewertet, welche die Mobilität von Pigment-Proteinen innerhalb der Thylakoidmembran regulieren. Wichtig ist hier anzumerken, daß die Wirkung von NaF komplex sein kann. QUICK UND STITT (1989) sowie WALTERS UND HORTON, (1991) erwähnen eine Reduzierung der lichtgesättigten Photosyntheserate in Anwesenheit von NaF.

*Fünftens:* Erst nach 15minütiger Belichtung in Bereichen der Lichtsättigung ( $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) war das Ausmaß des Quench der Chlorophyllfluoreszenz stärker als der durch Dunkelheit induzierte Quench (vgl. Abb.17).

*Sechstens:* Die Halbwertszeit für das „recovery“ von Fm war abhängig von den unterschiedlichen Anteilen der Komponenten  $qE_{SV}$ ,  $qT_{SV}$  und  $qI_{SV}$ . Für das „recovery“ nach Belichtung mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  wurde die längste HWZ ermittelt. Der prozentuale Anteil von  $qE_{SV}$  (13,9%) am Gesamtquench war hier, im Vergleich zu den anderen Belichtungsintensitäten, am geringsten bzw. der Anteil von  $qI$  am höchsten.

Der  $\Delta pH$ -abhängige Quench bei *Euglena gracilis* unterschied sich in der HWZ stark von den Literaturdaten für höhere Pflanzen. Für die schnelle,  $\Delta pH$ -abhängige Komponente des „recovery“ findet man HWZ von 30 s (HORTON UND HAGDE, 1988) bis 1,3 min (WALTERS UND HORTON, 1991). Der Anteil von  $qE$  entsprach bei der Belichtung mit  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  71% und war somit die dominierende Komponente des Fm Quench. Die ermittelte HWZ für die vollständige Fm Erholung betrug in diesem Fall 3,95 min und war somit die kürzeste HWZ im Vergleich zu den anderen Belichtungsbedingungen.

*Siebtens:* Durch Analyse der „recovery“-Daten konnten für das „recovery“ drei lineare Phasen ( $qF_{SV}$ ,  $qM_{SV}$ ,  $qS_{SV}$ ) hervorgehoben werden. Die Halbwertszeiten der schnellen Phase der Erholung von Fm lagen im Bereich von 2,65 min-4,01 min in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität und sind somit gegenüber höheren Pflanzen und Grünalgen deutlich verlangsamt.

### **3.5 Untersuchungen an carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* - Einfluß der Pigmentausrüstung auf Komponenten des nichtphotochemischen Quench**

Um die Beteiligung von Pigment-Proteinkomplexen an photoprotektiven Prozessen, welche zu einer nichtphotochemischen Löschung der Fluoreszenz führen, zu untersuchen, wurden Fluoreszenzuntersuchungen an carotinoidverarmten Zellen durchgeführt.

#### **3.5.1 Der nichtphotochemische Quench carotinoidverarmter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen von *Euglena gracilis***

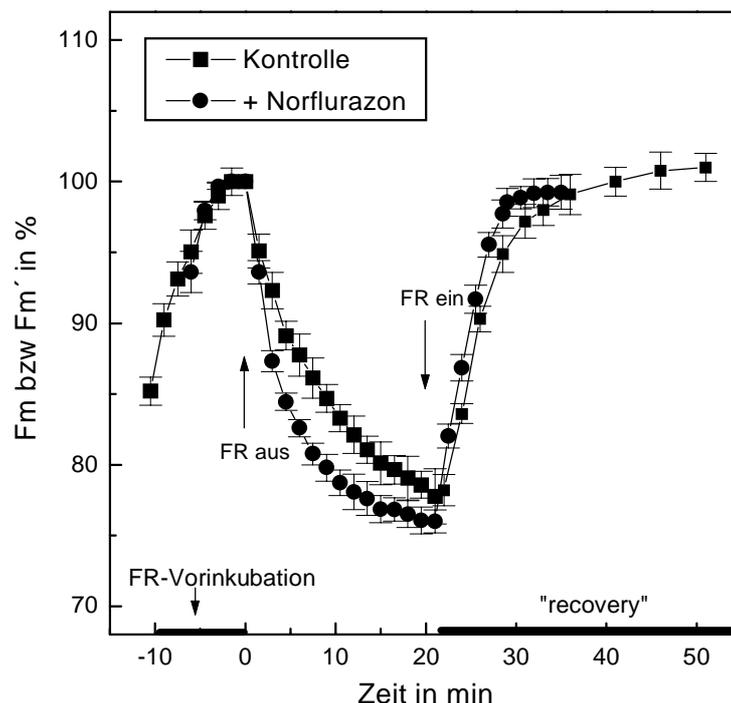
Als sekundärer Effekt der Norflurazonwirkung während der Anzucht trat eine Reduzierung der Chlorophylle pro Zelle auf. Aus diesem Grund wurden die Zellsuspensionen für die vergleichenden Versuche wie beschrieben auf gleiche optische Dichte eingestellt.

Der Chlorophyllgehalt der carotinoidverarmten Proben betrug im Durchschnitt  $3,6 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Dieser geringe Chlorophyllgehalt bedingte höhere Verstärkereinstellungen der PAM. So sind die Fluoreszenzintensitäten der unbehandelten bzw. carotinoidverarmten Zelle nicht direkt

miteinander vergleichbar. Die maximalen Signale wurden auf 100% der jeweiligen Variante normiert.

In den Abbildungen 21-24 ist die nichtphotochemische Löschung der maximale Fluoreszenz durch Dunkelinkubation oder Licht unterschiedlicher Intensitäten sowie das anschließende „recovery“ der carotinoidverarmten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt.

Ebenso wie bei den unbehandelten Zellen konnte in den carotinoidverarmten Zellen ein Dunkelquench gemessen werden, welcher durch FR-Bestrahlung aufgehoben wurde. Während die unbehandelten Zellen, weiterhin als Kontrolle bezeichnet, in der Regel 10 min mit FR inkubiert werden mußten, um die maximal mögliche Fluoreszenz zu emittieren, reichte bei der carotinoidverarmten Variante eine 5minütige Vorinkubation aus (vgl. Abb.21).



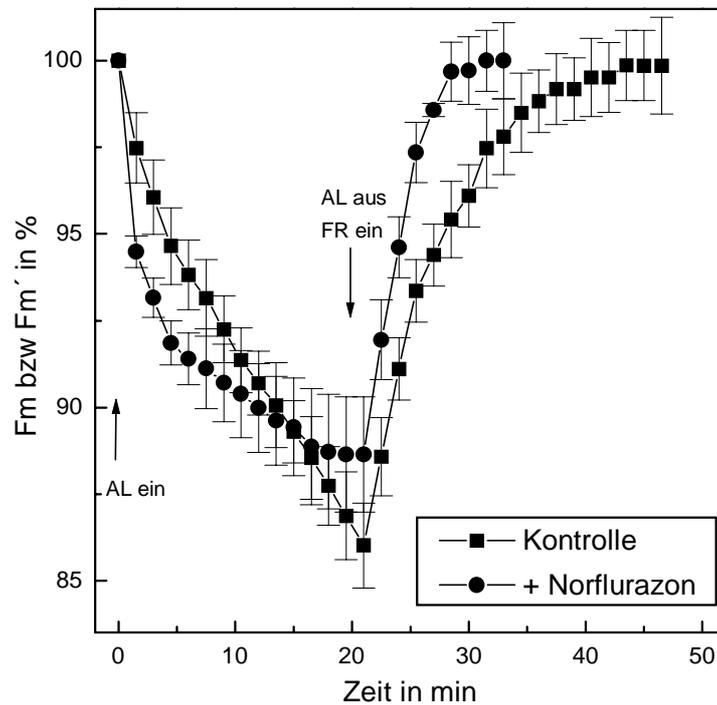
**Abb.21** Einfluß der Dunkelinkubation auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen (Anzucht: + 5  $\mu\text{M}$  Norflurazon) und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle); Chl-Konzentration: Kontrolle = 12  $\mu\text{g/ml}$ , +Norflurazon = 3,6  $\mu\text{g/ml}$ ; n = 3-5

Der Dunkelquench war bei den carotinoidverarmten Zellen stärker ausgeprägt als bei der unbehandelten Zelle. Bei der Kontrolle wurde die Grundfluoreszenz auf  $83,68\% \pm 1,7\%$  erniedrigt. Dagegen sank  $F_0$  bei der carotinoidverarmten Zelle nur auf  $91,2\% \pm 1,8\%$ . Aus diesen Ergebnissen ließ sich die Aussage ableiten, daß durch die Carotinoidverarmung ein Prozeß, welcher zum Quench der Grundfluoreszenz führt, weniger stark ausgeprägt ist.

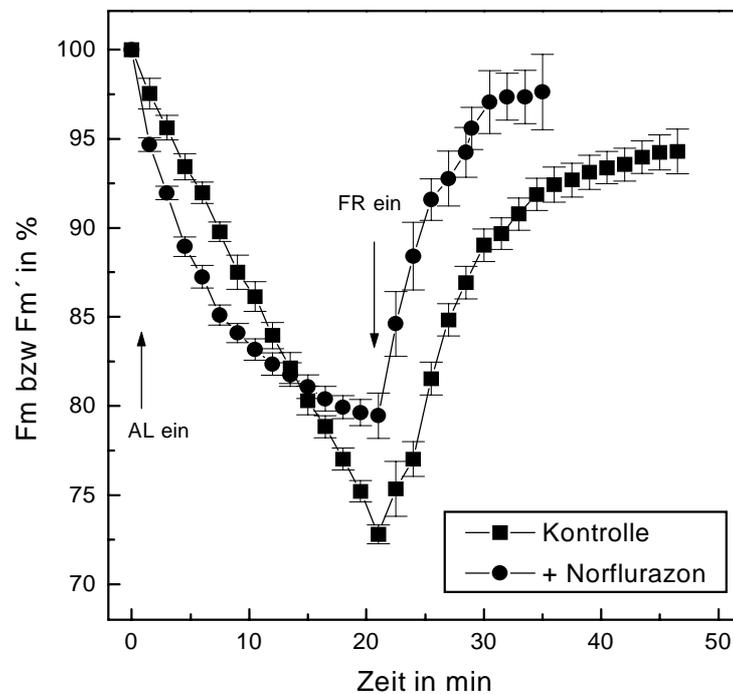
Die Erholung der maximalen Fluoreszenz nach Dunkelinkubation unter FR- Licht war für die carotinoidverarmten wie auch für die unbehandelten Zellen in beiden Fällen vollständig. Die HWZ für die Erholung von  $F_m$  nach der Dunkelinkubation der carotinoidverarmten Zellen sind in der Tab.13 dargestellt.

Der Vergleich der unbehandelten mit den carotinoidverarmten Zellen während der Belichtung mit  $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  ist in der Abb.22, die Belichtung mit  $300 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  in der Abb.23 und

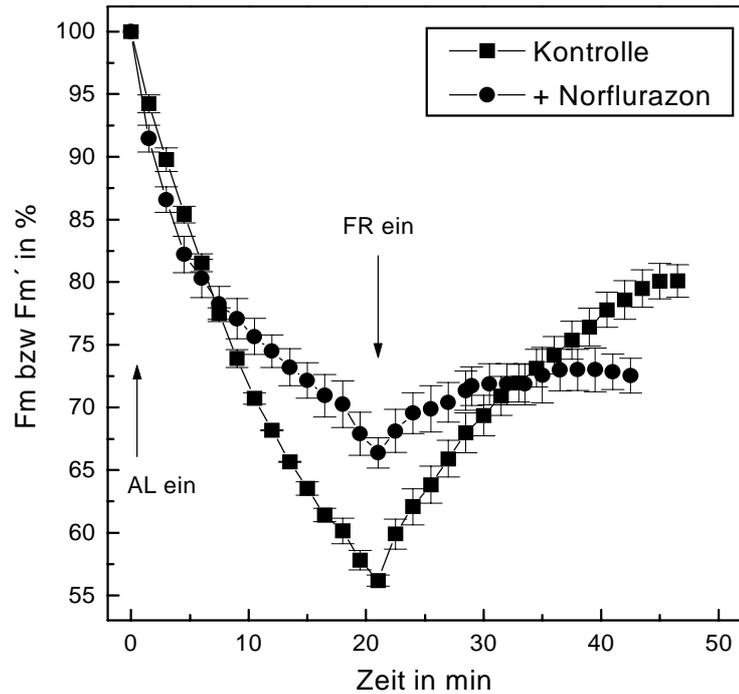
die Belichtung mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  in der Abb.24 dargestellt. Das „recovery“ wurde bis zum Erreichen eines stabilen  $F_m'$ -Wertes durchgeführt, in der Regel nicht länger als 26 min.



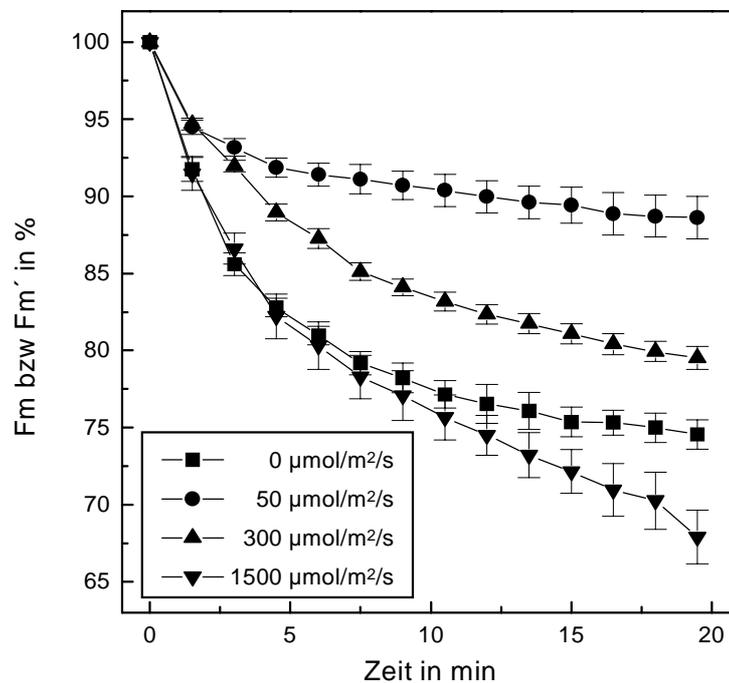
**Abb.22** Einfluß der Belichtung ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zur Kontrolle; Bedingungen wie bei Abb.21;  $n = 3-5$ ;



**Abb.23** Einfluß der Belichtung ( $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zur Kontrolle; Bedingungen wie bei Abb.21;  $n = 3-5$ ;



**Abb.24** Einfluß der Belichtung ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zur Kontrolle; Bedingungen wie bei Abb.21;  $n = 3-5$ ;



**Abb.25** Zusammenfassende Darstellung der Löschung der maximalen Fluoreszenz durch Licht unterschiedlicher Intensitäten oder Dunkelinkubation carotinoidverarmter Zellen; Bedingungen wie in der Abb. 21;  $n = 3-5$

Auffallend war, daß die Löschung der Chlorophyllfluoreszenz in den ersten Minuten bei carotinoidverarmten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen stärker war (Abb.22-24). Nach

21minütiger Belichtung allerdings war die Löschung der Fluoreszenz bei unbehandelten Zellen gegenüber den carotinoidverarmten Zellen in jedem Fall erhöht.

Zusammenfassend sind in der Abb.25 die Auswirkungen von Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten sowie der Dunkelinkubation auf die maximale Fluoreszenz dargestellt.

Der Dunkelquench war stärker ausgeprägt als der durch die Belichtung mit 50 bzw. 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  hervorgerufene Quench (siehe Abb.25). Für diese 3 Versuchsbedingungen zeigten die Algen ein rasches und beinahe vollständiges „recovery“ der maximalen Fluoreszenz. Erst durch die Starklichtbehandlung (1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) stieg der durch Licht induzierte Quench über die Werte des Dunkelquench. Die Erholung der Fluoreszenz nach Belichtung mit 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  erreichte nur 72,52% des Ausgangswertes. Aus den „recovery“-Daten (Abb.24) ist ersichtlich, daß unter diesen Bedingungen vermehrt photoinhibitorische Prozesse zur Löschung der Chlorophyllfluoreszenz führten. blieb der lichtinduzierte Quench (Belichtung mit 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) kleiner als der Quench im Dunkeln, so erhielt man für den Anteil von  $q_{I_{SV}}$  minimale Werte (Tab.13).

Generell unterscheidet sich der Kurvenverlauf der Fluoreszenzabnahme im Licht der Norflurazon-Zellen von dem der Kontrollen. Die Kontrollkurven für den Quench ergaben einen beinahe linearen Verlauf (Abb.22-24), während die Fluoreszenzabnahme der carotinoidverarmten Zellen eher exponentiellen Charakter hatte.

**Tab.12** Einfluß unterschiedlicher Belichtungsintensitäten und der Dunkelinkubation in Abhängigkeit vom Carotinoidgehalt auf den Zustand des Photosyntheseapparates nach 21minütiger Versuchsdauer; Charakterisierung der Löschung der Chlorophyllfluoreszenz anhand unterschiedlicher Fluoreszenzparameter, Lichtintensität in  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ;  $\text{O}_2$ -Ent. = Sauerstoffproduktion in %; KO: Kontrolle; NF: carotinoidverarmte Zelle (5 $\mu\text{M}$  Norflurazon in der Anzucht); \* ohne FR-Vorinkubation

100% der  $\text{O}_2$ -Entwicklung der Kontrolle:

$98,3 \pm 2,1 \mu\text{mol}/\text{mg Chl}/\text{h}$ ;  $F_v/F_m = 0,645 \pm 0,005$

100% der  $\text{O}_2$ -Entwicklung der Norflurazon-Zellen:

$101,1 \pm 3,6 \mu\text{mol}/\text{mg Chl}/\text{h}$ ;  $F_v/F_m = 0,505 \pm 0,006$

	$SV_m$	$SV_o$	$q_N$	$t_{50\%}$ in min	$q_P$	yield	$F_v'/F_m'$	$\text{O}_2$ -Ent.*
<b>KO / 0</b>	0,315	0,204	0,278	5,02	-	-	0,609	100,0
<b>NF / 0</b>	0,342	0,098	0,386	2,80	-	-	0,408	100,0
<b>KO / 50</b>	0,165	0,100	0,170	7,50	0,799	0,492	0,620	107,1
<b>NF / 50</b>	0,128	0,035	0,191	1,81	0,923	0,425	0,460	102,3
<b>KO / 300</b>	0,355	0,124	0,346	9,51	0,337	0,203	0,568	106,5
<b>NF / 300</b>	0,262	0,080	0,334	4,10	0,547	0,232	0,424	97,8
<b>KO/1500</b>	0,758	0,079	0,640	6,52	0,073	0,027	0,409	91,2
<b>NF/ 1500</b>	0,494	0,032	0,622	3,54	0,205	0,032	0,284	72,0

Der Hauptanteil der möglichen Löschung trat hier in den ersten Minuten der Belichtung bzw. der Dunkelinkubation auf. Um dieses zu verdeutlichen, sind in der Tab.12 Zeiten angegeben, bei denen eine 50%ige der Löschung der maximalen Fluoreszenz ( $t_{50\%}$ ) unter den unterschiedlichen Bedingungen auftrat. Diese Werte wurden graphisch ermittelt. Unter allen Versuchsbedingungen waren bei den carotinoidverarmten Zellen 50% der maximalen Löschung der Fluoreszenz in kürzeren Zeiten erreicht. Mit zunehmender Belichtungsintensität wird dieser Un-

terschied geringer, wobei auch bei der Starklichtbehandlung ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) die Norflurazon-Zellen in ca. der Hälfte der Zeit, welche die unbehandelten Zellen zum Erreichen von 50% des Quench benötigen, 50% der maximalen Löschung von  $F_m$  erreicht haben. Desweiteren sind in der Tab.12 Fluoreszenz- und Photosyntheseparameter angegeben, welche Aussagen über den Zustand des Photosyntheseapparates nach Belichtung erlauben. Neben der unvollständigen Erholung der maximalen Fluoreszenz nach der Belichtung der carotinoidverarmten Zellen mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  war auch die photosynthetische Sauerstoffproduktion und die Effizienz des PS II ( $F_v/F_m'$ ) sicherlich durch die Zunahme photoinhibitorische Prozesse unter diesen Bedingungen reduziert.

Der photochemische Quench ( $q_P$ ) wurde bei den Kontrollen im Vergleich zur carotinoidverarmten Zelle stärker reduziert, während  $q_N$  unter gleichen Belichtungsbedingungen bei der Kontrolle wie auch bei der carotinoidverarmten Kultur annähernd gleich groß waren.

### 3.5.2 Vergleich des „recovery“ carotinoidverarmter und unbehandelter Zellen

Die Tab.13 enthält die HWZ des „recovery“ der Chlorophyllfluoreszenz nach der Dunkelinkubation und den Versuchen mit unterschiedlichen Belichtungsintensitäten carotinoidverarmter Zellen und gibt den Anteil von  $q_{I_{SV}}$  am Quench der Fluoreszenz carotinoidverarmter Zellen wieder.

**Tab.13** HWZ des „recovery“ der Chlorophyllfluoreszenz nach Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten und der Dunkelinkubation sowie der Anteil von  $q_{I_{SV}}$  am Gesamtquench carotinoidverarmter Zellen, Belichtungsdauer 21 min;

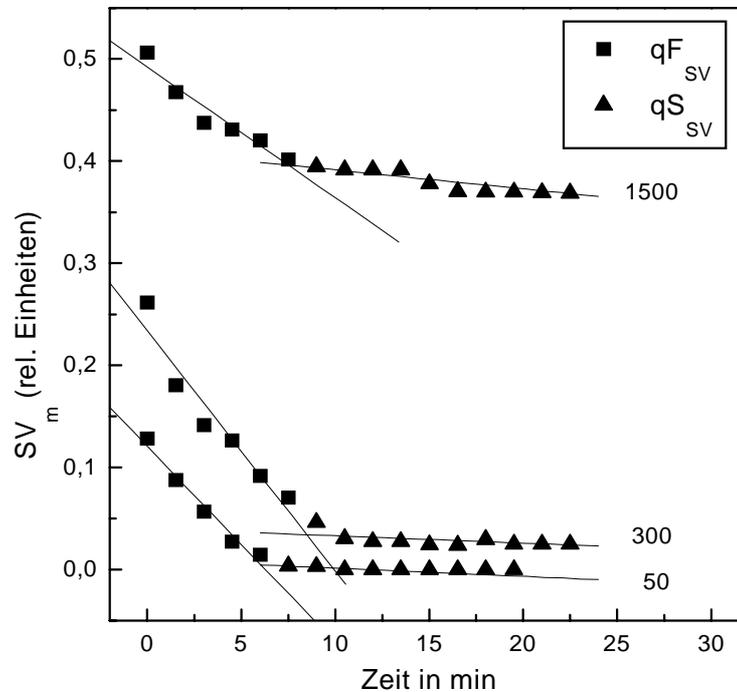
	$F_m'$ in %	$F_{m_{Rec.}}$ in %	$q_{I_{SV}}$	$q_{I_{SV}}$ in %	HWZ in min
<b>0 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$74,45 \pm 0,948$	$99,59 \pm 0,99$	-	-	2,93
<b>50 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$88,64 \pm 1,370$	$100,00 \pm 0,9$	0,000	0,01	2,83
<b>300 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$79,28 \pm 0,744$	$97,25 \pm 2,3$	0,028	10,62	3,04
<b>1500 <math>\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}</math></b>	$67,00 \pm 1,730$	$72,85 \pm 1,3$	0,379	76,72	3,36

Die HWZ des „recovery“ der carotinoidverarmten Zellen sind bei allen Belichtungsbedingungen wie auch nach der Dunkelinkubation im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen deutlich verkürzt (vgl. Tab.9)

Bei der Belichtung mit Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) kommt es zur deutlichen irreversiblen Schädigung der Photosynthese der carotinoidverarmten Zellen. Nur 5,85% der Fluoreszenz relaxierte durch FR-Bestrahlung. Der Rest, durch photoinhibitorische Prozesse entstanden, erholte sich im untersuchtem Zeitraum nicht wieder. Die starke Schädigung spiegelt sich auch in der Abnahme der Sauerstoffproduktion wieder (Tab.12).

Die Analyse der Erholungsdaten von  $SV_m$  in Anlehnung an QUICK UND STITT (1989) ergab in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität 2 unterschiedliche Phasen der Relaxation der Fluoreszenz ( $q_{F_{SV}}$ : schnelle Relaxation ;  $q_{S_{SV}}$ : langsame Relaxation). In der Abb.26 ist die lineare Anpassung der Werte für  $SV_m$  während des „recovery“ dargestellt. Der Verlust der mittleren Phase (vgl. Abb. 18) der Erholung von  $SV_m$  ( $q_{M_{SV}}$ ) durch die Carotinoidverarmung verursachte

die Verkürzung der HWZ des „recovery“ von Fm im Vergleich zur unbehandelten Zelle. Dieses Ergebnis weist auf den Verlust eines fluoreszenzlöschenden Mechanismus hin, welcher mit einer mittleren HWZ relaxiert, in Folge der Carotinoidverarmung hin. Damit wurde ein weiterer Unterschied im Fluoreszenzverhalten zwischen carotinoidverarmten und unbehandelten Zellen (vgl. Abb.18) ersichtlich.



**Abb.26** Lineare Anpassung der  $SV_m$  „recovery“-Daten nach 21minütiger Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ,  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) von carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; „recovery“ unter FR-Licht

**Tab.14** Komponenten des nichtphotochemischen Quench berechnet durch lineare Extrapolation und Verrechnung der einzelnen Phasen nach QUICK und STITT (1989);  $qF_{SV}$ : schnelle Phase;  $qS_{SV}$ : langsame Phase

	$qF_{SV}\%$	HWZ in min	$qS_{SV}\%$	HWZ in min
$50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$95,0 \pm 5,7$	2,54	$5,0 \pm 2,7$	> 30
$300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$85,3 \pm 5,2$	3,07	$14,6 \pm 6,3$	> 30
$1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$20,2 \pm 10,0$	2,60	$79,8 \pm 1,7$	> 30

Die Tab.14 enthält die kalkulierten, unterschiedlich schnell relaxierenden Anteile vom Quench der maximalen Fluoreszenz und deren graphisch ermittelten Halbwertszeiten.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (vgl. Abb.18) fehlte den carotinoidverarmten Zellen die mittlere Relaxationsphase der Fm-Erholung unabhängig von der Belichtungsintensität. Nach der Belichtung mit einer Intensität von  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  war der Hauptanteil des Quench durch eine Komponente, welche eine schnelle Fm Relaxation aufwies

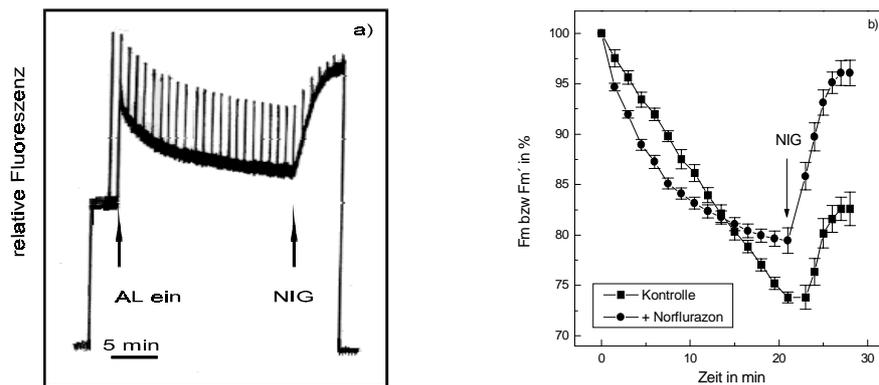
(HWZ 2,54 min bzw. 3,07 min), bestimmt. Der Anteil von  $qS_{sv}$  war unter diesen Bedingungen gering und besaß eine HWZ  $> 30$  min. Anhand der hohen HWZ können photoinhibitorische Mechanismen für diese Prozeß verantwortlich gemacht werden.

Durch die Belichtung mit Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) erhöhte sich stark der langsam relaxierende Anteil von Fm. Dieses wies ebenfalls auf die Zunahme photoinhibitorischer Prozesse unter diesen Bedingungen hin.

### 3.5.3 Einfluß von Nigericin auf den Quench der Chlorophyllfluoreszenz carotinoidverarmter Zellen

Die Unterschiede in den HWZ sowie in der Analyse der Relaxationsdaten von Fm der carotinoidverarmten Zelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ließen vermuten, daß es eine Verschiebung der Anteile der am Quench beteiligten Prozesse gegeben haben mußte.

Nigericin hatte in der carotinoidverarmten Zelle eine schnellere Wirkung als bei der entsprechenden Kontrolle auf die stationäre Phase der Fluoreszenz und auf die maximale Fluoreszenz. Der Einsatz von Nigericin ließ einen prozentual höheren Anteil von  $qE_{SV}$  am Gesamtquench deutlich werden.



**Abb.27** Einfluß von Nigericin auf die Fluoreszenz von *Euglena gracilis*; a) Fluoreszenzprotokoll der Nigericinwirkung ( $60 \mu\text{M}$ ) auf carotinoidverarmter Zellen nach 21 min Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; b) Vergleich der Nigericinwirkung ( $60 \mu\text{M}$ ) auf carotinoidverarmte und unbehandelte Zellen unter gleichen Bedingungen

Die Abb.27 enthält ein Fluoreszenzprotokoll der Nigericinwirkung auf eine carotinoidverarmte Probe, welche 20 min mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  belichtet worden war. Daneben ist der Vergleich der Nigericinwirkung auf carotinoidverarmte und unbehandelten Algen dargestellt.

**Tab.15** Anteil des  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Quench am Gesamtquench der Chlorophyllfluoreszenz carotinoidverarmter Zellen während der Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten und der Dunkelinkubation

	$SV_m$	qE absolut	qE in %
$0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$0,342 \pm 0,0076$	$0,105 \pm 0,002$	$30,71 \pm 2,10$
$50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$0,128 \pm 0,0018$	$0,117 \pm 0,005$	$91,50 \pm 4,23$
$300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$0,262 \pm 0,0019$	$0,206 \pm 0,009$	$78,90 \pm 4,53$
$1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$0,494 \pm 0,0085$	$0,157 \pm 0,007$	$31,80 \pm 4,21$

In der Tab. 15 ist der prozentuale und absolute Anteil von  $q_{E_{SV}}$  an der Löschung der maximalen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität zusammengefaßt.

Mit zunehmender Belichtungsintensität und somit zunehmendem  $SV_m$  sinkt der prozentuale Anteil des  $\Delta pH$ -abhängigen Quench am Gesamtquench von Fm. Die durch Dunkelinkubation hervorgerufene Löschung der Fluoreszenz ist nur zu 30,7% von einem transthylakoidalen pH-Gradienten abhängig. Im Vergleich dieser Daten mit denen für die unbehandelten Zellen im Kap. 3.4.2.4 dargestellten Werte wird ersichtlich, daß bei carotinoidverarmten Zellen die Löschung der Chlorophyllfluoreszenz bei Belichtung mit Intensitäten unterhalb der Lichtsättigung ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) bzw. im Bereich der Lichtsättigung ( $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) fast vollständig durch  $\Delta pH$ -abhängige Prozesse erklärt werden kann.

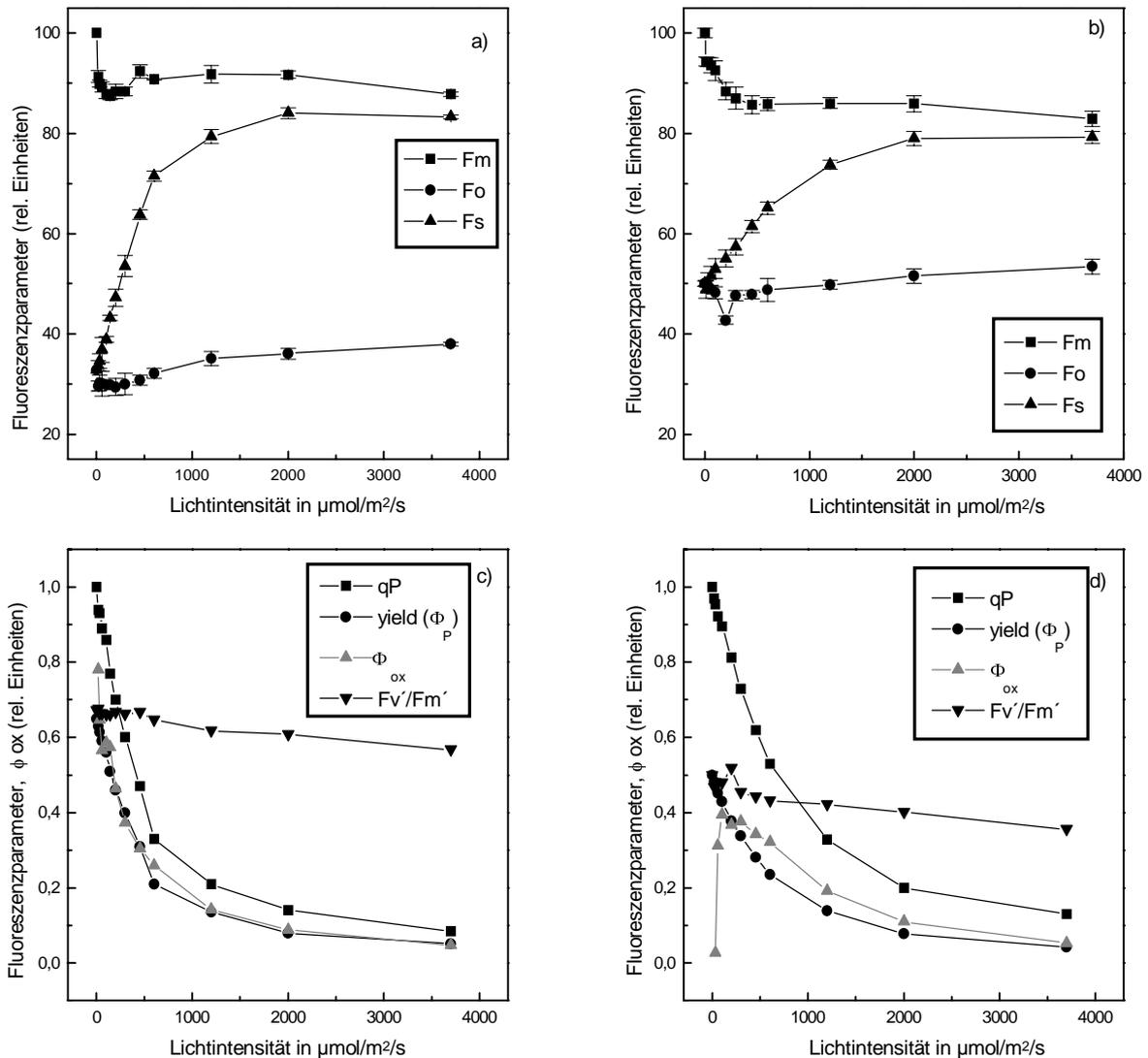
Die Belichtung mit Starklicht ( $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) führte zu einer starken Zunahme von  $q_{I_{SV}}$ . Bei den carotinoidverarmten Zellen war der Quench der Fluoreszenz aufgrund von photoinhibitorischen Prozessen, mit einem Anteil von 76,72%, gegenüber einem prozentualen Anteil von 32,8%  $q_{I_{SV}}$  bei unbehandelten Zellen stark erhöht. Dieses wurde auch in der Zunahme des langsam relaxierenden Anteils von  $SV_m$  (Tab.14) nach Belichtung der carotinoidverarmten Zellen deutlich. Der mit  $q_{T_{SV}}$  bezeichnete Prozeß bzw. die mittlere Erholungsphase von Fm (HWZ: 6 min-7 min; Tab.9) war bei den carotinoidverarmten Algen nahezu vollständig unterdrückt.

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß eine Verminderung von Carotinoiden zum Verlust eines wichtigen photoprotektiven Mechanismus führt, welcher abhängig von der Belichtungsintensität bei den unbehandelten Zellen für einen großen Teil des Gesamtquenches verantwortlich war. Die Verringerung des Fo-Quench bei Belichtung der carotinoidverarmten Zellen führte weiterhin zu dem Schluß, daß durch Carotinoidverarmung verlorengegangene Prozeß bei mixotrophen unbehandelten Zellen sowohl zur Löschung der maximalen Fluoreszenz als auch zur Löschung der Grundfluoreszenz führte. Anhand dieser Tatsachen wird angenommen, daß dieser quenchende Prozeß in den Lichtsammelantennen lokalisiert sein könnte (OLAIZOLA UND YAMAMOTO, 1994).

In Anbetracht bisheriger Ergebnisse mußten wir annehmen, daß eine strukturelle Funktion der Carotinoide innerhalb einzelner Lichtsammelantennen für das Vorhandensein eines photoprotektiven, fluoreszenzlöschenden Mechanismus von Bedeutung ist.

#### **3.5.4 Der photochemische und nichtphotochemische Quench der Fluoreszenz unbehandelter und carotinoidverarmter Zellen in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität**

Regulatorische, photoprotektive Prozesse bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen sollten durch Belichtungsexperimente verglichen und der Einfluß dieser auf Photosyntheseparameter weiter charakterisiert werden. Gerade im Schwachlichtbereich wurde die Anzahl der untersuchten Lichtintensitäten erhöht. Durch kürzere Belichtungsdauer (5 min) konnte darüber hinaus der Einfluß von photoinhibitorischen Prozessen auf die Löschung der Chlorophyllfluoreszenz minimiert werden. Belichtet wurden die Zellen bei gleicher optischer Dichte (Kontrolle:  $OD = 1,1 \pm 0,028$ ; Chl =  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; + Norflurazon:  $OD = 1,2 \pm 0,06$ ; Chl =  $3,3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in der Küvette des PAM-Fluorimeters.



**Abb.28** Abhängigkeit des Quotienten: Sauerstoffentwicklungsrate/Lichtintensität ( $\Phi_{ox}$ ) und verschiedener Fluoreszenzparameter von der Belichtungsintensität von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; Belichtungsdauer: 5min;  $n = 4-5$ ; unbehandelte Zellen: Chl-Konzentration  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\text{OD} = 1,1 \pm 0,02$ ; carotinoidverarmte Zellen ( $5\mu\text{M}$  NF in Anzucht): Chl-Konzentration:  $3,32 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\text{OD} = 1,2 \pm 0,06$ ; a) + c) unbehandelte Zellen; b) + d) carotinoidverarmte Zellen

Die Abb.28 zeigt zum einen die Auswirkungen der 5minütigen Belichtung auf die Grundfluoreszenz, die variable und die maximale Fluoreszenz der unbehandelten (Abb.28a) und carotinoidverarmten Zellen (Abb.28b). Zum anderen wird die Abhängigkeit des photochemischen Quench, der Quantenausbeute und des Quotienten aus der respirationskorrigierten Sauerstoffentwicklungsrate/Lichtintensität ( $\Phi_{ox}$ ) von der Belichtungsintensität dargestellt (Abb.28c,d).

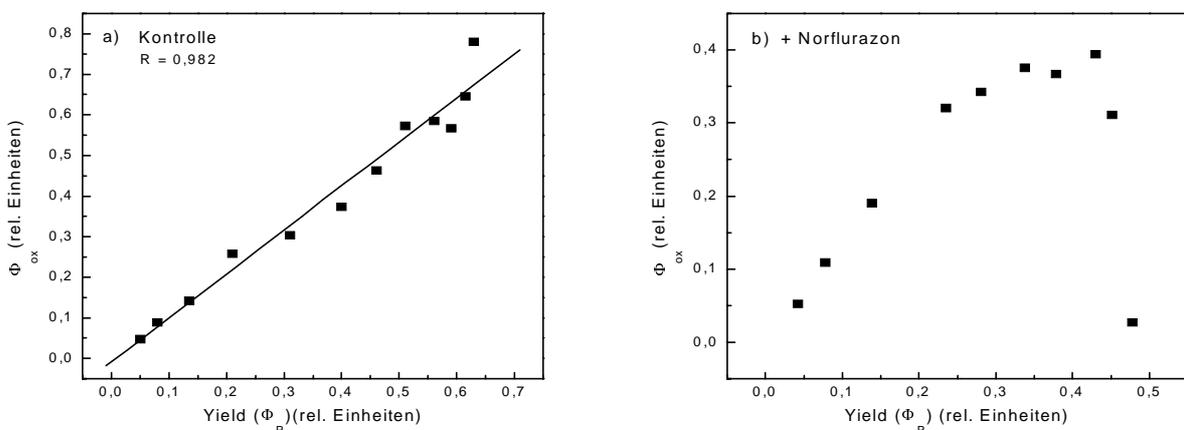
Wie aus den Abbildungen 28a,b ersichtlich ist, reagieren sowohl unbehandelte Zellen als auch carotinoidverarmte Zellen auf die 5minütige Belichtung mit einem Quench der maximalen Fluoreszenz auch bei schwachen Lichtintensitäten stark. Generell war die Löschung der maximalen Fluoreszenz unter diesen Bedingungen bei den carotinoidverarmten Zellen stärker. Im Gegensatz dazu war ein höherer Quench der Fluoreszenz bei der Kontrolle nach 21 minütiger Belichtung vorhanden.

Die stationäre Phase der Fluoreszenz (Fs) war bei den Algenkulturen unterschiedlich beeinflusst. Bei den carotinoidverarmten Zellen war dieser Anteil an der Gesamtfluoreszenz geringer. Während die unbehandelten Algen schon bei schwachen Belichtungsintensitäten ein hohes Maß dieser Fluoreszenz emittierten, war die Zunahme bei den carotinoidverarmten Zellen verzögert. Die Höhe von Fs während der Belichtung von unbehandelten Algen unterscheidet sich deutlich von der bei höheren Pflanzen. *Euglena gracilis* scheint einen hohen Teil der eingestrahnten Energie auch bei Lichtintensitäten unterhalb der Lichtsättigung als Fluoreszenz zu emittieren. Das Ausmaß ist abhängig vom Carotinoidgehalt der Algen.

Das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz verringerte sich durch die Carotinoidverarmung. Durch die Belichtung sank dieses Verhältnis in Abhängigkeit der Belichtungsintensität sowohl bei den unbehandelten als auch bei den behandelten Zellen (Abb.28c,d). Die Verringerung von  $F_v/F_m$  durch die Belichtung war bei den carotinoidverarmten Zellen prozentual größer und setzte bei diesen Zellen schon bei schwachem Licht ein. Die unbehandelten Zellen reagierten erst bei Belichtung oberhalb von  $450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  mit einer Abnahme dieses Quotienten. Somit sind die carotinoidverarmten Zellen empfindlicher gegenüber der Belichtung.

Der photochemische Quench (qP) beschreibt die Fähigkeit der PS II-Zentren, absorbierte Energie in chemische Energie umzusetzen. Er ist abhängig von dem Oxidationsstatus des Plastochinons  $Q_A$  und letztendlich ein Maß für die offenen Reaktionszentren. Mit der Zunahme der Lichtintensität sank der photochemische Quench rapide und wies somit auf die Zunahme der geschlossenen Reaktionszentren hin. Bei den carotinoidverarmten Zellen war die Abnahme von qP mit steigender Lichtintensität im Vergleich zur unbehandelten Zelle quantitativ reduziert und im kinetischen Verlauf verlangsamt (Abb.28c,d; Abb.30).

Der Parameter ( $\Phi_P$ : yield) wird durch den nichtphotochemischen (qN) und den photochemischen Quench (qP) beeinflusst. Die Lichtabhängigkeit von  $\Phi_P$  der unbehandelten Zellen entsprach der Abhängigkeit der Sauerstoffentwicklung von der Lichtintensität (Abb.28c). Für die carotinoidverarmten Zellen war dieses nicht der Fall. Unter extremen Schwachlichtbedingungen (bis  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) lag  $\Phi_{ox}$  deutlich unterhalb der Quantenausbeute ( $\Phi_P$ ). Aber auch bei höheren Belichtungsbedingungen konnte keine Übereinstimmung dieser Parameter bei den carotinoidverarmten Zellen beobachtet werden.

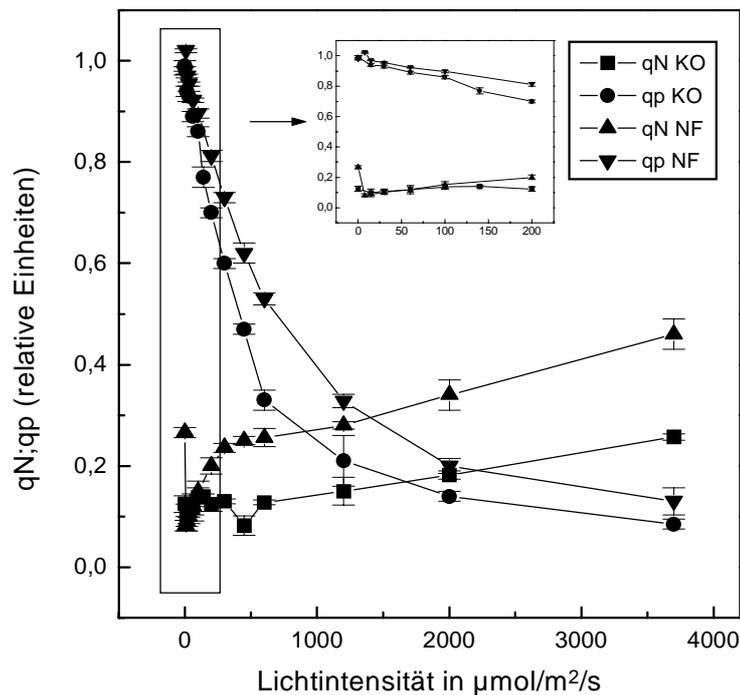


**Abb.29** Zusammenhang zwischen  $\Phi_{ox}$  und  $\Phi_P$  von unbehandelten a) Kontrolle und b) carotinoidverarmten Zellen (+ Norflurazon) von *Euglena gracilis*; Versuchsbedingungen siehe Abb. 28

Der lineare Zusammenhang dieser beiden Größen (Regressionskoeffizient 0,982) bei den unbehandelten Zellen soll mit Hilfe der Abb.29a verdeutlicht werden. Die Abb.29b beinhaltet die

Darstellung dieser Parameter der carotinoidverarmten Zellen. Bei diesen besteht kein linearer Zusammenhang zwischen  $\Phi_{ox}$  und  $\Phi_p$ . Zum einen muß angenommen werden, daß in extremen Schwachlichtbereichen (bis ca.  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) der möglicherweise nicht vollständig ausgeschaltete Dunkelquench Einfluß auf diese Beziehung nimmt, jedoch in darüber liegenden Bereichen kann der Dunkelquench nicht als Erklärung dienen. Der Verlust der Linearität zwischen  $\Phi_{ox}$  und  $\Phi_p$  könnte bei Einsatz von Intensitäten über  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  möglicherweise einem zyklischen Elektronentransport um das PS II geschuldet sein. (FALKOWSKI et al., 1986; PRASIL et al. 1996). Dieser wird unter anderem als eine Ursache eines  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Quench im RC II angesehen.

In der Abb.30 ist der photochemische und nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz abgebildet.



**Abb.30** Der photochemische und nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; KO = unbehandelte Zellen; NF = carotinoidverarmte Zellen; Versuchsbedingungen wie in Abb.28

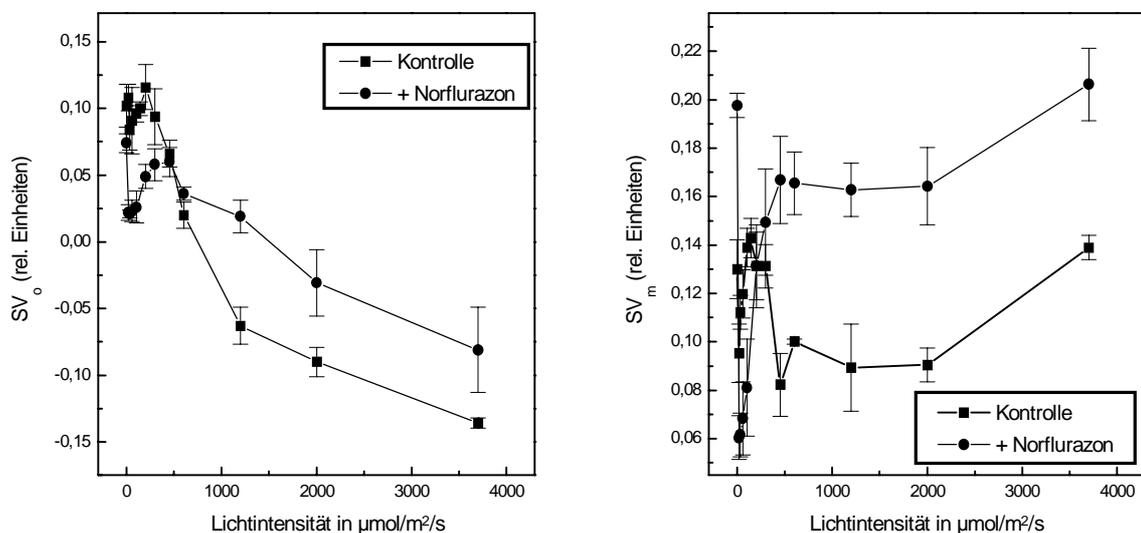
Alle untersuchten Belichtungsintensitäten führten zur Entwicklung eines nichtphotochemischen Quench. Der im Dunkeln vorhandene nichtphotochemische Quench wurde bei schwacher Belichtung verringert. Der kleinste gemessene Wert für  $q_N$  wurde bei Belichtung mit  $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  der unbehandelten Zellen und bei Belichtung der carotinoidverarmten Algen mit  $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  erreicht. Diese Intensitäten lagen nahe der Anzuchtbelichtung für die unterschiedlichen Kulturen und widerspiegeln vermutlich eine Adaptation der Algen an die Wachstumsbedingungen. CAMPELL UND ÖQUIST (1996) beschrieben diesen Effekt auch für Cyanobakterien. Interessanterweise beschreiben sie im gleichen Zusammenhang einen dunkelinduzierten Quench der Fluoreszenz, welcher aus „state-transitions“ resultieren soll.

Mit steigender Belichtungsintensität nahm der nichtphotochemische Quench bei beiden Algenkulturen zu. Auch war  $q_N$  bei carotinoidverarmten Zellen nach 5minütiger Belichtung stets

höher, jedoch nach 21minütiger Belichtung geringer als bei den unbehandelten Zellen (vgl. Tab.12).

Der photochemische Quench nahm mit steigender Lichtintensität bei beiden Algenkulturen ab. Bei der unbehandelten Zelle war die Verringerung von qP durch Belichtungsintensitäten im Bereich von  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  -  $3700 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  stärker als bei der Kontrolle, jedoch verringerte sich der Unterschied ab der Belichtung mit  $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Auch nach 21minütiger Belichtung der unterschiedlichen Zellkulturen mit unterschiedlicher Belichtungsintensität ist qP bei den carotinoidverarmten Zellen stets größer.

Der Einfluß der Belichtungsintensität auf den Quench von Fo und Fm ist Gegenstand der Abb.31. Durch die Carotinoidverarmung kam es zur Verringerung des Fo-Quench. Besonders deutlich wird die unterschiedliche Wirkung des Lichtes auf den Quench der Grundfluoreszenz bei Lichtintensitäten bis  $450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .



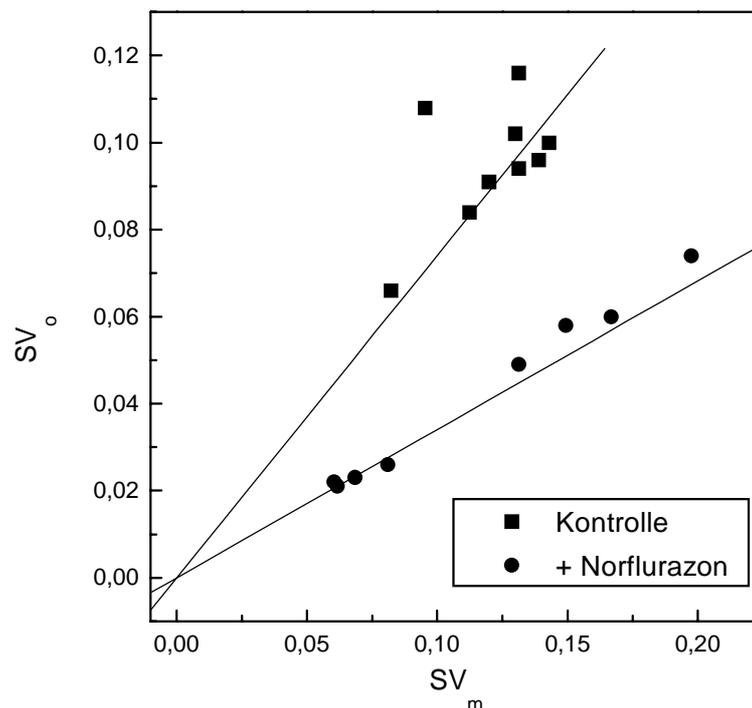
**Abb.31** Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten auf  $SV_0$  und  $SV_m$  bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen; Versuchsbedingungen wie in Abb.28;  $n = 4-5$

Ab dem Bereich der Lichtsättigung (Intensitäten über  $450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) nahm  $SV_0$  drastisch ab und erreichte bei hohen Lichtintensitäten negative Werte. Erklären läßt sich dieses Phänomen durch die gemessene Fo-Erhöhung unter diesen Bedingungen. Diese gemessene Fo-Erhöhung bei hohen Lichtintensitäten war bei den carotinoidverarmten Zellen geringer als bei der unbehandelten Kontrolle.

Neben der Abnahme des Quench der Grundfluoreszenz reagierten die carotinoidverarmten Zellen mit einem stärkeren Quench der maximalen Fluoreszenz nach 5minütiger Belichtung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Eine Ausnahme stellten die Proben, welche mit Lichtintensitäten bis einschließlich  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  belichtet wurden dar.

In der Abb.32 ist der Zusammenhang zwischen  $SV_0$  und  $SV_m$  dargestellt. Linearisiert man die Daten für die carotinoidverarmten Zellen, so ließ sich ein Regressionskoeffizient von 0,91 ermitteln. Mit steigendem  $SV_m$  nahm auch der Quench der Grundfluoreszenz zu. Der relativ flache Anstieg der Geraden, bei den carotinoidverarmten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Zelle veranschaulicht den stärkeren Quench der maximalen Fluoreszenz im Vergleich zur Grundfluoreszenz bei carotinoidverarmten Zellen.

Die Auftragung der Daten der Kontrollen verdeutlichte, daß unter den meisten Belichtungsbedingungen neben dem Quench der maximalen Fluoreszenz ein hoher Quench der Grundfluoreszenz auftrat. Es wird ersichtlich, daß  $F_o$  und  $F_m$  nahezu gleich durch Licht unterschiedlicher Lichtintensitäten gequench werden. Eine Löschung der maximalen Fluoreszenz war bei Belichtung der den unbehandelten Zellen mit Intensitäten bis zu  $600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  von einer höheren Löschung der Grundfluoreszenz im Vergleich zur carotinoidverarmten Zelle begleitet. Auch in dieser Darstellung wird deutlich, daß die Grundfluoreszenz bezogen auf die maximale Fluoreszenz bei unbehandelten Zellen stärker als bei der carotinoidverarmten Zelle gelöscht wurde. Nicht mehr zutreffend ist diese Aussage bei Belichtungsbedingungen welche eine  $F_o$ -Erhöhung bewirken, was wiederum Ausdruck einer starken Reduktion des PQ-Pools ist.



**Abb.32** Zusammenhang zwischen  $SV_o$  und  $SV_m$  bei unbehandelten ( $R = 0,532$ ) und carotinoidverarmten Zellen ( $R = 0,909$ ) von *Euglena gracilis*; Versuchsbedingungen wie in Abb. 28

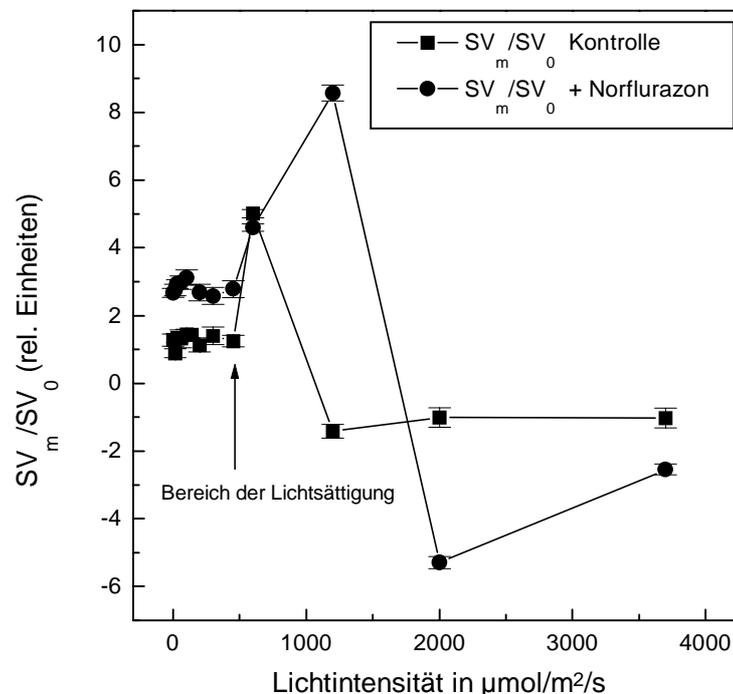
Das Verhältnis von  $SV_m/SV_o$  (Abb.33) betrug bei Belichtung der unbehandelten Zellen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten bis in den Bereich der Lichtsättigung  $1,27 \pm 0,066$ . Daraus ist zu schlußfolgern, daß nur ein geringer Teil des Quench der maximalen Fluoreszenz unabhängig von einer Löschung der Grundfluoreszenz erfolgte. Erst bei den sehr hohen Lichtintensitäten, oberhalb der Lichtsättigung, wird  $F_m$  unabhängig von  $F_o$  gequench, wofür offenbar photoinhibitorische Prozesse auch bei nur 5minütiger Belichtung verantwortlich sind. Weiterhin ist für die sprunghafte Zunahme des Quotienten bei Belichtung mit Intensitäten oberhalb  $600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  die ab dort stark auftretende  $F_o$ -Erhöhung verantwortlich.

Mehr als verdoppelt war der Quotient für  $SV_m$  durch  $SV_o$  sich durch die Carotinoidverarmung. Für die carotinoidverarmten Zellen konnte ein Wert von  $2,82 \pm 0,070$  ermittelt werden (Abb.33). Die Erhöhung des Quotienten im Vergleich zu dem der unbehandelten Kontrolle wurde durch die Verringerung des  $F_o$ -Quench bei carotinoidverarmten Zellen verursacht. Der größte

Teil der Löschung der maximalen Fluoreszenz erfolgte bei diesen Zellen unabhängig von einem Quench der Grundfluoreszenz.

Ebenso wie bei der unbehandelten Kultur kam es in Bereichen oberhalb der Lichtsättigung zu einem drastischen Ansteigen des Quotienten. Eine Belichtung mit Lichtintensitäten oberhalb der Lichtsättigung führte bei carotinoidverarmten und unbehandelten Zellen zur Erhöhung von Fo. Eine Fo-Erhöhung wird als charakteristisches Merkmal photoinhibitorischer Prozesse angesehen (BRADBURY UND BAKER, 1986). Weiterhin spiegelt eine Erhöhung von Fo den Reduktionsgrad des PQ-Pools wieder. Da nach 21minütiger Belichtung mit  $1500\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  keine Fo-Erhöhung gemessen wurde, scheint diese Fo-Erhöhung transienter Natur zu sein. Der Einsatz photoregulatorischer Prozesse bei weiterer Belichtung, möglicherweise in Abhängigkeit des Reduktionsgrad des PQ-Pools, scheint die Dominanz photoinhibitorischer Prozesse zu minimieren.

KRAUSE et al., 1990 diskutieren eine Fo-Erhöhung bedingt durch Ablösen der trimeren Antennen (LHC II) vom RC II.



**Abb.33** Vergleich des Quotienten  $SV_m/SV_0$  von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und carotinoidverarmten Zellen (+ Norflurazon) von *Euglena gracilis* in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität; Versuchsbedingungen wie in Abb.28

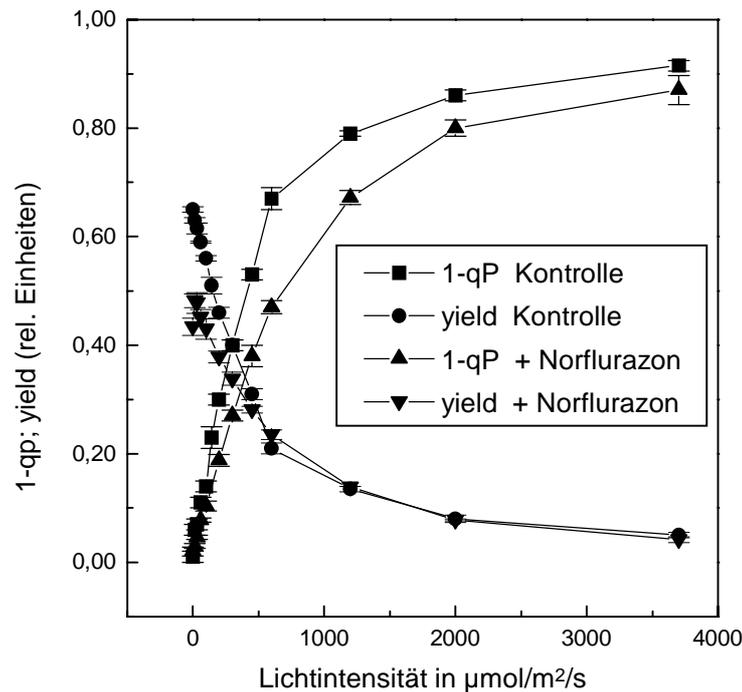
### 3.5.5 Zusammenfassende, vergleichende Darstellung von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen

Die carotinoidverarmten Zellen reagierten empfindlicher auf die Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten. Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung, die PS I-Aktivität und das D1-Protein waren bei der unbehandelten Zelle im Vergleich zur carotinoidverarmten Alge stabiler gegenüber dem Einfluß der unterschiedlichen Belichtungsintensitäten (vgl. Kap.

3.2.3-3.3). Die Carotinoidverarmung führte zum Verlust eines photoprotektiven Mechanismus, welcher von essentieller Bedeutung war.

Im folgenden sollen wesentliche Unterschiede im Fluoreszenzverhalten von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen zusammengefaßt und verdeutlicht werden.

Der Term  $1-q_p$  ist ein Maß für die Reduktion des PQ-Pools. Diese ist Gegenstand der Abb.34. Mit steigender Reduktion des PSII nimmt dessen Quantenausbeute ab. Auffallend ist, daß der Reduktionsgrad der carotinoidverarmten Zellen durch Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten auch in den Bereichen der Lichtsättigung und darüber geringer war. Die Quantenausbeute bei Belichtungen ab  $450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  war jedoch gleich.

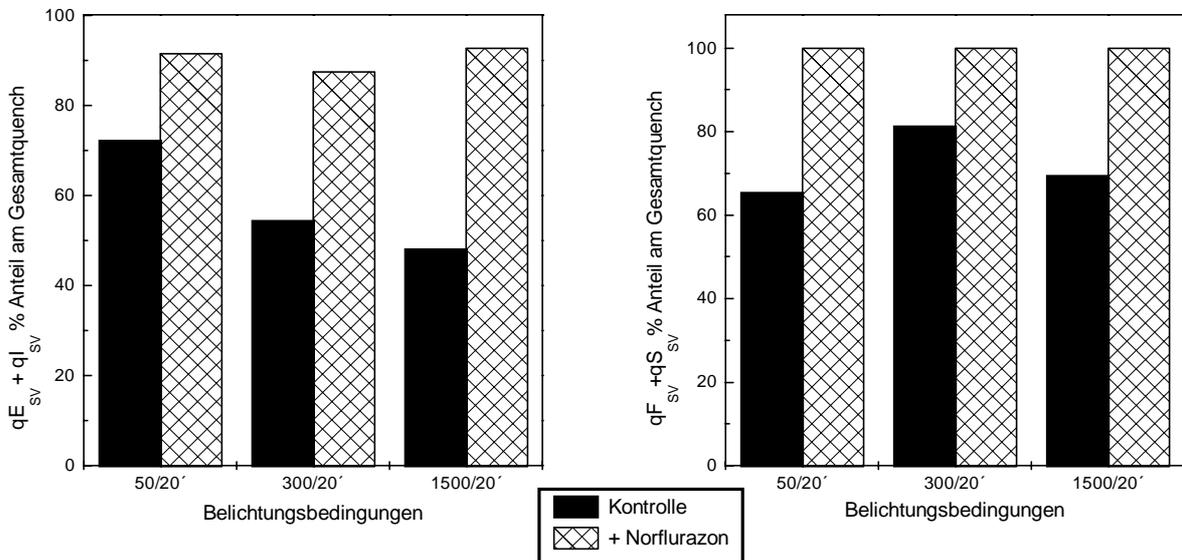


**Abb.34** Einfluß unterschiedlicher Belichtungsintensitäten auf den Reduktionsgrad des PQ-Pools und die Quantenausbeute des PS II bei unbehandelten (Kontrolle) und carotinoidverarmten (+ Norflurazon) Zellen von *Euglena gracilis*, Versuchsbedingungen wie in Abb.28

Addierte man die Anteile  $qE_{SV}$  und  $qI_{SV}$  für die jeweiligen Zelltypen so ließ sich bei den carotinoidverarmten Zellen der Gesamtquench fast vollständig durch diese zwei Prozesse beschreiben. Bei der unbehandelten Zelle konnte ein wesentlicher Anteil des Quench nicht durch  $\Delta\text{pH}$ -abhängige oder photoinhibitorische Prozesse erklärt werden. Dieser Unterschied ist in der Abb.35 gezeigt.

Ebenfalls in der Abb.35 dargestellt ist die Summe der schnell ( $qF_{SV}$ ) und der langsam ( $qS_{SV}$ ) relaxierenden Anteile der Erholung der maximalen Fluoreszenz nach Belichtung der verschiedenen Algenkulturen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten. In beiden Darstellungen wird ersichtlich, daß die Carotinoidverarmung zum Verlust eines fluoreszenzlöschenden Mechanismus führte. Die Summen aus  $qE_{SV}$  und  $qI_{SV}$  bzw. aus  $qF_{SV}$  und  $qS_{SV}$  können den aufgetretenen Quench der Fluoreszenz der carotinoidverarmten Zellen nahezu vollständig erklären. Völlig anders verhielt sich dieses bei den unbehandelten Zellen. Beide Darstellungen belegen das Vorhandensein eines dritten Mechanismus bei den unbehandelten Zellen.

Die Halbwertszeiten des „recovery“ nach der Belichtung sind bei Vorhandensein dieses Prozesses, also bei den unbehandelten Zellen im Vergleich zur carotinoidverarmten Zelle, verlängert.

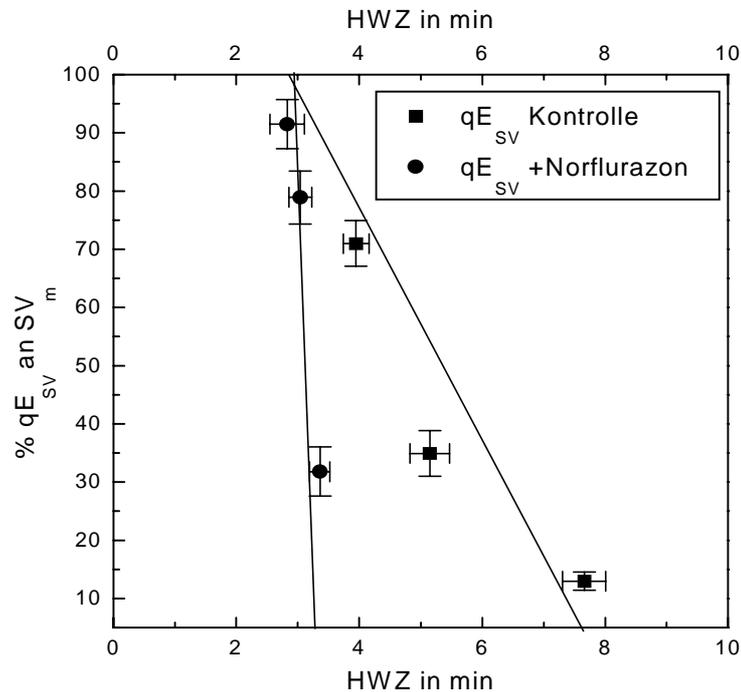


**Abb.35** Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Summe der Komponenten  $qE_{SV} + qI_{SV}$  (a) bzw.  $qF_{SV} + qS_{SV}$  (b) des nichtphotochemischen Quench bezogen auf den Gesamtquench nach 21minütiger Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten (in  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) der jeweiligen Kultur; 100% entsprechen  $SV_{\text{max}}$  (siehe Tab.12) der jeweiligen Alge

In der Abb.36 ist der Zusammenhang zwischen  $qE_{SV}$  und den Halbwertszeiten der Relaxation von Fm nach Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten dargestellt. Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, daß der Quench der Chlorophyllfluoreszenz, welcher innerhalb von max. 26 min relaxiert, bei der unbehandelten Zelle durch 2 Prozesse mit unterschiedlicher Halbwertszeit verursacht wurde. Für die Annahme eines 100%igen  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Quench kann eine theoretische HWZ von 2,91 min graphisch durch Extrapolation bestimmt werden. Bei 0%  $qE$  im nichtphotochemischen Quench der Chlorophyllfluoreszenz wurde eine HWZ 7,81 min für die unbehandelte Zelle ermittelt. Der Anteil photoinhibitorische Prozesse am Gesamtquench wurde bei der Bestimmung der HWZ vernachlässigt, denn innerhalb eines 25 min „recovery“ relaxiert der Anteil von Fm, welcher durch photoinhibitorische Prozesse gelöscht worden ist, kaum, da für photoinhibitorische Prozesse eine HWZ  $> 30$  min beschrieben ist (DEMMIG UND BJÖRKMANN, 1987; HORTON UND HAGUE, 1988; QUICK UND STITT, 1989).

Bei den carotinoidverarmten Zellen kann bei theoretischer Annahme  $qE = 100\%$  bzw. 0% Anteil am Gesamtquench keine unterschiedliche HWZ bestimmt werden. Bei Annahme 100%  $qE$ -Anteil am Gesamtquench konnte eine HWZ von 2,91 graphisch ermittelt werden. Diese stimmt mit der für die unbehandelten Zellen ermittelte HWZ überein. Der Quench der Chlorophyllfluoreszenz bei den carotinoidverarmten Zellen nach Belichtung ist durch höhere  $qE$ -Anteile bestimmt. Die Halbwertszeiten für das „recovery“ sind generell kürzer. Der niedrige  $qE$ -Wert der carotinoidverarmten Zellen bei Belichtung mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  hat keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des „recovery“. Dieses ist durch den hohen Anteil von  $qI_{SV}$  (76,72%) erklärbar, welcher bei der Bestimmung der HWZ nicht berücksichtigt wurde. Der Anteil der ma-

ximalen Fluoreszenz, welche im „recovery“ eine Erholung zeigte, wurde bei carotinoidverarmten Zellen nahezu vollständig durch  $\Delta\text{pH}$ -abhängige Prozesse gelöscht.



**Abb.36** Zusammenhang zwischen dem Anteil von qE am Gesamtquenche und der Halbwertszeit des „recovery“ der Chlorophyllfluoreszenz bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; n = 3-5

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen neben der Beschreibung des nichtphotochemischen Quenches der unbehandelten Zellen folgende Schlußfolgerungen zu :

*Erstens:* Der nichtphotochemische Quench wurde durch die Reduzierung der Carotinoide bzw. der Pigment-Proteinkomplexe (Abb.9) stark modifiziert.

*Zweitens:* Das Ausmaß des nichtphotochemischen Quenches war nach 21minütiger Belichtung bei der unbehandelten Zelle größer als in Zellen mit vermindertem Carotinidgehalt. Die 4 stündigen Belichtungsversuche (Kap.3.2.3) zeigten aber, daß die unter Zusatz von Norflurazon (5 $\mu\text{M}$ ) gewachsenen Zellen empfindlicher auf Licht reagierten und schlechter geschützt waren. Somit muß die Verringerung des nichtphotochemischen Quenches der carotinoidverarmten Zellen nach 21minütiger Belichtung durch den Verlust photoprotektiver Mechanismen erklärt werden. Die Carotinoidverarmung verursachte eine Abnahme des Fm- und des Fo-Quenches. Die geringere Löschung der Grundfluoreszenz bei carotinoidverarmten Zellen zeigte sich schon nach 5minütiger Belichtung. Das Verhältnis von  $\text{SV}_m/\text{SV}_o$  erhöhte sich bei diesen Zellen.

*Drittens:* Der durch Belichtung hervorgerufene nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz war bei den carotinoidverarmten Zellen hauptsächlich ein  $\Delta\text{pH}$ -abhängiger Quench. Bei höherer Belichtungsintensität (1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) wurde die Chlorophyllfluoreszenz vermehrt durch photoinhibitorische Prozesse gelöscht, welches sich auch in einer Reduzierung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion widerspiegelte. Die 21minütige Belichtung mit 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  führte zu einer stärkeren Schädigung der carotinoidverarmten Zellen.

*Viertens:* Die HWZ des „recovery“ war bei den carotinoidverarmten Zellen kleiner, somit die Relaxation der Chlorophyllfluoreszenz schneller, welches mit dem hohen Anteil an qE übereinstimmt.

*Fünftens:* Die Verminderung der Antennen durch Carotinoidverarmung führt zu Zellen, welche bis zur Lichtsättigung eine geringere Quantenausbeute als die unbehandelten besitzen. Bei höheren Lichtintensitäten konnten gleiche Quantenausbeuten gemessen werden.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß die Reduzierung der Carotinoide bzw. Pigment-Proteinkomplexe zum Verlust von Mechanismen führt, welche eine Löschung der Chlorophyll a-Fluoreszenz bei 21minütiger Belichtung bewirkten und als photoprotektive Mechanismen anzusehen sind. Später wird gezeigt werden, daß die Reduzierung der Carotinoide zum Verlust bestimmter Pigment-Proteinkomplexe führt.

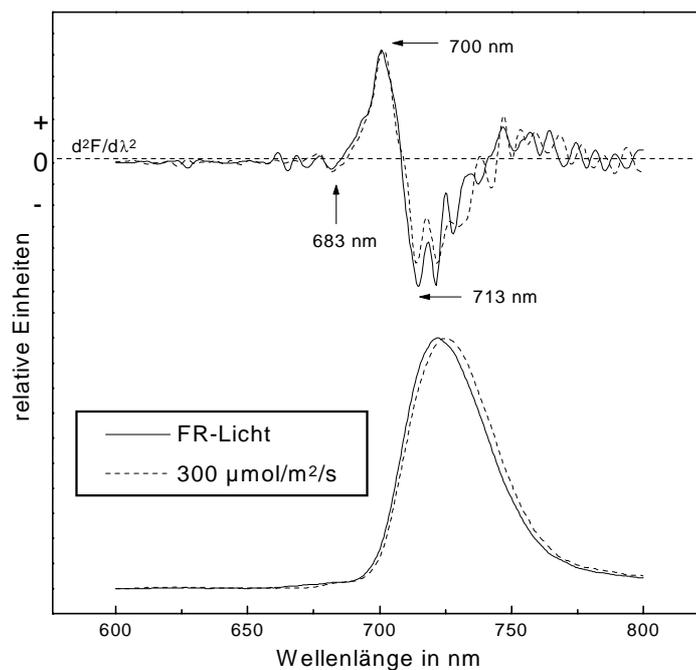
### 3.6 Analyse der Fluoreszenzmissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren

#### 3.6.1 Messung der Tieftemperaturspektren nach erfolgter Belichtung

Um eine mögliche Relation zwischen dem nichtphotochemischen Quench der Chlorophyllfluoreszenz und „state transitions“ bei der unbehandelten Alge aufzuzeigen wurden die Emissionsspektren der Fluoreszenz bei 77K aufgenommen.

WINTER UND BRANDT (1986) entwickelten für die sich im Zellzyklus befindenden Euglenazellen ein Modell, wonach nur neu synthetisierter LHC II mobil ist und somit reversibel an das PS I gebunden werden kann.

Tragen „state-transitions“ zur Entwicklung des nichtphotochemischen Quench durch Redoxbalance der Elektronentransportkette zwischen beiden Photosystemen bei, sollte dieses im Emissionsspektrum ersichtlich sein (MULLINEAUX UND ALLEN, 1986; CAMPPELL UND ÖQUIST, 1996).



**Abb.37** Einfluß der Belichtung ( $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; 20 min) im Vergleich zur FR bestrahlten Probe auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (77 K; 435 nm) der Alge *Euglena gracilis* und die zweite Ableitung der Fluoreszenzemissionsspektren; Chl-Konzentration  $2,0 \mu\text{g}/\text{ml}$

In der Abb.37 sind die FR-Licht bestrahlte ungequenchete Probe und eine für 20 min mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  belichtete Probe der unbehandelten Zellen von *Euglena gracilis* dargestellt. Die Fluoreszenzemission wurde durch Anregung bei 435 nm erzeugt und im Bereich von 600-800 nm registriert. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, wurde der Chlorophyllgehalt so gering wie möglich gewählt und überschritt nie  $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Die jeweilige Chlorophyllkonzentration ist den Abbildungen zu entnehmen. Die Emissionsspektren wurden auf das maximale Signal normiert.

Das Tieftemperaturspektrum der Alge *Euglena gracilis* wich stark von bisher beschriebenen Tieftemperaturspektren anderer einzelliger Grünalgen und dem der höheren Pflanzen ab. Allgemein kommt es bei niedrigen Temperaturen (77K) zur Fluoreszenz des PS I und somit zum Auftreten zwei getrennter Peaks für die zwei Photosysteme.

Neben der bei Raumtemperatur (RT) auftretenden Hauptbande bei 685 nm und der Schulter bei 740 nm kommt es bei 77K in höheren Pflanzen zusätzlich zur Fluoreszenzemission bei 696 nm und 735 nm (SIEFERMANN-HARMS, 1988). Für Grünalgen ist eine PS I-Fluoreszenzemission bei 720 nm beschrieben (KRAMER et al., 1985; RÖMER et al., 1990)

Bei *Euglena gracilis* konnten keine getrennten Fluoreszenzmissionsbanden bei 77 K vom PSII und PS I gemessen werden. Es wurde nur ein asymmetrischer Peak detektiert (Abb.37).

Das Maximum der Emission bei 77K lag bei 720 nm für die mit FR bestrahlte Probe und bei 722 nm für die belichtete Probe. Die Belichtung führte im Vergleich zur FR bestrahlten Probe zur Rotverschiebung des Maximums des gesamten Peaks um 2 nm. Wie beschrieben nahm durch die Belichtung die maximale Fluoreszenzausbeute ab. In der Ableitung der Fluoreszenzmissionsspektren wird die Abnahme einer bei 713 nm emittierenden Komponente durch die Belichtung deutlich. Diese Abnahme scheint für die Verschiebung des Fluoreszenzmissionsspektrum verantwortlich.

Wir konnten an dieser Stelle keine weiteren Aussagen über die Beteiligung von „state-transitions“ am nichtphotochemischen Quench treffen, da vermutlich ein zu höheren Pflanzen bzw. Grünalgen unterschiedlicher Antennenaufbau bei *Euglena gracilis* die Fluoreszenzemission ebenfalls beeinflusst.

Um mögliche Reabsorptionseffekte auszuschließen, wurden Proben in Glycerin und pulverisiert vermessen. Dieses geschah an unterschiedlichen Meßsystemen. Die gewählte Probenaufarbeitung bzw. das Meßsystem hatte keinen Einfluß auf das Spektrum. Der Chlorophyllgehalt der Probe war so optimiert, daß Reabsorptionseffekte durch zu hohe Chlorophyllkonzentrationen nicht auftreten konnten (WEIS, 1985).

### **3.6.2 Zur Rolle des PS I bzw. PS II an der Fluoreszenzemission von *Euglena gracilis* bei RT und 77 K**

Die folgenden Untersuchungen dienten der Analyse der Fluoreszenzemission von *Euglena gracilis*. Das bei tiefen Temperaturen aufgenommene Emissionsspektrum stellte durch das Fehlen eines typischen PS II Emissionspeaks im Bereich von 680-695 nm (KRAMER et al., 1985; SIEFERMANN-HARMS, 1988; GOVINDJEE, 1995) die Frage nach der Beteiligung des PS II an der Fluoreszenzemission.

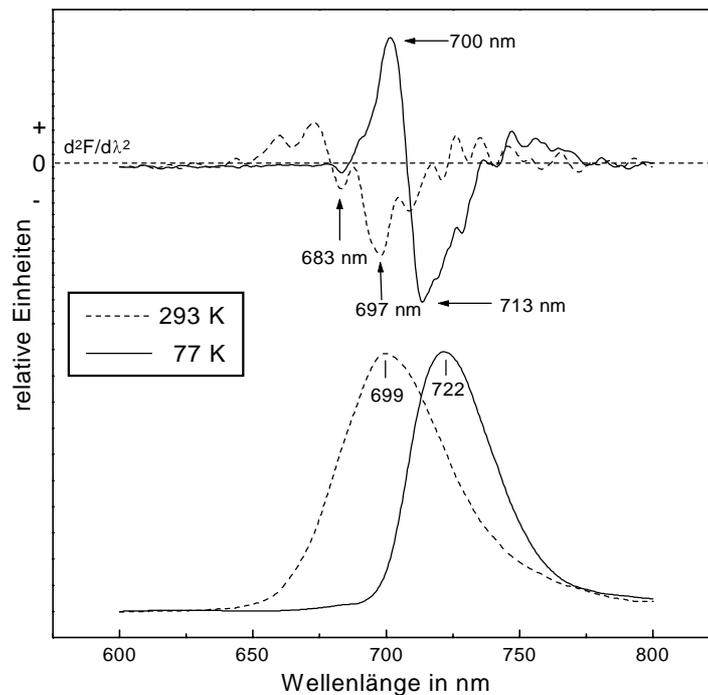
Bei Raumtemperatur können ca. 5% der bei 683 nm emittierten Fluoreszenz im Grundzustand ( $F_0$ ) auf das PS I (ROELOFS et al., 1992) zurückgeführt werden. Die Fluoreszenzemission bei 740 nm (RT) kann bis zu 30% (DAU, 1994) aus dem PS I stammen. Dagegen können bei der

maximalen Fluoreszenz (Fm) nur ca. 1% der Fluoreszenzemission bei 683 nm und 6% der langwelligeren Schulter der Fluoreszenz einer Fluoreszenzemission des PS I zugeordnet werden. Die variable Fluoreszenz wird demzufolge nur vom PS II emittiert (DAU, 1994).

Als erstes gilt festzuhalten, daß die Raumtemperaturfluoreszenzemission von *Euglena gracilis* variabel ist (TSCHERSCH, 1992). Die Algen zeigen eine Induktionskinetik, wie sie für höhere Pflanzen und Algen beschrieben worden ist (KRAUSE UND WEIS, 1984; BÜCHEL UND WILHELM, 1993).

Ein hohes Verhältnis von Fm/Fo ist inkompatibel mit der Vorstellung, daß das PS II u.a. durch das PS I stark gequenchet ist. Bei Fm/Fo = 3 ist nach Angaben von HECKS et al., 1996 das PS II kaum durch PS I gequenchet. Für *Euglena* wurde ein maximaler Wert von 2,79 für diesen Quotienten ermittelt. Somit kann davon ausgegangen werden, daß der Einfluß von PS I auf die PS II Fluoreszenz relativ gering ist.

Um die Beteiligung beider Photosysteme an der Fluoreszenzemission abzuklären und mögliche Artefakte durch das Arbeiten bei tiefen Temperaturen auszuschließen, wurden die Emissionsspektren bei Raumtemperatur gemessen.

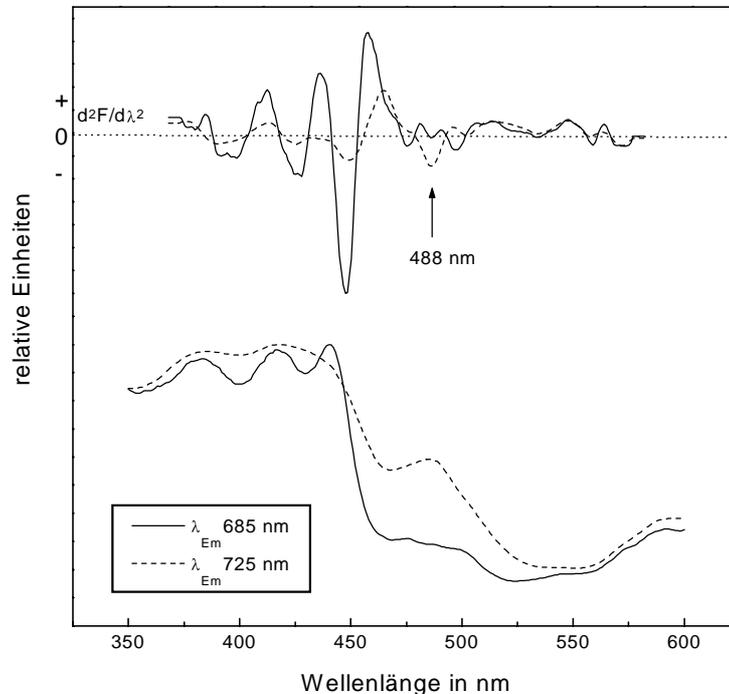


**Abb.38** Raum (293K)- und Tieftemperaturfluoreszenzemissionsspektren (77K) der Alge *Euglena gracilis* und deren 2. Ableitung; Chl-Konzentration 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ; (435 nm)

Die Abb.38 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren bei RT und 77 K sowie die zweite Ableitung dieser Kurven. Ebenso wie die Tieftemperaturfluoreszenz war auch die Raumtemperaturfluoreszenz im Vergleich zu höheren Pflanzen und Grünalgen deutlich in der Emissionswellenlänge verschoben. Das Maxima der Fluoreszenz bei Raumtemperatur lag bei 699 nm. Ebenso wie bei der 2. Ableitung des 77 K Fluoreszenzemissionsspektrums wurde auch bei der 2. Ableitung des Raumtemperaturspektrums eine Emissionsbande bei 683 nm sichtbar.

Das Absorptionsspektrum der ganzen Zelle zeigte keine Rotverschiebung und besaß ein Maximum der Absorption im roten Bereich bei 675 nm (Daten nicht gezeigt).

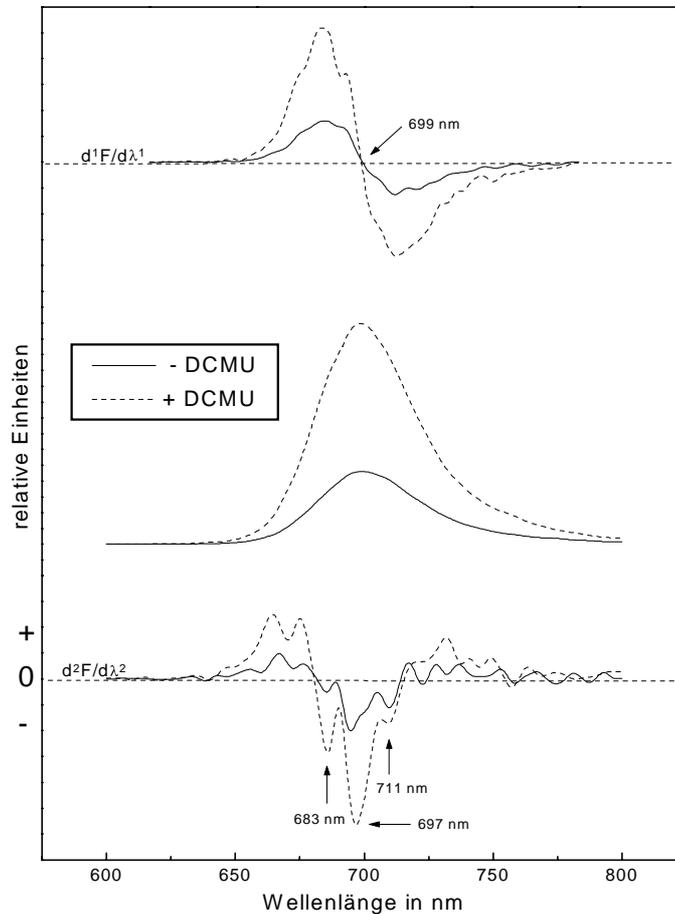
GOVINDJEE et al. (1986) sowie ŠIFFEL UND ŠESTÁK (1988) beschrieben die Auflösung von 6 Komponenten aus dem Excitationsspektrum (77 K) anhand der 2. Ableitung. Das Vorhandensein bzw. das Ausmaß einer Chlorophyll b-Bande bei 472 nm und Carotinoid-Bande bei 483 nm im Excitationsspektrum läßt Rückschlüsse über die Energieübertragung der von Chl b bzw. den Carotinoiden, welche hauptsächlich in den LHC gebunden sind, auf Chl a zu.



**Abb.39** Fluoreszenzexcitationspektren und deren 2. Ableitung von *Euglena gracilis* bei 77 K, Fluoreszenzemission bei 685 nm und 725 nm gemessen;

In der Abb.39 sind die Excitationspektren sowie deren zweite Ableitung dargestellt. Bei der Messung der Excitationspektren wurde die Fluoreszenz im Bereich des Maximum des Emissionspeaks (725 nm) und bei einer beschriebenen Emissionsbande für die kürzerwellig emittierenden Komplexe des PS II (685 nm) gemessen. Die Anregung im Absorptionsbereich der Carotinoide bzw. des Chlorophyll b führte zu einer höheren langwelligeren Fluoreszenzemission (725 nm) im Vergleich zu der Fluoreszenzemission bei 685 nm. Dieses wird sowohl im Excitationspektren als auch in deren zweiter Ableitung deutlich und weist damit auf eine höhere Beteiligung der durch Carotinoide und Chlorophyll b absorbierten Energie an der längerwelligeren Fluoreszenzemission (725 nm) hin. Da der PS II-Komplex im Vergleich zum PS I-Komplex mehr Chlorophyll b bindet (SIEFERMANN-HARMS 1985), ist bei höheren Pflanzen in der Regel die Chlorophyll b-Bande bei der Detektion der Fluoreszenzemission bei 685 nm (PS II) deutlicher.

### 3.6.2.1 Einfluß von DCMU auf das Emissionsspektrum (Raumtemperatur) der Chlorophyllfluoreszenz



**Abb.40** Einfluß von DCMU (50  $\mu\text{M}$ ) auf das Emissionsspektrum der Chlorophyll a-Fluoreszenz (435 nm) bei Raumtemperatur und die erste und zweite Ableitung der Spektren; Chl-Konzentration 2,0 $\mu\text{g/ml}$

Sollte die Verschiebung der Raumtemperaturfluoreszenz durch Überlappung von PS II und PS I-Fluoreszenz bei Raumtemperatur zustande kommen, so sollte der Anteil des PS II nach DCMU Inkubation der Probe zunehmen. Somit müßte in einer DCMU behandelte Probe eine Veränderung des Emissionsspektrums zu verzeichnen sein.

In der Abb.40 ist das Emissionsspektrum (Raumtemperatur) in Anwesenheit von DCMU im Vergleich zur unbehandelten Probe dargestellt. Desweiteren zeigt diese Abbildung die erste und zweite Ableitung der Kurven. DCMU führte zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Eine Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzemission trat nicht auf (siehe erste Ableitung). In der zweiten Ableitung der Kurve wird ersichtlich, daß die emittierenden Komponenten mit den Emissionsmaxima 683 nm, 697 nm und 711 nm durch DCMU Gabe eine verstärkte Fluoreszenzemission aufwiesen.

Dieses Ergebnis lies den Schluß zu, daß die Rotverschiebung der Raumtemperaturfluoreszenz stark durch Komponenten hervorgerufen wurde, welche funktionell mit dem PS II in Verbindung stehen müssen. Es erfolgt eine Fluoreszenzzunahme durch das Schließen der PS II-

Zentren in Gegenwart von DCMU. Somit muß der Hauptanteil der Fluoreszenzemission bei Raumtemperatur aus zum PS II gehörenden oder funktionell mit ihm gekoppelten Komplexen emittiert werden.

### 3.7 Isolierung und Charakterisierung der Pigment-Proteinkomplexe von *Euglena gracilis*

#### 3.7.1 Isolierung und immunologische Charakterisierung einzelner Pigment-Proteinkomplexe

BROWN (1980) konnte aus *Euglena gracilis* über einen Saccharose-Gradienten vier und durch Hydroxyapatit-Chromatographie drei unterschiedliche Pigment-Proteinkomplexe isolieren. Eine immunologische Untersuchung wurde nicht durchgeführt.

Wir isolierten Pigment-Proteinkomplexe aus *Euglena gracilis* mit Hilfe einer Gelelektrophorese, welche von uns so entwickelt und modifiziert wurde (vgl. 2.2.14), daß nur minimale Mengen an freiem Pigment auftraten. Eine Trennung der Pigment-Proteinkomplexe nach der von PETER UND THORNBER, 1991 sowie DREYFUSS UND THORNBER, 1994 beschriebenen Deriphath-PAGE führte zwar auch bei *Euglena gracilis* zu den dort beschriebenen Banden, jedoch war der Anteil der durch diese Methode frei werdenden Pigmente zu hoch.

Nach Isolierung der photosynthetischen Komplexe anhand der unter 2.2.14 beschriebenen Methode erhielten wir neben geringen Mengen von freiem Pigment in der Regel 6 grüne Banden. Es erfolgte eine Charakterisierung der Proteine sowie des Absorption- und Fluoreszenzemissionsverhalten der einzelnen Banden. Die immunologischen Untersuchungen sollten neben der spektralen Charakterisierung der Pigment-Proteinkomplexe eine Zuordnung der entsprechenden Proteine zu den photosynthetischen Komplexen ergeben.



**Abb.41** Trennung der Thylakoide von *Euglena gracilis* in Pigment-Proteinkomplexe mittels Gelelektrophorese (Gel: 6% Polyacrylamid); pro Bahn 10 µg Chl

Die ausführliche Beschreibung der entsprechenden Komplexe war erforderlich, da es sich um eine bisher nicht beschriebene Trennung der Pigment-Proteinkomplexe von *Euglena gracilis* handelt. Die bisher genutzten elektrophoretischen Methoden zur Trennung dieser Komplexe bei

*Euglena gracilis* (BRANDT, 1980; CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986a,b; SPANO et al., 1987) wiesen hohe Mengen an freiem Pigment auf. Dieses führte zur Annahme, daß die Pigment-Proteinkomplexe bei *Euglena* im Vergleich zur höheren Pflanze äußerst labil sind.

In der Abb.41 ist das Ergebnis der Fraktionierung der Pigment-Proteinkomplexe mittels Elektrophorese wie auch die SDS-PAGE Elektrophorese der einzelnen grünen Komplexe dargestellt. Diese wurden im Anschluß an die SDS-PAGE Elektrophorese mit unterschiedlichen Antikörpern (Beschreibung der Antikörper: Kap. Tab.3) gegen Proteine des PS I, PS II, LHC II und LHC I behandelt. Zusammenfassend sind in der Tab.16 die Immunreaktionen der einzelnen Banden mit den verschiedenen Antikörpern dargestellt.

**Tab.16** Immunreaktion verschiedener Antikörper mit Proteinen der isolierten Pigment-Proteinkomplexe von *Euglena gracilis*; +, ++, +++ kennzeichnen die Stärke der Immunreaktion; freie Spalten zeigen das Fehlen einer Immunreaktion mit den entsprechenden Antikörpern

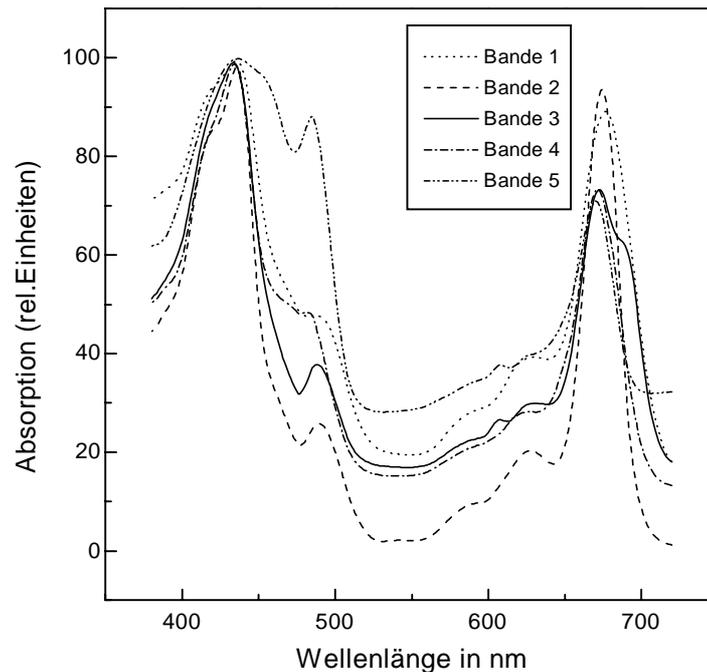
	LHC I	D1	CP47	LHC II
<b>Bande 1</b>	+++			
<b>Bande 1a</b>	++			
<b>Bande 2</b>		+++	+++	
<b>Bande 3</b>	++			++
<b>Bande 4</b>				+++
<b>Bande 5</b>				+++

Anhand der Immunreaktion war ersichtlich, daß durch die elektrophoretische Behandlung eine Trennung der beiden Photosysteme erreicht wurde. Dieses war um so erfreulicher, da eine Präparation von PS I- und PS II-Partikeln nach der für *Chlamydomonas* beschriebenen Methode (BASSI UND WOLLMANN, 1991; MULLET et al., 1980) nicht möglich war. *Euglena gracilis* weist im Gegensatz zu höheren Pflanzen keine Segregation (Stacking) in Grana- und Stromathylakoide auf, in limitierten Regionen des Thylakoidsystems können jedoch 2-4 Thylakoidmembranen gestapelt sein (SALVADORE et al. 1971; WINTER UND BRANDT, 1986).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die elektrophoretische Trennung eine sehr gute Fraktionierung der unterschiedlichen Pigment-Proteinkomplexe erzielt wurde, wobei die Bande 1 Proteine des PS I (66 kDa: RC I; 20-30 kDa: LHC I); die Bande 2 die des PS II-core-Komplexes (43-52 kDa: CP43, CP47; 32 kDa: D1) Bande 3 Proteine des LHC II und LHC I (ca. 26 kDa: LHC II; 19-20 kDa: LHC I) und die Banden 4 (25-26 kDa: LHC II) und 5 Lichtsammelproteine des PS II (25-26 kDa, ca. 28-29 kDa: CP 26 und CP 29) enthielt. Bei den Banden 1 und 1a handelt es sich möglicherweise um unterschiedliche Aggregate des PS I.

### 3.7.2 Absorptionsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe

Die Abb.42 enthält die Absorptionsspektren der isolierten Banden des nativen Gels. Die Banden wurden aus dem Gel geschnitten und die Absorptionsspektren der einzelnen Komplexe wurden im Gel vermessen. Als Referenz diente ein Gelstück.



**Abb.42** Absorptionsspektren (RT) der isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen von *Euglena gracilis*; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

Die Bande 1 wies mit 677 nm das langwelligste Maximum im Rotbereich des Absorptionsspektrums im Vergleich zu den Banden 2,4,5 auf und besitzt somit die absorptiven Eigenschaften von PS I-Komplexen (BROWN, 1980; MURATA UND SATOH, 1986). Diese werden durch das Vorhandensein langwellig absorbierender und emittierender Chl a-Komponenten bestimmt.

Bande 2 entspricht den Absorptionseigenschaften des RC II mit einem Maximum im Rotbereich des Spektrums bei 674 nm, der Chlorophyll a-Bande bei 435 nm (BASSI UND WOLLMANN, 1991; KONERMANN UND HOLZWARTH, 1996; ) und einer Bande bei 491 nm, welche vermutlich der Absorption des  $\beta$ -Carotin zuzuordnen ist (SIEFERMANN-HARMS, 1985).

Auffallend war bei der Bande 3 eine Schulter bei 690 nm im Rotbereich des Spektrums. Dieses macht wahrscheinlich, daß auch an diesem Komplex die für das PS I typischen langwelligeren Chl a-Moleküle gebunden sind. Diese Absorptionsbande (690 nm) ist für Spinachchloroplasten und unterschiedliche Algen beschrieben (KRAMER et al., 1985) und wird dem PS I zugeordnet (MURATA UND SATOH, 1986; BROWN 1980). Im Vergleich zu den anderen Banden (ausgenommen der Bande 2, dem RC II) scheint in dieser Bande die Energieabsorption durch Chl b und durch Carotinoide niedriger.

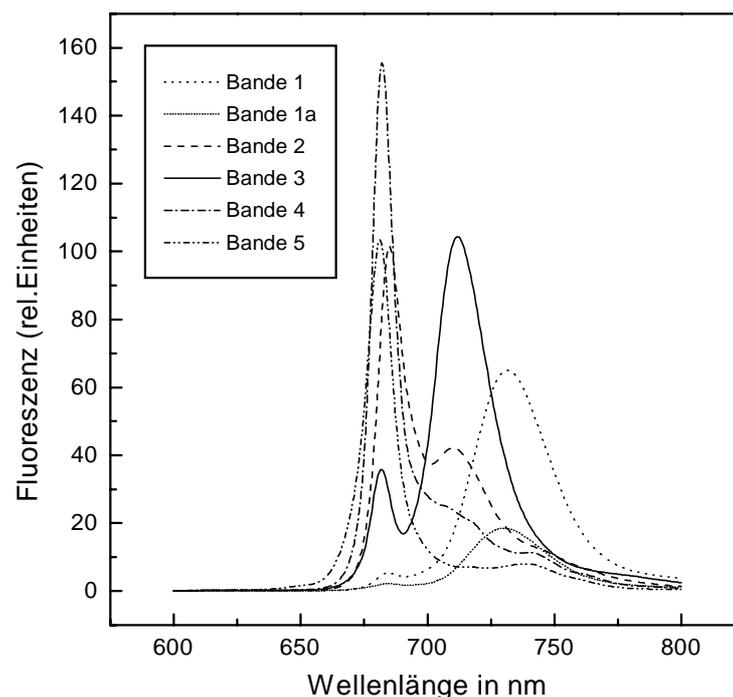
Die Bande 4 besaß ein Absorptionsmaximum im Rotbereich bei 671 nm. Weiterhin zeigte diese Bande eine starke Carotinoidschulter mit einem Maxima bei 480 nm-485 nm. Die Absorptionsmaxima entsprachen denen vom LHC II beschriebenen (PINEAU et al., 1985).

Bei der Bande 5 schien das Chl a/Carotinoid-Verhältnis im Vergleich zu dem der Bande 4 stark zu Gunsten der Carotinoide verschoben. Ersichtlich wurde diese aus der Zunahme der Absorptionsbande mit einem Maximum bei 485 nm. Das Verhältnis der Chl a Absorption (436 nm) zur Carotinoidabsorption (485 nm) war für die Bande 5 geringer (1,139) im Vergleich zur Bande 4 (1,890). Vergleicht man die Absorption bei 672 nm (Chl a) mit der bei 653 nm (Chl b), so ergab sich für diese Bande das kleinste Verhältnis (Daten nicht gezeigt), somit muß der Anteil von

Chlorophyll b in dieser Bande am höchsten sein. Im Vergleich der Banden 4 und 5 zum RC II (Bande 2) ist die Absorptionsbande der Carotinoide mit einem Maximum bei 485 nm bei diesen Banden deutlich erhöht. Dieses ist eine generelle Eigenschaft der Lichtsammelkomplexe (SIEFERMANN-HARMS, 1985).

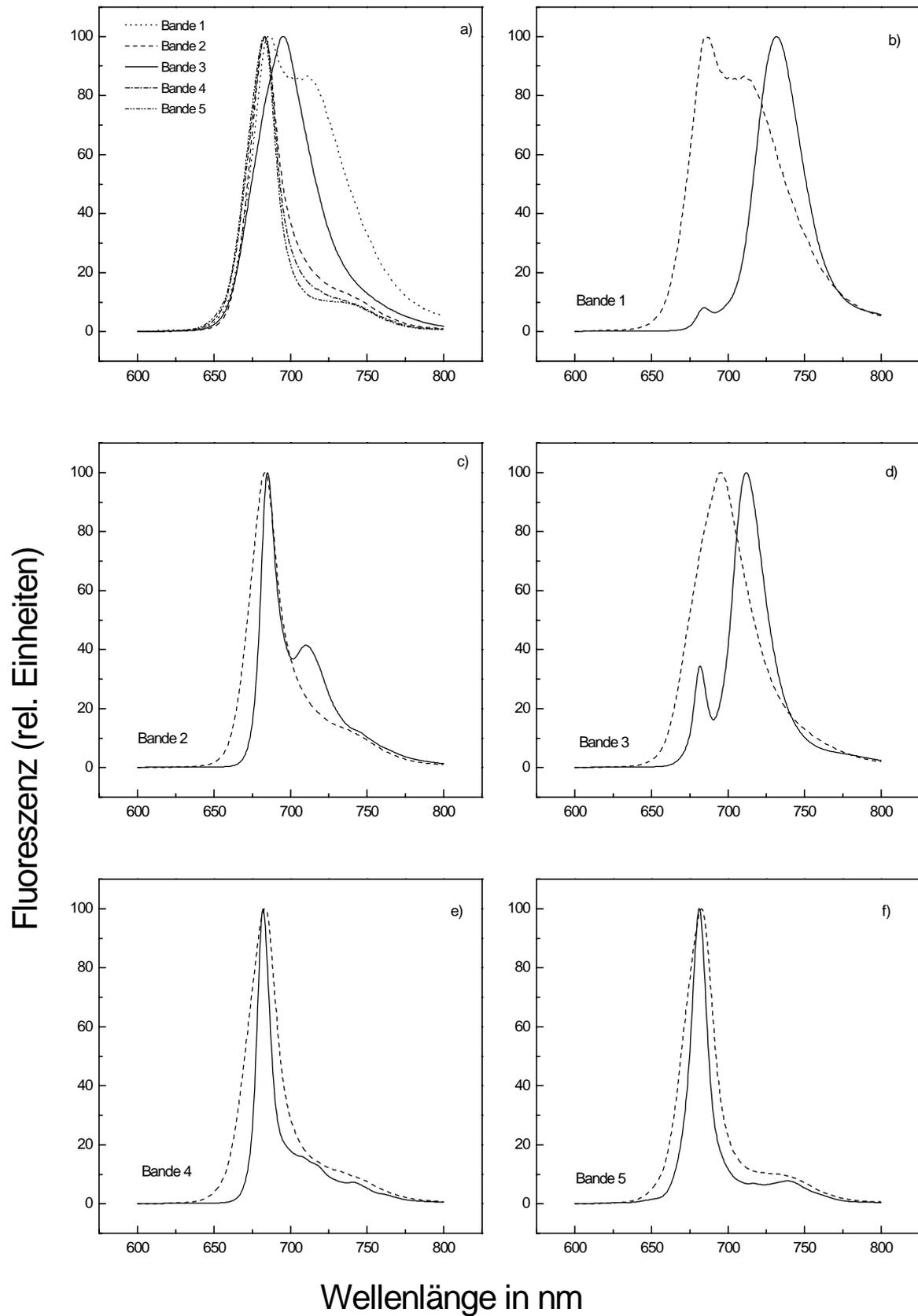
### 3.7.3 Emissions- und Excitationsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe bei RT und 77 K

Die Untersuchung der einzelnen grünen Banden sollte abklären, ob es bei dieser Alge Unterschiede hinsichtlich der spektralen Eigenschaften der einzelnen Pigment-Proteinkomplexe im Vergleich zur höheren Pflanze gibt, welche zur Verschiebung der Gesamtfluoreszenzemission führen oder die Verschiebung der Fluoreszenzemission durch funktionelle Zusammenhänge von Pigment-Proteinkomplexen hervorgerufen wird. In der Abb.43 sind die Fluoreszenzemissionsspektren bei 77 K für die einzelnen Pigment-Proteinkomplexe dargestellt. Die in dieser Abbildung enthaltenen Spektren sind nicht auf das maximale Signal normalisiert und entsprechen somit der Fluoreszenzausbeute gleich großer Gelstückchen der einzelnen Banden. Die Maxima der einzelnen Banden sind in der Tab.17 zusammengefasst.



**Abb.43** Fluoreszenzemissionsspektren (77 K; 435 nm) der isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen von *Euglena gracilis*; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

Um diese Banden weiter zu charakterisieren, enthält die Abb.44 den Vergleich der Emissionsspektren bei RT und 77 K. Das Maxima der Fluoreszenzemission der intakten Zelle wurde durch Kühlung auf 77 K um 22 nm in den längerwelligen Bereich verschoben (vgl. Abbildungen 37 und 38).



**Abb.44** Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren (435 nm) der isolierten Pigment-Protein-komplexe von *Euglena gracilis* bei RT und 77 K; a) Emissionsspektren (RT) der isolierten Banden; b)-f) Vergleich der Fluoreszenzemission der einzelnen Banden bei RT (- - -) und 77 K (—); Spektren wurden auf das maximale Signal normalisiert

Die Raum- und Tieftemperaturspektren wurden in diesem Fall wieder auf das maximale Signal normalisiert. Im Vergleich der Raum (RT)- und Tieftemperaturspektren (77 K) wird deutlich, daß die langwellige Emission der Bande 1 (735 nm) bei Raumtemperatur nicht vorhanden war. Die Fluoreszenzausbeute der Bande 1 war bei RT im Gegensatz zur Messung bei tiefen Temperaturen wesentlich geringer (Daten nicht gezeigt).

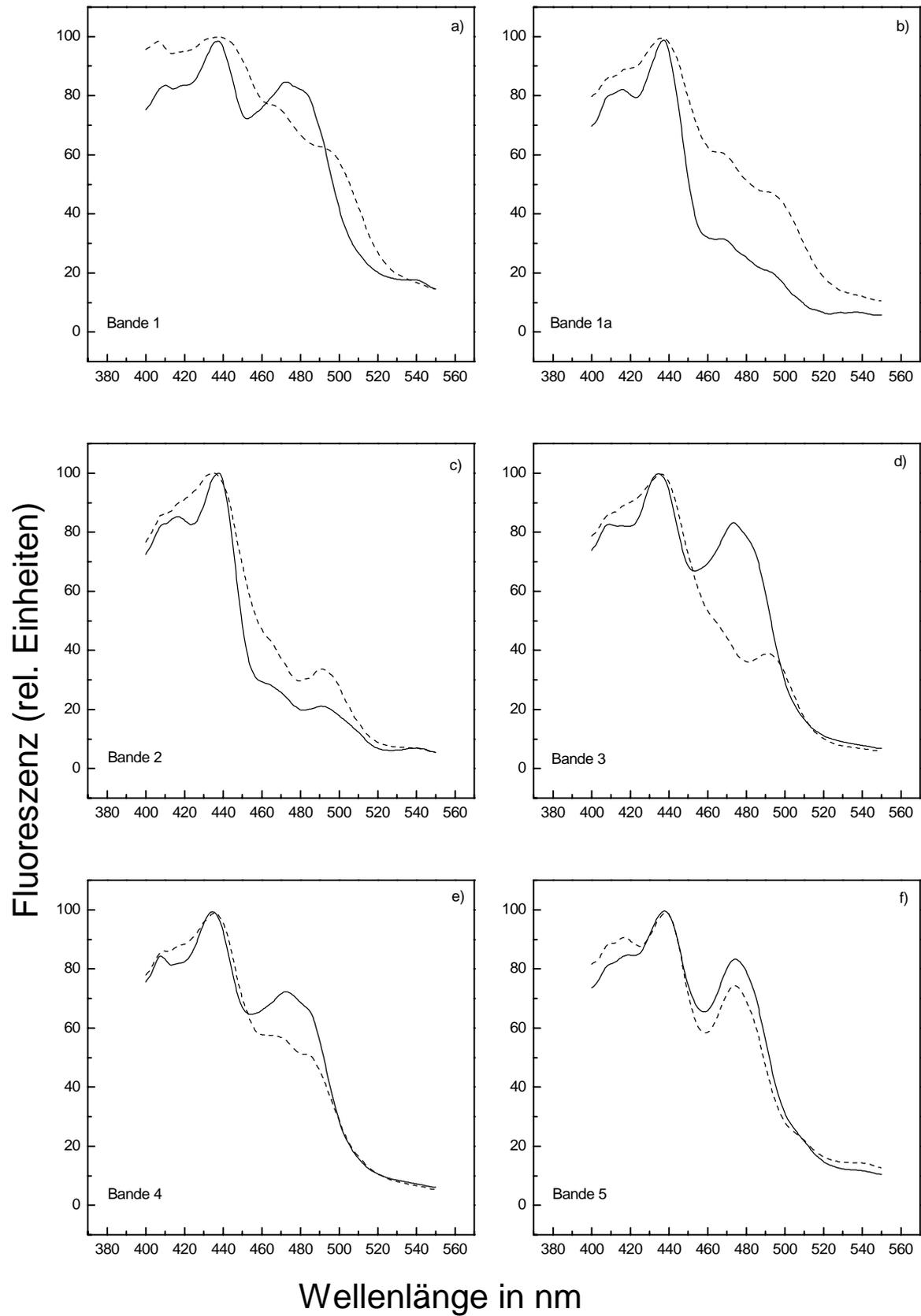
Bei beiden Temperaturen zeigte sich eine Emissionsbande bei 685 nm, welche bei der Messung der Fluoreszenzemissionen bei Raumtemperatur die dominierende Bande war. Die Bande 1a wurde nicht dargestellt, da die Fluoreszenzemissionsspektren der Bande 1 und Bande 1a die gleichen Maxima aufwiesen.

Mit einem Emissionsmaximum bei 685 nm (77 K) besaß die Bande 2 (Abb.44c) eine für das RC II typische Fluoreszenzemission (SIEFERMANN-HARMS, 1988; GOVINDJEE, 1995). Die langwellige Emissionsbande bei 711 nm (77K) nahm in der Intensität bei der Anregung mit 475 nm im Emissionsspektrum zu (nicht gezeigt). Das Excitationsspektrum (725 nm) dieser Emissionsbande ist mit dem der Bande 3 vergleichbar. Daraus schlußfolgernd wird angenommen, daß diese langwellige Emission auf geringen Gehalt von Pigment-Proteinkomplexe (LHC), wie sie in der Bande 3 vorliegen, zurückzuführen ist.

Besonders auffallend war, daß die Bande 3 eine ähnliche Verschiebung des Maximum in Abhängigkeit von der Meßtemperatur aufwies wie die Emissionsspektren der intakten Zelle (Abb.38). Das Maximum der Fluoreszenzemission der intakten Zelle bei Raumtemperatur wurde bei 699 nm gemessen, das der Bande 3 bei 695 nm. Eine Kühlung der Probe auf 77 K ergab eine Verschiebung des Maximums in den längerwelligen Bereich (711 nm) für die Bande 3 und bei der intakten Zelle auf 722 nm. Im Gegensatz zu den anderen Banden erschien dieser Komplex auf dem Gel als sehr schwache Bande, wies jedoch eine starke Fluoreszenzemission bei RT und 77 K im Vergleich zu den anderen Komplexen auf (Abb.43). Die Bande 3 stellt sich als ein Komplex dar, welcher sowohl Lichtsammelkomplexe des PS I als auch des PS II enthält. Die Fluoreszenzeigenschaften weichen deutlich von bisher beschriebenen Pigment-Proteinkomplexen ab. Weiterhin scheint bemerkenswert, daß die Bande 3 dem Emissionsmaximum der durch Belichtung der intakten Zelle abnehmenden Komponente (713 nm) im Fluoreszenzemissionsspektrum entsprach (vgl. Abb.37). Somit scheint es möglich, daß diese Bande 3 in photoprotektive Mechanismen involviert ist.

Ein für den LHC II typisches Fluoreszenzemissionsspektrum (HEMELRIJK et al., 1992) wurde bei der Messung der Bande 4 aufgenommen. Neben der Emissionsbande bei 682 nm (77 K) ist gegenüber der Bande 5 eine Fluoreszenzemissionsschulter im Bereich von 700 nm-725 nm zu beobachten. Eine Schulter im Fluoreszenzspektrum des LHC II um die 700 nm wird auf LHC II-Aggregate zurückgeführt (RUBAN UND HORTON, 1992). Möglicherweise ist sie bei *Euglena* jedoch auf Anteile aus der Bande 3 zurückzuführen.

Die Abb.45 enthält die Excitationsspektren (77 K) der einzelnen Banden. Die Fluoreszenzemission wurde bei der Aufnahme dieser Spektren wie bei der ganzen Zelle bei 685 nm und 725 nm gemessen. Chlorophyll b ist in den Lichtsammelkomplexen der Photosysteme gebunden (SIEFERMANN-HARMS, 1985; CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986a; WILHELM 1990; GREEN UND DRUNFORD, 1996;) und absorbiert stark im Bereich von 470 nm-475 nm.



**Abb.45** Fluoreszenzexcitationsspektren (77K) der Pigment-Proteinkomplexe von *Euglena gracilis*; gemessen bei 685 nm (—) und 725 nm (- - -) der Fluoreszenzemission; Spektren wurden auf das maximale Signal normalisiert

Das Auftreten einer Bande bei 470- 475 nm im Excitationsspektrum läßt daher Aussagen über das Vorhandensein von Chlorophyll b in den Pigment-Proteinkomplexen zu. Handelt es sich um die Reaktionszentren so fehlt diese Bande nahezu vollständig.

Eine starke Verminderung der Fluoreszenzemission (685 nm) im Bereich von 470 nm-500 nm ist im Vergleich der Bande 1 zur Bande 1a zu beobachten (Abb.45 a,b), woraus geschlußfolgert werden kann, daß in der Bande 1a im Gegensatz zur Bande 1 der Gehalt von LHC-Proteinen, welche eine Fluoreszenzemission bei 685 nm besitzen, reduziert war.

Auch die Fluoreszenzemission bei 725 nm war im Bereich der Carotinoide und des Chlorophyll b in der Bande 1a reduziert war. Der Effekt war jedoch geringer als im Excitationsspektrum mit der Fluoreszenzdetektion bei 685 nm. In Zusammenfassung aller spektralen Daten dieser Banden kann festgestellt werden, daß die Bande 1 das RC I + LHC I und die Bande 1a hauptsächlich das RC I enthielt, aber auch noch Proteine vom LHC I. Bei diesen Banden könnte es sich um unterschiedliche große Aggregate des LHC I und des Reaktionszentrum des PS I handeln.

**Tab.17** Zusammenfassende Charakterisierung der einzelnen grünen Banden; Zuweisung der Pigment-Proteinkomplexe anhand der dargestellten Daten; die unterstrichenen Wellenlängen entsprechen den Hauptmaxima; Excitationsmaxima in Klammern entsprechen sehr geringen Banden bzw. Schultern im Absorptionsspektrum

Banden	Emissionsmaxima		Excitationsmaxima		Absorptionsmaxima	positive Antikörperkt. und (Protein-größen in kDa)	Zuordnung Pigment-Proteinkomplex
	RT	77K	685 nm	725 nm			
<b>1</b>	<u>685</u>	685	438	439	436	LHC I; (66; 18,5-23)	PS I + LHC I <b>PS I</b>
	711	<u>731</u>	472	464	490		
			483	494	677		
<b>1a</b>	<u>685</u>	685	438	438	436	LHC I (66, 18,5-23)	PS I + LHC I <b>PS I</b>
	711	<u>731</u>	(470)	464	490		
			(494)	494	677		
<b>2</b>	683	<u>685</u>	439	436	436	D1 CP47 (30-32;43-52)	PS II-core CP43, CP47 <b>CC II</b>
		711	494	491	674		
<b>3</b>	695	683	436	436	434	LHC I LHC II (20; 24-26)	Komplex aus <b>LHC I + LHCII</b>
		<u>711</u>	472	491	489		
					672 (690)		
<b>4</b>	683	682	434	434	434	LHC II (24-26)	oligomerer <b>LHC II</b>
			472	(470)	482		
			(483)	(483)	671		
<b>5</b>	683	681	438	438	436	LHC II (24-26; 29)	monomerer <b>LHC II</b>
			473	473	485 670		

Die Bande 2 besaß die spektralen Eigenschaften des PS II-core-Komplexes (SIEFERMANN-HARMS; 1988). Eine Emission von 695 nm bei 77 K trat nicht auf. Die Chl b-Bande fehlte im Excitationsspektrum (685 nm).

Ein typisches Emissions- und Excitationsspektrum von Lichtsammelkomplexen wurde für die Banden 4 und 5 gemessen. Eine deutliche Chlorophyll b-Bande konnte im Excitationsspektrum dieser Banden (Abb.45e bzw. f) beobachtet werden. Im Gegensatz zur Bande 5 enthielt die Bande 4 eine Schulter bei 483 nm im Excitationsspektrum. Diese Unterschiede weisen auf eine verschiedene Ausstattung der lichtsammelnden Proteine mit Carotinoiden hin. Die Bande 3 besaß im Excitationsspektrum (685 nm) eine deutliche Chlorophyll b und Carotinoide Schulter. Im Bereich der Absorption des Chlorophyll b und der Carotinoide, welche bei 470-483 nm eine starke Absorption besitzen, war die Fluoreszenzemission gemessen bei 725 nm gegenüber der bei 685 nm gemessenen Emission, stark reduziert.

In der Tab.17 sind die Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung der Pigment-Proteinkomplexe zusammengefaßt. Neben den Emissionsmaxima bei 77 K und RT sind auch die Maxima der Excitations- (77 K) und Absorptionsspektren (RT) sowie die Immunreaktion der einzelnen Banden enthalten. Weiterhin wurden die anhand von Proteinmarkern ermittelten Größen der Proteine, welche eine Antikörperreaktion zeigten, angegeben. Anhand der Daten erfolgte eine Zuordnung der Banden zu den einzelnen photosynthetischen Komplexen.

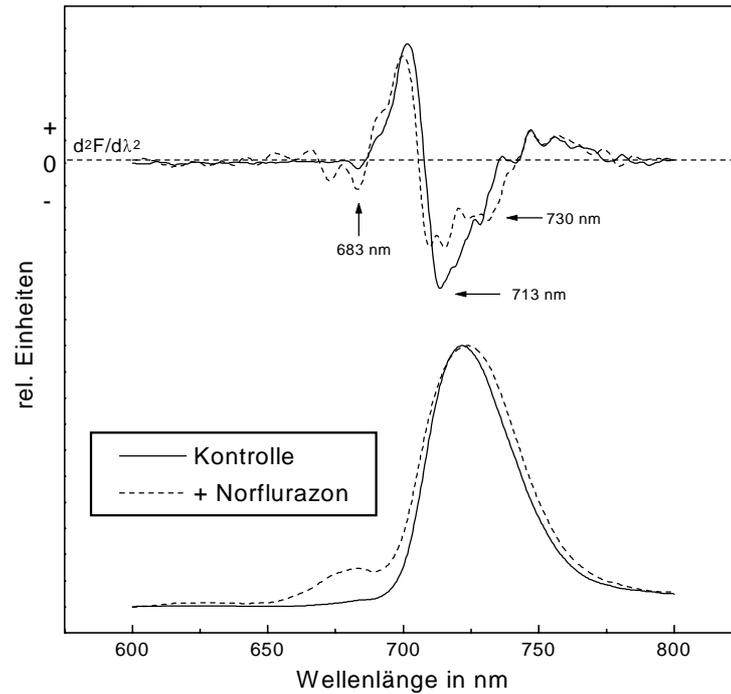
### **3.8 Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die Fluoreszenzemission und auf strukturelle Komponenten der photosynthetischen Membranen**

In vorangegangenen Kapiteln konnte ein abweichendes Verhalten hinsichtlich des Fluoreszenzquench carotinoidverarmter Zellen und der Verlust von protektiven Mechanismen durch Carotinoidverarmung gezeigt werden. In diesem Kapitel soll der Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren sowie auf strukturelle Komponenten der Photosynthesemembran untersucht werden, um weitere Aussagen zur Lokalisation und Beteiligung einzelner Pigment-Proteinkomplexe an photoprotektiven Mechanismen zu gewinnen.

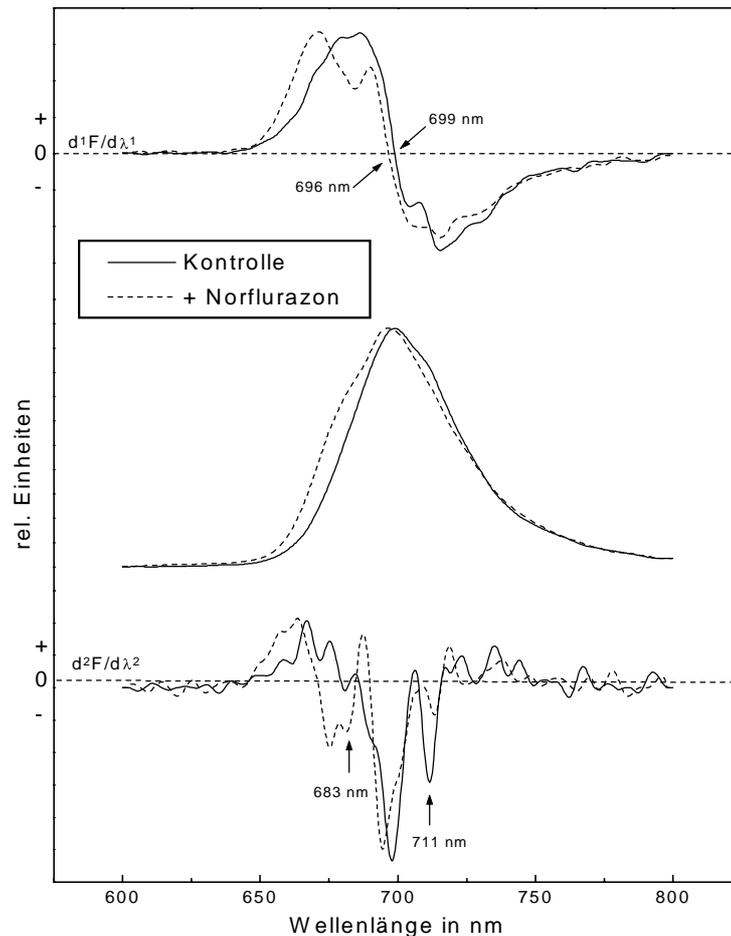
#### **3.8.1 Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren carotinoidverarmter Zellen von *Euglena gracilis***

In den Abbildungen 46 und 47 sind die Fluoreszenzemissionsspektren bei 77 K bzw. RT von carotinoidverarmten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit vollständiger Pigmentausrüstung dargestellt. Durch die Carotinoidverarmung kommt es bei 77K zum Auftreten einer Schulter im Bereich von 681 nm-686 nm, welches der beschriebenen Emission des PS II von höheren Pflanzen und Grünalgen entspricht (KRAUSE UND WEIS, 1991; SIEFERMANN-HARMS, 1985, 1988; MURATA UND SATOH, 1986; KRAMER et al.; 1985).

Weiterhin verbreiterte sich die langwellige Fluoreszenzemission (77 K) sowohl in den kürzerwelligen als auch in den längerwelligen Bereich. Bei den carotinoidverarmten Zellen war die Fluoreszenzemission im Bereich 713 nm reduziert (siehe zweite Ableitung). Außerdem konnte eine Zunahme der Fluoreszenzemission im kürzerwelligen Bereich (683 nm) festgestellt werden.



**Abb.46** Einfluß der Carotinoidverarmung auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (435 nm; 77 K) und deren zweite Ableitung; Kontrolle: unbehandelter Zellen; + Norflurazon: carotinoidverarmte Zellen; Chl-Konzentration 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ; Zellen wurden auf das maximale Signal normalisiert

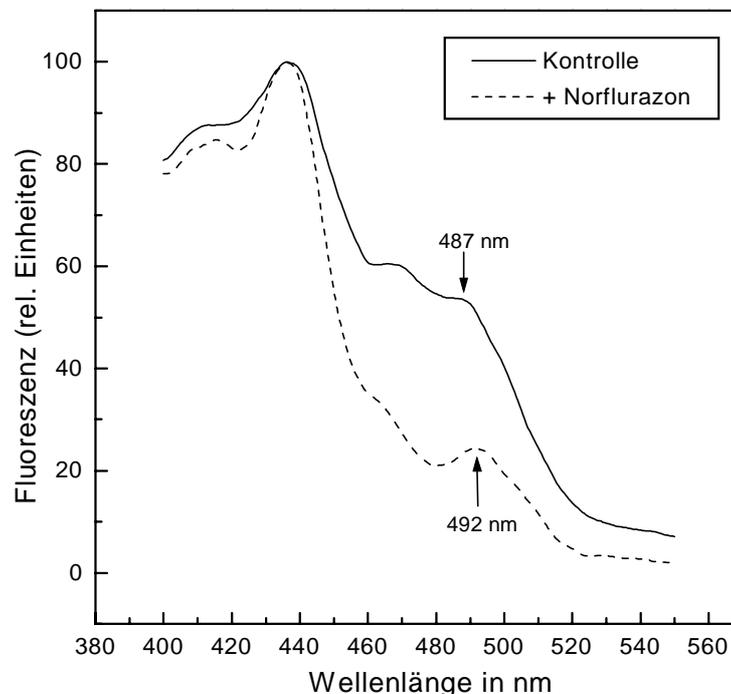


**Abb.47** Einfluß der Carotinoidverarmung auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (RT; 435 nm) und deren erste und zweite Ableitung; Kontrolle: unbehandelter Zellen; + Norflurazon: carotinoidverarmte Zellen; Chl-Konzentration 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ; Zellen auf maximale Signal normalisiert

Es hat den Anschein, als ob durch die Carotinoidverarmung die Fluoreszenzemissionen der beiden Photosysteme von *Euglena gracilis* getrennt voneinander gemessen werden können.

Auch bei Raumtemperatur (Abb.47) zeigte sich eine Verschiebung des gesamten Spektrums in den kürzerwelligen Bereich. Anhand der ersten Ableitung ist ersichtlich, daß durch die Carotinoidverarmung das Maximum um 3 nm in den kürzerwelligen Bereich verschoben war. Die zweite Ableitung macht deutlich, daß Zellen mit geringerem Gehalt an Carotinoiden eine deutliche Reduzierung der 711 nm Emissionsbande aufwiesen. Hingegen zeigte sich die Emission bei 683 nm im Vergleich zur unbehandelten Zelle erhöht. Dieses ist in guter Übereinstimmung mit den beschriebenen Emissionsspektren bei 77 K (Abb.46).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Reduzierung des Carotinoidgehaltes die Fluoreszenzemission qualitativ beeinflußt. Es kommt zum Auftreten zweier voneinander getrennter Emissionsbanden bei 77 K und zur Verschiebung des Maximum in kürzerwellige Bereiche bei der Raumtemperaturfluoreszenzemission. Anhand der Ableitungen der Kurven können quantitative Veränderungen der Fluoreszenzemission einzelner Komponenten für diese Verschiebung verantwortlich gemacht werden.



**Abb.48** Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Excitationsspektren (77 K); Kontrolle: unbehandelter Zellen; + Norflurazon: carotinoidverarmte Zellen; Chlorophyllgehalt 2,0 µg/ml; Detektion der Fluoreszenzemission bei 725 nm; Zellen wurden auf das maximale Signal normalisiert

Der Vergleich der Excitationsspektren (Abb.48) ergab, daß bei den carotinoidverarmten Zellen die Energieübertragung der Carotinoide und des Chlorophyll b auf Chlorophyll a reduziert war. Betrachtet man den reduzierten Pigmentgehalt dieser Zellen (Tab.6), war das zu erwarten. Die Reduzierung des Hauptpigments Diadinoxanthin führte zur Verschiebung des Maximums der Carotinoide von 487 nm auf 492 nm. Durch die Inhibierung der Carotinoidbiosynthese mit Norflurazon wurde der Gehalt an Diadinoxanthin nicht negativ beeinflusst, ebenso besaßen diese Zellen noch 67% des  $\beta$ -Carotin im Vergleich zur Kontrolle. Die Schulter bei 492 nm ent-

spricht der Energieübertragung durch  $\beta$ -Carotin oder Diatoxanthin, welche in *Euglena* im Vergleich zu den anderen Carotinoiden die langwelligsten Absorptionseigenschaften besitzen.

### 3.8.2 Isolierung der Pigment-Proteinkomplexe bei carotinoidverarmten Zellen - Vergleich der Apoproteine unbehandelter und carotinoidverarmter Zellen

Um zuordnen zu können, welche Modifikation der Pigment-Proteinkomplexe für die Veränderung der Fluoreszenzemission bei carotinoidverarmten Zellen verantwortlich war, wurden diese mit Hilfe der beschriebenen Gelelektrophorese isoliert.

In der Abb.49 ist eine Auftrennung carotinoidverarmter Zellen in die einzelnen Pigment-Proteinkomplexe im Vergleich zur unbehandelten Zelle dargestellt.

Neben der Bande 1 und 1a trat bei den carotinoidverarmten Zellen eine zusätzliche Bande 1b auf. Es handelt sich hier um unterschiedlich modifizierte PS I + LHC I-Komplexe. Die Carotinoidverarmung führte zur Verringerung des LHC I. Durch die Reduzierung des LHC I kam es bei den carotinoidverarmten Zellen offenbar zu einer weiteren Auftrennung der PS I-Aggregate. Weiterhin zeigte sich eine deutliche Anreicherung eines der kleineren Proteine im Bereich von ca. 14 kDa, welches zusammen mit dem RC I (66 kDa Protein) das Proteinmuster der Bande 1b bestimmte (Abb.50). Dieses Protein reagierte mit keinem der beschriebenen Antikörpern (SDS-PAGE nicht gezeigt).

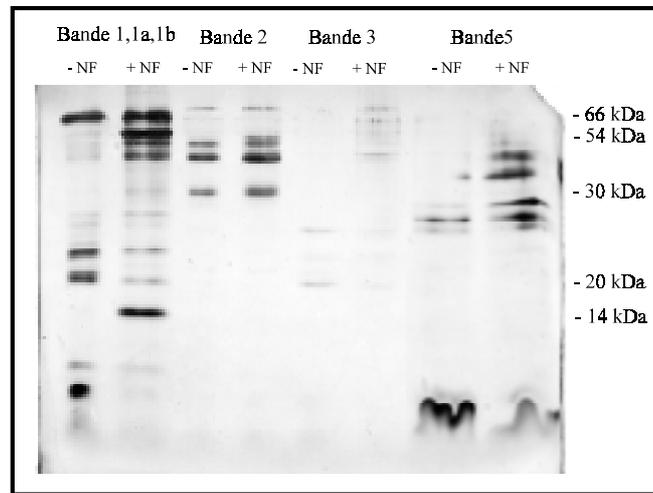


**Abb.49** Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen von *Euglena gracilis*, Auftragung der Proben anhand gleicher Chlorophyllkonzentrationen: 10  $\mu$ g pro Bahn;

Der wesentlichste Unterschied zwischen den verschiedenen Zellen war jedoch das Fehlen der Bande 4 und die Reduzierung der Bande 3 in der grünen Elektrophorese. Bande 4 konnte, wie beschrieben, als Lichtsammelkomplex des PS II identifiziert werden. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um die oligomeren, Antennen des PS II. Die Carotinoidverarmung führte zum fast vollständigen Verlust derselben.

Die Banden 2 der carotinoidverarmten Zellen waren hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung mit den entsprechenden Banden der unbehandelten Zellen vergleichbar. Bande 3 war durch die Carotinoidverarmung verringert.

Anhand der SDS-PAGE (Abb.50) der Pigment-Proteinkomplexe lies sich vermuten, daß die durch die Carotinoidverarmung ausgelösten Veränderungen auf die Lichtsammelkomplexe beschränkt bleibt.



**Abb.50** Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Apo-Proteine der isolierten Pigment-Proteinkomplexe aus unbehandelten (-NF) und carotinoidverarmten (+NF) Zellen

### 3.8.3 Fluoreszenzemissions- und Fluoreszenzexcitationsspektren der Pigment-Proteinkomplexe carotinoidverarmter Zellen

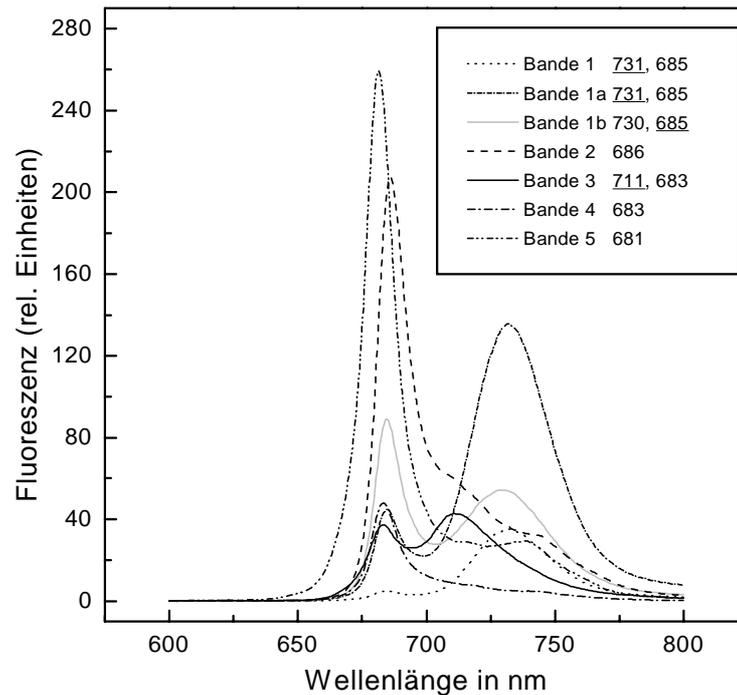
In der Abb.51 sind die Emissionsspektren der Chlorophyll a-Fluoreszenz der isolierten Pigment-Proteinkomplexe carotinoidverarmter Thylakoide dargestellt. In der Legende sind die Maxima der Emission der jeweiligen Bande angegeben.

Bande 1, 1a, 1b besaßen gleiche spektrale Eigenschaften. Es kam lediglich zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen den beiden beschriebenen Maxima. Die Emission bei 685 nm war in der Bande 1b im Gegensatz zur Bande 1 und 1a dominant. Anhand der spektralen Daten und des Vorhandenseins des 66 kDa-Proteins konnten diese Banden dem PS I zugeordnet werden.

Bande 2 besaß ebenso wie die der unbehandelten Zellen die typische RC II Fluoreszenzemission (vgl. Abb.43). Im Gegensatz zur unbehandelten Zelle war die Emission der Chlorophyllfluoreszenz bei 711 nm hier nur als schwache Schulter erkennbar, was möglicherweise auf eine Abnahme einer bei 711 nm fluoreszierenden Komponente im Vergleich zur unbehandelten Zelle hinweist.

Die Bande 3 war im Vergleich zu den unbehandelten Zellen drastisch in ihrer Intensität reduziert. Diese Tatsache stimmt mit der Abnahme der Emissionsbande bei 713 nm in der zweiten Ableitung (Abb.44) gut überein. Eine Verschiebung der Maxima der Bande 3 trat nicht auf.

Anhand der Emissionseigenschaften dieser beiden Banden, vergleichend mit den Banden der unbehandelten Zellen, kann festgestellt werden, daß die Inhibierung der Carotinoide zur Reduktion eines Pigment-Proteinkomplexes führte, welcher ein Fluoreszenzemissionsmaximum im Bereich von 711 nm-713 nm aufwies. Dieses wurde auch schon im Vergleich der zweiten Ableitung der Fluoreszenzemissionsspektren der intakten Zellen deutlich (vgl. Abb.46).



**Abb.51** Fluoreszenzmissionsspektren (77 K; 435 nm) der isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen carotinoidverarmter Zellen von *Euglena gracilis*; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

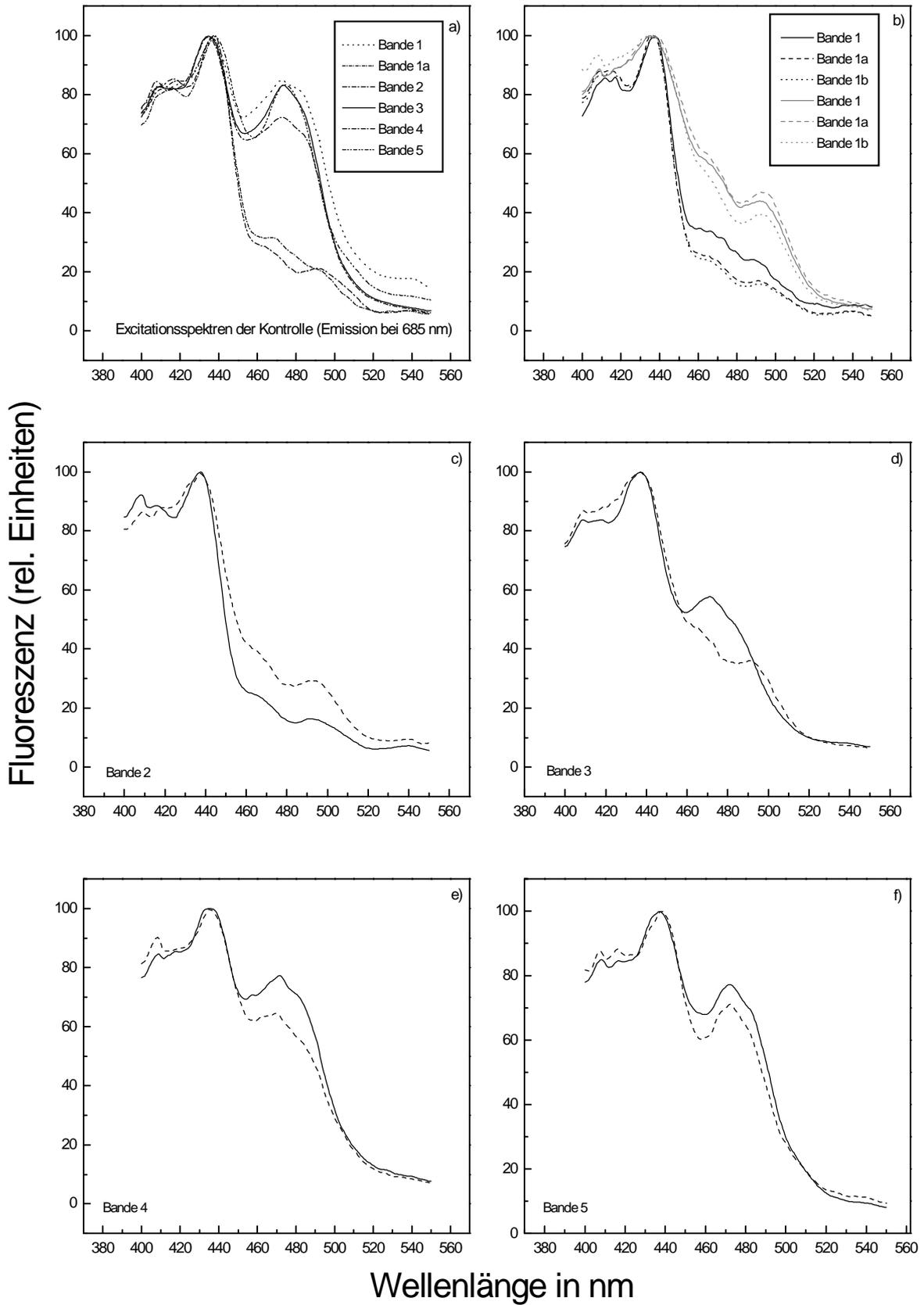
Die Bande 4 war beinahe vollständig reduziert. Auf der Gelelektrophorese war im Bereich der Bande 4 in der Regel kein Protein sichtbar. Wurde dieser Bereich im Fluorimeter vermessen, so ergab dieses ein zur Bande 4 der unbehandelten Zellen analoges Fluoreszenzmissionsspektrum, jedoch mit einer sehr viel geringeren Fluoreszenzausbeute. Damit wurde ersichtlich, daß in den carotinoidverarmten Zellen geringe Mengen des oligomeren LHC II vorhanden waren.

Bande 5 erwies sich bei den carotinoidverarmten Zellen als fluoreszenzintensivste Bande. Auch hier wies das Maxima keinen Unterschied zur entsprechenden Bande der unbehandelten Zellen auf.

Anhand der Daten muß festgehalten werden, daß die Reduzierung der Carotinoide in erster Linie zur Verminderung der Bande 4 und zur Reduzierung eines Fluoreszenzemitterkomplexes (Bande 3), welcher bei 711 nm emittiert, führt.

Die Abb.52b-f enthält die Excitationsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe carotinoidverarmter Zellen der Fluoreszenzmission 685 nm und 725 nm. Zum besseren Vergleich sind in der Abb.52a die Fluoreszenzexcitationsspektren der Pigment-Proteinkomplexe der unbehandelten Zellen der Fluoreszenzmission bei 685 nm zusammengefaßt.

Im Vergleich der Excitationsspektren der Banden 1 (Abb.52b) der carotinoidverarmten Zellen mit der Bande 1 der unbehandelten Zellen (Abb.52a) wird die Reduktion der Carotinoid- bzw. Chlorophyll b-Schulter bei der bei 685 nm und bei 725 nm detektierten Fluoreszenzmission ersichtlich, wobei die Reduktion dieser Bande besonders stark bei der 685 nm Fluoreszenzmission



**Abb.52** Fluorezenzexcitationsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe carotinoidverarmter Zellen von *Euglena gracilis*, 685 nm (—); 725 nm (- - -); zum Vergleich in Abb.52a) die Excitationsspektren bei 685 nm un behandelter Zellen; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

hervortrat. Damit bestätigte sich, daß die Carotinoidverarmung zur Verringerung des LHC innerhalb des PS I führte.

Das Excitationsspektrum der Bande 1 glich sich bei den carotinoidverarmten Zellen dem der Bande 1a an. Auch für die Banden 1a und 1b wurden sehr ähnliche Excitationsspektren gemessen.

Die Excitationsspektren der Bande 2 der carotinoidverarmten Zellen und die der unbehandelten Zellen sind identisch. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Carotinoidverarmung nicht zu einem Verlust von Pigmenten innerhalb des RC II führte.

Ein deutlicher Verlust der Carotinoid- bzw. Chlorophyll b-Schulter konnte bei der 685 nm Emission der Bande 3 beobachtet werden. Bemerkenswert hingegen scheint, daß die Carotinoidverarmung keinen Einfluß auf die 725 nm Fluoreszenzemission dieser Bande hatte.

Ebenso war bei der Bande 4 kein Unterschied zum Excitationsspektrum derselben Bande der unbehandelten Zellen festzustellen. Dieses weist darauf hin, daß durch die Carotinoidverarmung wahrscheinlich keine stöchiometrisch veränderte Pigment-Proteinbindung vorliegt, sondern mit Reduzierung der Carotinoide der gesamte Pigment-Proteinkomplex verringert war.

Die Excitationsspektren der Bande 5 hingegen wiesen im Vergleich zur Bande 5 der unbehandelten Zellen eine Fluoreszenzabnahme im Absorptionsbereich des Chlorophyll b und der Carotinoide auf. Das Verhältnis des Chl a-Maximum (438 nm) zum Maximum bei 473 nm stieg durch die Carotinoidverarmung von 1,2 auf 1,36 an.

Anhand aller bisherigen Ergebnisse ist folgendes Modell vorstellbar. Die nichtgestapelten Thylakoide bewirken eine unmittelbare Nähe beider Photosysteme. Wegen des geringen Gehaltes an oligomeren LHC II ist zur effektiven Energieabsorption wahrscheinlich eine Antenne aus Lichtsammelproteinen des LHC I und des LHC II (oligomere Form), also eine gemeinsamen äußeren Antenne beider Photosysteme nötig. Diese führt zur längerwelligen Verschiebung der Fluoreszenzemission intakter Zellen. Wahrscheinlich kommt es in Abhängigkeit vom Reduktionsgrad des PQ-Pools zur Mobilität dieser Antenne und zur Anbindung an eines der Reaktionszentren. Vorstellbar wäre, daß die Belichtung und möglicherweise auch die Dunkelinkubation eine Anbindung dieser gemeinsamen Antenne an das PS I fördert, was über die Bindung des 20 kDa Proteins (LHC I) an dieses Photosystem realisiert wird. In diesem Zustand würde die von diesem Komplex (LHC I + LHC II) absorbierte Energie an das PS I übertragen und es kann ein  $\Delta\text{pH}$ -unabhängiger Quench der Chlorophyllfluoreszenz detektiert werden. Diese Bedingungen scheinen einen hohen „spill over“ von Anregungsenergie absorbiert von der gemeinsamen Antenne zum PS I zu begünstigen, welcher wahrscheinlich das PS II bei exzessivem Licht schützt. FR-Licht führt zum Ablösen dieser Antenne vom PS I und somit zur Fluoreszenzerhöhung.

Generell muß angenommen werden, daß dieser Antennenkomplex einen starken Fluoreszenzemittor darstellt, was das im Vergleich zur höheren Pflanze erhöhte Niveau von Fs erklären würde. Die Reduzierung dieses Antennenkomplexes durch Carotinoidverarmung führt auch zur Erniedrigung der stationären Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welches sich in erhöhten qP-Werten der carotinoidverarmten Zellen widerspiegelt.

## 4. DISKUSSION

Intakte Zellen von *Euglena gracilis* reagieren auf Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten mit der Löschung der Chlorophyll a-Fluoreszenz wie dieses für höhere Pflanzen beschrieben ist. Jedoch scheinen im Vergleich zu Grünalgen und höheren Pflanzen nach unseren Erkenntnissen andere Prozesse basierend auf einem abweichenden Antennenaufbau in diese Regulationsmechanismen involviert.

### Pigmentstatus von *Euglena gracilis*

Die HPLC-Analyse ergab, daß in *Euglena gracilis* Diadinoxanthin,  $\beta$ -Carotin und Neoxanthin die mengenmäßig wichtigsten Carotinoide sind. Daneben konnten noch Diatoxanthin, Echinenon, Canthaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin anhand ihrer spektralen Eigenschaften und Co-Chromatographie mit Standardsubstanzen identifiziert werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Daten von KRINSKY et al. (1964); HAGER UND STRANSKY (1970); CUNNINGHAM UND SCHIFF (1986a) sowie BJØRNLAND et al. (1987). Letztere konnten neben den genannten Pigmenten auch Alloxanthin-Diester und Pectenolon nachweisen. Angaben zum quantitativen Gehalt dieser Pigmente variieren bei den einzelnen Autoren, was sich auf unterschiedliche Anzuchtbedingungen zurückführen läßt (CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986a).

Damit weicht *Euglena gracilis* von der für Grünalgen und höhere Pflanzen beschriebenen Pigmentausrüstung stark ab und gleicht, mit dem Vorkommen von Diadinoxanthin und Diatoxanthin, eher der für Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae und Dinophyceae beschriebenen Pigmentausrüstung (HAGER, 1980; WILHELM et al., 1988; BJØRNLAND, 1990; WILHELM, 1990; DEMMIG-ADAMS UND ADAMS III, 1993). Ein weiterer Unterschied zu den Chlorophyten ist das Vorhandensein einer dritten Chloroplastenmembran bei Euglenophyceae, wie auch bei Dinophyceae, was evolutionär die Aufnahme eines eukaryotischen Endosymbionten wahrscheinlicher macht (KNOLL, 1992; GREEN UND DURNFORD, 1996).

Neben diesen Unterschieden zu Grünalgen und höheren Pflanzen, zeichnete sich *Euglena gracilis* im Vergleich zu diesen durch einen auffallend niedrigen Chl b-Gehalt aus. CUNNINGHAM UND SCHIFF (1986a) machen einen niedrigeren Gehalt von Chl b innerhalb des LHC (Chl a/b: 2,9-2,1) und das Fehlen von Chl b im CP 1a (PS I + LHC I) für den niedrigen Gehalt von Chl b der ganzen Zelle verantwortlich, wiesen aber auch auf einen in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen veränderten Chl b-Gehalt hin. Dieser konnte mit einem veränderten Gehalt an LHC II korreliert werden. Für den LHC II autotropher Zellen von *Euglena gracilis* wurde von BRANDT UND WILHELM (1990) ein a/b-Verhältnis von 1,6-1,8 publiziert. GENGE et al. (1974) führen das hohe Chl a/b-Verhältnis der *Euglena*-Zellen auf einen geringen Gehalt an LHC zurück.

Aufgrund der elektrophoretischen Trennung der Pigment-Proteinkomplexe und deren spektraler Analyse können wir den reduzierten Gehalt von Chl b innerhalb der Lichtsammelantenne bestätigen. Im Vergleich zur höheren Pflanze fehlte im Absorptionsspektrum bei der oligomeren wie auch bei der monomeren Form der LHC eine deutliche Schulter bei 652 nm, dem Rotabsorptionsmaximum von Chl b. Auch muß festgehalten werden, daß der oligomere LHC II (Bande 4) im Vergleich zur höheren Pflanze bei *Euglena gracilis* reduziert war. Zusätzliche Argumente für eine Verringerung des Chl b aufgrund eines reduzierten Lichtsammelapparates ergaben sich aus den Ergebnissen der Experimente mit carotinoidverarmten Zellen. Dort korreliert der niedri-

ge Chl b-Gehalt mit einer Erniedrigung des LHC II, hauptsächlich der oligomeren Form. Ursache für die Verringerung des Chl b in *Euglena gracilis* könnte ein gegenüber höheren Pflanzen (KÜHLBRANDT, 1994b) verändertes Bindungsverhalten von Chl b an den LHC II sein, aber auch auf die drastische Verringerung des oligomeren LHC II in *Euglena gracilis* im Vergleich zu höheren Pflanzen (DREYFUSS UND THORNER, 1994) zurückgeführt werden.

### **Photoadaptation der Alge *Euglena gracilis***

Physiologische Anpassung an Veränderungen der Lichtintensität oder auch der spektralen Qualität des Lichtes wurde für viele Algen z.B. Dinoflagelaten (PREZELIN UND ALBERTE, 1978), Diatomeen (FALKOWSKI, 1985) sowie einzellige Chlorophyten (NEALE UND MELIS, 1986; HARRISON et al. 1992) und Rotalgen (TAN et al., 1995) beschrieben. Veränderungen der Quantität des Anzuchtlichtes führen zu verändertem Pigmentgehalt (BISHOP et al., 1989; FALKOWSKI UND LAROCHE, 1991).

Die Experimente zum Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten während des Wachstums auf physiologische Parameter sollten zum einen die Frage nach optimalen Anzuchtbedingungen klären, zum anderen aber auch Reaktionen der Alge hinsichtlich ihrer Pigmentausrüstung beim Wachstum unter höheren Lichtintensitäten und damit die Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Wachstumsbedingungen untersuchen. Ziel war es, Hinweise auf die photoprotektive Natur einzelner Carotinoide zu erhalten.

Die Anzucht mit einer Lichtintensität von  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  erwies sich als optimale Wachstumsbedingung für *Euglena gracilis*. Dieses spiegelte sich in einer maximalen photosynthetischen Sauerstoffentwicklung sowie dem höchsten Fv/Fm-Verhältnis wider.

Im Gegensatz zu anderen Autoren (FALKOWSKI UND LAROCHE, 1991; LATASA, 1995) konnten wir keine Zunahme von Lichtsammelpigmenten bzw. Lichtsammelproteinen unterhalb der optimalen Lichtbedingung für das Wachstum feststellen. In Übereinstimmung mit unseren Daten wurde die Unterdrückung der Pigmentsynthese für verschiedene Algen (THIELMANN et al., 1991; KÜBLER UND RAVEN, 1995) bzw. die Reduzierung des Chlorophyllgehaltes bei Schwachlicht bei Chlorophyten (PEREZ-LLORENS et al., 1996) beschrieben. Möglicherweise führen diese extremen Schwachlichtbedingen ( $0,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) bei mixotrophen Zellen zur Inbalance zwischen phototrophen und heterotrophen Stoffwechselwegen. Verschiedene Autoren beschrieben den Einfluß von Kohlenstoffquellen auf die Chloroplastenentwicklung. So stellten RINKIN UND SCHWARTZBACH (1989) für *Euglena gracilis* eine Hemmung der Chloroplastenentwicklung durch Ethanol, welches die lichtinduzierte Chlorophyllsynthese inhibiert, als Kataboliten-Repression (MONROY UND SCHWARTZBACH, 1984) dar. Ebenso kann Glukose, als organische Kohlenstoffquelle, zur Verringerung der LHC in *Euglena* führen (KOLL et al., 1980). Diese Effekte erklären die beobachtete Abnahme der Lichtsammelpigmente bei Schwachlichtbedingungen.

Eine Zunahme des Verhältnisses des Carotinoidgehaltes zum Chlorophyllgehalt wird häufig als Indikator für Lichtstreß im Phytoplankton benutzt (LATASA, 1995). Auch bei *Euglena gracilis* kommt es zu einer drastischen Zunahme dieses Quotienten, wenn Intensitäten des Anzuchtlichtes über  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  verwendet werden. Zusätzlich zeichnen sich die unter Starklicht gewachsenen Zellen ( $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) durch die Reduzierung der Quantenausbeute des PS II wie auch durch die Abnahme der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung aus.

Diese Faktoren lassen ebenso wie die Erhöhung des Verhältnisses Car/Chl auf eine durch übermäßiges Licht verursachte Schädigung des Photosyntheseapparates unter diesen Bedingun-

gen schließen. Hauptsächlich stieg der Gehalt an Diadinoxanthin unter solchen Belichtungsbedingungen stark an. Weiterhin nahm auch der Gehalt an  $\beta$ -Carotin zu.

Nach bisherigen Untersuchungen gibt es wenig Anhaltspunkte dafür, daß die Anzahl der Bindungsstellen für Pigmente eines LHC-Proteins bei höheren Pflanzen durch äußere Faktoren, z.B. die Lichtintensität, modifiziert werden kann (WILHELM, 1990; PETER UND THORNER, 1991; KÜHLBRANDT, 1994a,b). So müßte es bei deutlicher Zunahme eines Pigmentes auch zur vermehrten Bildung des entsprechenden Proteins kommen, sieht man von Pigmentablagerungen in anderen Kompartimenten wie z. B. bei *Dunaliella* (ZAMIR, 1995) ab. Bei Grünalgen können im Kontrast zu den höheren Pflanzen die Anzahl der Bindungsstellen für Pigmente an Proteinen je nach Status der Anzucht realisiert sein. SUKENIK et al. (1987) fanden, daß durch die Veränderung des Lichtes die Relation von Pigment zu Protein modifiziert sein kann. HUMBECK et al. (1988) beschrieben die Abhängigkeit des Gehalts an Lutein pro Protein in Relation zum ontogenetischen Status. Wir fanden eine Reduzierung von einzelnen Pigmentproteinen des photosynthetischen Apparates von *Euglena gracilis* (CP47, D1-Protein, LHC I, LHC II), wenn die Zellen bei höheren Lichtintensitäten als  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  angezogen werden. Mit zunehmender Belichtungsintensität nimmt also der Gehalt dieser Proteine ab. Wie es im Fall des Chl b bereits diskutiert wurde, deutet auch die Abnahme des in Lichtsammelproteinen gebundenen Neoxanthins (CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986a,b; PETER UND THORNER, 1991; BASSI et al., 1993) nach Anzucht bei Starklicht ( $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) auf eine Reduktion der LHC bei höheren Lichtintensitäten hin. Eine Zunahme sogenannter ELIP (early light induced proteins) (KRÓL et al., 1995) wurde nicht beobachtet. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die Erhöhung des Diadinoxanthins unter Starklicht auf eine Zunahme von LHC oder ELIP zurückzuführen ist. BRANDT UND WILHELM (1990) konnten die Zunahme von Diadinoxanthin im LHC II in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus von *Euglena gracilis* beobachten. Somit scheint die Möglichkeit der Erhöhung der Bindungsstellen für Diadinoxanthin in Pigment-Proteinkomplexen von *Euglena gracilis* durchaus gegeben zu sein.

Eine völlig andere Erklärung der Anbindung des Diadinoxanthin läßt sich aber aus Publikationen von MOSKALENKO UND KARAPETYAN (1996), HAVAUX UND TARDY (1997) sowie HAVAUX et al. (1998) ableiten. Diese Autoren meinen, daß bipolare Carotinoide direkt in der Thylakoidmembran gebunden sein können. Durch Anwesenheit dieser Komponenten innerhalb der Membranen soll die Membranfluidität modifiziert werden, welches eine Erhöhung der Thermostabilität der Thylakoide bewirkt.

Wir können anhand unserer Experimente nicht differenzieren, ob sich die Anzahl der Bindungsstellen innerhalb der LHC erhöht oder Diadinoxanthin innerhalb der Thylakoidmembranen vermehrt gebunden wird.

Unabhängig vom Bindungszustand des Diadinoxanthins wird eine Konzentrationserhöhung dieses Pigments als Reaktion auf Lichtstreß angesehen. Die Zunahme von Diadinoxanthin konnte durch LATASA (1995) bei Starklichtanzucht von *Thalassiosira weissflogii* beobachtet werden. BÜCHEL et al. (1988) und WILHELM et al. (1997) konnten dieses ebenfalls für *Pleurochloris meiringensis* bzw. *Phaeodactylum tricorutum* aufzeigen. Auch in diesen Publikationen wird eine photoprotektive Funktion dieses Pigments für möglich gehalten.

Neben der protektiven und strukturellen Funktion des  $\beta$ -Carotins in den Reaktionszentren (YOUNG, 1993b; TELFER et al., 1994; FRANK UND COGDELL, 1996, TREBST UND DEPKA, 1997) hat dieses Pigment eine wichtige Funktion als Stoffwechelintermediat bei der Carotinoidbiosyn-

these. Alle in *Euglena gracilis* vorkommenden Carotinoide sind Derivate des  $\beta,\beta$ -Carotins (BJÖRNLAND et al., 1987). Die Zunahme des Diadinoxanthins unter Starklicht könnte auch eine Zunahme des Stoffwechselintermediates  $\beta$ -Carotin bedingen.

Auch BÜCHEL et al. (1988) konnten in *Pleurochloris meiringensis* die Erhöhung des  $\beta$ -Carotin Gehaltes mit Zunahme der Intensität des Anzuchtlichtes nachweisen. Generell ist der Gehalt an  $\beta$ -Carotin in Sonnenblättern höher (YOUNG, 1993a). SHAIH et al. (1993) konnten zeigen, daß Sauerstoffradikale bei der massiven Akkumulation von  $\beta$ -Carotin in *Dunaliella bardawil* beteiligt sein können. Neben der Zunahme als Stoffwechselintermediat wäre möglicherweise somit auch eine Schutzfunktion des erhöhten Gehalts von  $\beta$ -Carotin denkbar.

Ab einer Lichtintensität von  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  wiesen wir Canthaxanthin in *Euglena gracilis* nach. Dieses stieg mit Zunahme der Lichtintensität bei der Anzucht stark an. Die Akkumulation von Canthaxanthin ist für verschiedene Algen beschrieben worden (ARAD et al., 1993; HAGEN et al. 1993; KRISHNA UND MOHANTY, 1998). Dieses Pigment wird in die Reihe der Sekundär-Carotinoide eingeordnet. Allgemein wird diesem Ketocarotinoid photoprotektive Funktion zugeschrieben. Sekundär-Carotinoide werden definitionsgemäß in Abhängigkeit von exogenen Faktoren, wie z. B. hohe Lichtintensitäten, reduzierte Stickstoffversorgung (YOUNG, 1993a), in Lipidbodies außerhalb des Chloroplasten akkumuliert. Bei *Euglena gracilis* spricht wenig für den Akkumulationsmechanismus außerhalb des Chloroplasten. Die Chloroplastenpräparation aus Starklichtzellen ( $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) enthielt nämlich Canthaxanthin im gleichen Verhältnis zu Diadinoxanthin wie die Zelle (Daten nicht gezeigt). Damit ist die Rolle des Canthaxanthins als Sekundär-Carotinoid in *Euglena gracilis* zweifelhaft.

Für die Rolle von Canthaxanthin, Diadinoxanthin und möglicherweise auch  $\beta$ -Carotin als photoprotektive Substanzen in *Euglena gracilis* spricht folgendes: In Zellen, die im Starklicht angezogen wurden, erwiesen sich sowohl die photosynthetische Sauerstoffentwicklung wie auch das D1-Protein als wesentlich stabiler gegenüber Lichtstreß von  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  als in Zellen, die bei  $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  kultiviert wurden (Daten nicht gezeigt). Außerdem reagiert *Euglena gracilis* in ähnlicher Weise wie andere Algen auf eine Erhöhung der Lichtintensität während der Anzucht mit einer Erhöhung des Carotinoidgehaltes pro Zelle.

Auf diese Weise können die Zellen sich innerhalb bestimmter Grenzen wirkungsvoll an unterschiedliche Wachstumsbedingungen anpassen. Zusammen genommen unterstützen diese Ergebnisse die Funktion der Carotinoide, insbesondere des Diadinoxanthins, als photoprotektive Substanzen.

### **Aktivität eines Xanthophyllzyklus in *Euglena gracilis* ?**

Alternativ zum klassischen Violaxanthinzyklus wurde für verschiedene Algen ein Zweikomponentenzyklus beschrieben, wobei ein nichtphotochemischer Quench mit der Zunahme von Diatoxanthin korreliert. Die Zunahme von Diatoxanthin beruht auf einer reversiblen Deepoxidierung des Diadinoxanthins (DEMERS et al., 1991; ARSALANE et al. , 1994; OLAIZOLA UND YAMAMOTO, 1994). HAGER UND STRANSKY (1970) machten Angaben über eine lichtinduzierte Umwandlung von Diadinoxanthin in Diatoxanthin in Euglenophyceae. Wir konnten zwar das Vorhandensein beider Pigmente (Diadinoxanthin, Diatoxanthin) bestätigen, es kam jedoch auch unter unterschiedlichsten Bedingungen (Belichtung unterschiedlich adaptierter Algen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten, Belichtung in Sauerstofffreiheit) nicht zu einer reversiblen Um-

wandlung dieser Pigmente, wie es beim Vorliegen eines Diadinoxanthinzyklus zu erwarten gewesen wäre.

Der Einsatz von DTT, einem Violaxanthin-Deepoxidaseinhibitor, welcher auch eine Deepoxidierung des Diadinoxanthins verhindert (OLAIZOLA et al., 1994), hatte keinen Einfluß auf den Gehalt an Diadinoxanthin bzw. Diatoxanthin vor und nach Belichtung der Zellen. Der nicht-photochemische Quench der Fluoreszenz erreichte in Anwesenheit von DTT während der Belichtung 83,9% des Wertes gemessen ohne Zusatz von DTT. Damit entwickelte sich der größte Teil des Quench unabhängig vom Zusatz von DTT und somit unabhängig von einem Carotinoidzyklus. Die Differenz des nichtphotochemischen Quench der Proben mit und ohne DTT ist möglicherweise auf die Wirkung von DTT auf andere Komponenten der Photosynthese zurückzuführen (PFÜNDEL UND BILGER, 1994), wie z. B. auf eine Inhibierung des sauerstoffbildenden Komplexes (IRRGANG et al., 1992) oder die Wirkung auf Disulfidgruppen der  $H^+$ -ATP-Synthase im Chloroplasten (JUNESCH UND GRÄBER, 1985).

Zunahmen von Xanthophyllzyklus-Pigmenten sind in Zusammenhang mit Starklichtadaptation bei verschiedenen Organismen mehrfach berichtet worden (WILLMOES UND MONAS, 1991; DEMMIG-ADAMS UND ADAMS, 1992; SHARMA UND HALL, 1992; SCHÄFER et al., 1994; SCHUBERT et al., 1994; WILHELM et al., 1997). Wie schon diskutiert, führen sowohl höhere Lichtintensitäten während der Anzuchtphase als auch kurzfristige Belichtung in Abhängigkeit von der Intensität zu einer Erhöhung des Gehaltes an Diadinoxanthin. Diese kann jedoch nicht als eine Poolerhöhung der Xanthophyllzyklus-Pigmente gewertet werden. Die Tatsache, daß es in *Euglena*-Zellen schon bei kurzzeitiger Belichtung zur Vermehrung des Diadinoxanthingehaltes kommt und daß dieses auch in carotinoidverarmten Zellen passiert, ist ein nachhaltiger Hinweis auf eine Schutzfunktion dieses Pigments. Zusätzliche Bedeutung erlangt dieser Hinweis dadurch, daß Zellen, in denen die Bildung des Diadinoxanthins in Gegenwart von Norflurazon während der Belichtung unterdrückt ist, eher und im stärkeren Maß durch Licht geschädigt werden als normale (Daten nicht gezeigt).

### **Zur Rolle der Carotinoide hinsichtlich der Empfindlichkeit der Alge gegenüber Licht**

Durch die Tatsache, daß bei *Euglena gracilis* ein nichtphotochemischer Quench der Chlorophyllfluoreszenz existiert, der nicht mit einem funktionierenden Xanthophyllzyklus in Verbindung gebracht werden kann, ergibt sich die generelle Frage, welcher Mechanismus dieser Fluoreszenzlöschung zugrunde liegt. Durch das Fehlen des Xanthophyllzyklus ist gerade *Euglena* für die Untersuchung dieses Problems sowie auch anderer mit der Schutzfunktion der Carotinoide zusammenhängender Fragen ein sehr geeignetes Objekt.

Durch die Anzucht in Gegenwart des Phytoendesaturaseinhibitors Norflurazon (SANDMANN et al., 1980) war es uns möglich, an Zellen mit modifiziertem Carotinoidgehalt zu arbeiten. Neben dem entscheidenden Effekt der Inhibierung der Phytoendesaturase wird dieser Substanz auch eine geringe Wirkung auf die Fettsäurezusammensetzung (JOHN, 1976), weiterhin eine Verringerung der Abscisinsäure infolge des Carotinoidmangels (STEGINK UND VAUGHIN, 1988), eine Hemmung der Nitrat- und Nitritreduktase (KRIHNA RAO et al., 1988) sowie eine Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung (BÖGER UND SCHLUE, 1976; PANZER, 1986) zugeschrieben. Da die von uns eingesetzte Konzentration von Norflurazon weit unter dem beschriebenen  $I_{50}$ -Wert der Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion (PANZER, 1986) lag, können diese Effekte vernachlässigt werden. Aufgrund des fehlenden Schutzes der Carotinoide

tritt als sekundärer Effekt der Norfluazonbehandlung aber eine Reduzierung des Chlorophyllgehaltes durch photooxidative Prozesse auf (PANZER, 1990; SAGAR UND BRIGGS, 1990). Die Initialrate der Chlorophyllsynthese ist in behandelten und carotinoidverarmten Zellen jedoch gleich (VAISBERG UND SCHIFF, 1976).

Um ein Wachstum von Zellen in Anwesenheit von Norflurazon (Konzentrationen über 5  $\mu\text{M}$ ) zu gewährleisten, ist eine extreme Verringerung des Anzuchtlichtes erforderlich. Mit steigender Norflurazonkonzentration nimmt, neben dem Carotinoid- und Chlorophyllgehalt, der Gehalt an D1-Protein, CP47; LHC II und LHC I ab. Dieses wird von der Abnahme der photosynthetischen Parameter (Fv/Fm, Sauerstoffentwicklung) begleitet. Für das Assembly von funktionellen Photosyntheseeinheiten sind Carotinoide essentielle Komponenten (HUMBECK et al., 1989; PAULSEN et al. 1990; MARKGRAF UND OELMÜLLER, 1991; TREBST UND DEPKA, 1997). Eine zunehmende Reduktion dieser führte zur Reduktion der photosynthetischen Strukturen bzw. Membranen (VAISBERG UND SCHIFF, 1976). Die Abhängigkeit der Hemmung der Carotinoidbiosynthese von der Norflurazonkonzentration (VAISBERG UND SCHIFF, 1976; STEGINK UND VAUGHN, 1988; PANZER 1990) und auch die Abhängigkeit der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung vom Carotinoidgehalt (SANDMANN et al., 1993) wurde in den Anzuchtexperimenten mit unterschiedlichen Norflurazonkonzentrationen deutlich. Jedoch darf der Einfluß des Schwachlichtes, wie schon diskutiert, auf die photosynthetischen Strukturen nicht außer Acht gelassen werden.

Um mit carotinoidverarmten und dennoch photosynthetisch aktiven Zellen zu arbeiten, wählten wir aufgrund dieser Versuche Zellen, welche mit 5  $\mu\text{M}$  Norflurazon und bei ähnlichen Lichtbedingungen wie die Kontrollen angezogen wurden. Diese hatten einen im Vergleich zur Kontrolle stark reduzierten Carotinoidgehalt und zeichneten sich durch nur geringe Abnahme des D1-Proteins bei gleichzeitig starker Reduzierung lichtsammelnder Komplexe (20-25 kDa) aus.

Neben der Bedeutung der Carotinoide für die strukturelle Integrität der Pigment-Proteinkomplexe (PLUMLEY UND SCHMIDT, 1995), wird die photoprotektive Rolle der Carotinoide in photosynthetischen Systemen allgemein durch den Quench des angeregten Triplett-Zustandes der Chlorophylle bzw. die Entgiftung von Singulett-Sauerstoff (SIEFERMANN-HARMS, 1987; FRANK UND COGDELL, 1993; FRANK et. al., 1994, 1996; YOUNG UND FRANK; 1996) aufgrund des langen konjugierten Systems von  $\pi$ -Elektronen bestimmter Carotinoidmoleküle (Anzahl der Doppelbindungen  $> 10$ ) (FRANK et. al., 1994) beschrieben. Eine andere antioxidative Funktion von  $\beta$ -Carotin wurde von BURTON (1990) dargestellt. Das Vorhandensein der Doppelbindungen im Molekül ermöglicht die Reaktion mit Peroxidradikalen. Jedoch scheint die Fähigkeit membrangebundener Carotinoide, freie Radikale zu entsorgen, begrenzt (SIEFERMANN-HARMS, 1990).

Die Lichtsättigungskurve der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung carotinoidverarmter Zellen bezogen auf die Zellzahl ergab für diese Zellen im Vergleich zur Kontrolle einen flacheren Anstieg der Kurve bis zu einer Lichtintensität von 140  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), was auf die Reduktion der Lichtsammelkomplexe zurückzuführen ist (MELIS et al., 1996). Der nach HENLEY (1993) berechnete Lichtsättigungs-Parameter der Photosyntheserate ist bei den carotinoidverarmten Zellen erhöht. Die Carotinoidverarmung hatte somit Einfluß auf die Photosyntheserate unter limitierenden Belichtungsintensitäten wie auch auf Lichtsättigung der Photosyntheserate. Gerade in Schwachlichtbereichen scheint die lichtsammelnde Funktion der Carotinoide bzw. der lichtsammelnden Komplexe für optimale Photosyntheseraten von Bedeutung.

Über das Phänomen der lichtabhängigen Inhibierung der Photosynthese (Photoinhibierung) in Algen wurde zusammenfassend von NEALE (1987) berichtet. Generell wird als ein Indiz für Photoinhibierung das Absinken der Lichtsättigungskurve bei Belichtung mit sättigenden Lichtintensitäten gewertet (HENLEY, 1993). Diese konnte bei den carotinoidverarmten Zellen ab einer Belichtung mit  $1200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  beobachtet werden. Damit reagierten diese carotinoidverarmten Zellen schon nach 5minütiger Belichtung deutlich empfindlicher auf Licht als ihre unbehandelten Kontrollen. Die generelle Verringerung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion pro carotinoidverarmter Zelle im Vergleich zur unbehandelten Zelle folgt der Chlorophyllreduzierung durch Carotinoidverarmung pro Zelle. Bezogen auf den Chlorophyllgehalt der Zellsuspensionen konnten, im Gegensatz zu SANDMANN et al. (1993), ähnliche Sauerstoffentwicklungsraten der hinsichtlich des Carotinoidgehaltes unterschiedlichen Zellen gemessen werden.

Bei längeren Belichtungen der carotinoidverarmten Zellen zeigten diese sich deutlich empfindlicher hinsichtlich des Fv/Fm-Verhältnis sowie der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung als die unbehandelten Zellen. TREBST UND DEPKA (1997) konnten ebenso den Verlust der photosynthetischen Aktivität bei Belichtung der durch Norflurazon carotinoidverarmten Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* beobachten. Auch bei *Scenedesmus* (SANDMANN et al. 1993) führte die Belichtung carotinoidverarmter Zellen zur Reduzierung der Sauerstoffentwicklung im Vergleich zur Kontrolle. Die höhere Empfindlichkeit der carotinoidverarmten Zellen wird von diesen Autoren auf das Fehlen des  $\beta$ -Carotins zurückgeführt, welches zum einem für das „reassembly“ des D1-Proteins essentiell ist (TREBST UND DEPKA, 1997), zum anderen können bei Carotinoiddefizit reaktive Sauerstoffspezies weniger effizient entsorgt werden (SANDMANN et al., 1993). Somit ist der ungeschützte Chloroplast nicht in der Lage, bei Carotinoidverarmung die Neusynthese der durch photooxidative Prozesse zerstörten Proteine (D1) auf einem optimalen Niveau zu halten. Sowohl für *Chlamydomonas* (TREBST UND DEPKA, 1997) als auch für *Scenedesmus* (SANDMANN et al.; 1993) konnte ein verstärkter D1-Abbau bei Belichtung carotinoidverarmter Algen gezeigt werden.

Dieses wurde durch die Ergebnisse an carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* untermauert. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle konnte hier bei Belichtung (4h) ein Abbau des D1-Proteins beobachtet werden.

Ein wichtiger Unterschied zu den zitierten Arbeiten tritt bei quantitativer Betrachtung der einzelnen Carotinoide zu Tage. Der  $\beta$ -Carotingehalt war bei den Belichtungsversuchen (Kap. 3.2.3) im Vergleich zwischen der Kontrolle und den carotinoidverarmten Zellen annähernd gleich. Dieses läßt die Schlußfolgerung zu, daß die photoprotektive Funktion der Carotinoide nicht allein durch die Rolle des  $\beta$ -Carotins zu erklären ist. Trotz gleichem Gehalt an  $\beta$ -Carotin konnte bei den carotinoidverarmten Zellen ein lichtinduzierter D1-Abbau gemessen werden. Da in *Euglena gracilis* keine Aktivität eines Xanthophyllzyklus registriert wurde, müssen andere Mechanismen unter Beteiligung der Carotinoide bzw. eine Involvierung von Pigment-Proteinkomplexen beim Schutz vor exzessivem Licht eine entscheidende Rolle spielen.

Die Belichtung von Chloroplasten führte zu einer Inaktivierung der PS II-Aktivität. Diese war bei den carotinoidverarmten Chloroplasten stärker. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle wurde bei den carotinoidverarmten Chloroplasten auch eine Reduktion der PS I-Aktivität bei Belichtung gemessen. Die Inaktivierung des PS I wird von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (GODDE ET. AL., 1992; SONOIKE UND TERASHIMA, 1994; TJUS et al., 1998), allerdings konnten derartige Befunde nur bei niedrigen Temperaturen (ca.  $4^\circ\text{C}$ ) erreicht werden. Als mögliche

Ursachen für die Photoinhibierung des PS I wird die Inaktivierung des P-700 durch Singulett-Sauerstoff oder das Zerstören der Eisen-Schwefelzentren des PS I durch Superoxid (SONIOKE UND TERASHIMA, 1994) angesehen. Unter „normalen“ Bedingungen führt Lichtstreß bei oxygenen Pflanzen zuerst zur Inaktivierung des PS II und erst in Folge werden weitere Prozesse der Photoinhibierung eingeleitet (ARO et al., 1993). Die Inaktivierung des PS I der carotinoidverarmten Zellen wurde schon nach nur 10 minütiger Belichtung sichtbar. Es ist anzunehmen, daß der Schutzeffekt der Carotinoide hinsichtlich der Verhinderung der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies oder auch deren Entgiftung nicht nur auf das PS II bezogen, sondern ebenso für die Stabilität des PS I von Bedeutung ist.

Einwirkungen von Hydroxylradikalen verursachen in mixotroph angezogenen *Euglena gracilis* qualitativ gleiche Veränderungen in den Derivativspektren wie sie bei carotinoidverarmten Zellen zu beobachten sind, das Verhältnis Chl 684/669 sinkt, d.h. die bei ca. 684 nm absorbierende Subbande verkleinert sich (PANZER, 1990). Um den Einfluß des Carotinoidgehaltes auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, welche als eine Ursache für photoinhibitorische Prozesse angesehen werden, zu untersuchen, wurde eine für *Euglena gracilis* modifizierte Methode zum Nachweis von Hydroxylradikalen eingesetzt (TSCHERSCH, 1992; TSCHERSCH UND OHMANN, 1993). Die Belichtung von carotinoidverarmten Chloroplasten führte sowohl zur erhöhten Bildungsrate als auch zur Erhöhung der Konzentration von Hydroxylradikalen im Vergleich zu den unbehandelten Chloroplasten. Damit wurde deutlich, daß ein durch die Carotinoidverarmung verursachter Verlust von photoprotektiven Mechanismen zur verstärkt auftretenden Photoinhibierung der Zellen führt, welche vermutlich auf erhöhte Radikalbildung zurückzuführen ist. Auf der Basis dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß der beobachtete D1-Abbau bei Belichtung carotinoidverarmter Zellen durch vermehrte Radikalbildung induziert wurde. Photoinhibierung resultiert u.a. aus einem Abbau des D1-Proteins (ARO et al., 1993), welcher durch unterschiedliche Radikale induziert sein kann (MIYAO, 1994; MISHRA et al., 1996).

Zu erklären wäre die höhere Empfindlichkeit carotinoidverarmter Zellen bzw. Chloroplasten, wie schon erwähnt, durch eine direkte Reaktion einzelner Carotinoide mit Radikalen (BURTON, 1990). Wahrscheinlicher ist jedoch, daß durch das Fehlen der beschriebenen protektiven Eigenschaften einzelner Carotinoide bzw. regulatorischer Prozesse innerhalb der Pigment-Proteinkomplexe schädigende Prozesse überwiegen. Dieses spiegelt sich im D1-Abbau; einer Reduzierung der Sauerstoffproduktion und der Quantenausbeute des PS II bei der Belichtung intakter carotinoidverarmter Zellen bzw. der verstärkten Inaktivierung der PS II-Aktivität, Inaktivierung der PS I-Aktivität und Zunahme der Hydroxylradikalbildung sowie verstärktem Ausbleichen von Chlorophyllen und Carotinoiden (Daten nicht gezeigt) bei der Belichtung von carotinoidverarmten Chloroplasten im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollen wider. Die Beteiligung einzelner Pigment-Proteinkomplexe innerhalb photoprotektiver Mechanismen wird durch Ergebnisse der gelelektrophoretischen Isolierung der Pigment-Proteinkomplexe aus carotinoidverarmten und unbehandelten Thylakoiden bestätigt. Die als oligomere LHC II identifizierte Bande 4 wurde durch den Carotinoidmangel beinahe vollständig reduziert. Weiterhin zeigte sich eine Reduktion der Bande 3. Die ausführliche Diskussion dieses Ergebnisses erfolgt in einem späteren Abschnitt. An dieser Stelle sei bemerkt, daß durch die Reduktion von bestimmten Pigment-Proteinkomplexen, hervorgerufen durch die Carotinoidverarmung, die Empfindlichkeit der Zellen bzw. der Chloroplasten gegenüber Licht deutlich erhöht ist.

## Der lichtinduzierte Quench der Chlorophyll a-Fluoreszenz

Da die Löschung der Fluoreszenz unabhängig von einem Xanthophyllzyklus war, bot die Analyse des Fluoreszenzquench von *Euglena gracilis* die Möglichkeit die Frage nach dissipativen Prozessen losgelöst von einer Pigmentumwandlung zu untersuchen. Der Vergleich der Belichtung von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen sollte Aufschluß über die Beteiligung der Carotinoide bzw. einzelner Pigment-Proteinkomplexe innerhalb photoprotektiver Mechanismen geben.

In Anlehnung an das „bipartite model“ von BUTLER (1978) können für ein Exciton drei mögliche Wege der Energiedissipation angenommen werden. Erstens die Abgabe in Form von Fluoreszenz. Zweitens eine thermale Dissipation innerhalb der Antennen und zum Dritten der Transfer zum Reaktionszentrum. Im Reaktionszentrum wird diese Energie in der Regel zur Photochemie genutzt, kann aber auch bei vorhandener Reduktion von  $Q_A$  thermal dissipiert werden (DAU 1994a,b; OLAIZOLA UND YAMAMOTO, 1994; JOHNSON et al., 1995; POŠPIŠIL, 1997).

*Euglena* reagierte auf die Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten im Vergleich zu höheren Pflanzen mit einer relativ hohen Emission der stationären Fluoreszenz (Fs). Die Erhöhung des Fs-Niveaus konnte auch bei Chl b-Mutanten von *Hordeum vulgare* (LOKSTEIN et al., 1994) beobachtet werden. Die Zugabe von DTT zum Wildtyp als auch zur Chl b-Mutante der Gerste (LOKSTEIN et al., 1994) wie auch zu Spinat (DEMMIG-ADAMS, 1990) erhöhte ebenfalls die stationäre Fluoreszenz (Fs). Durch den Verlust von LHC II (hauptsächlich der trimeren Form Lhcb1/Lhcb2) der Chl b-Mutante tritt eine Reduzierung des  $\Delta pH$ -abhängigen Quench ein, obwohl die Größe des Xanthophyllzyklus-Pools bezogen auf Chl a im Vergleich zum Wildtyp nicht betroffen ist (LOKSTEIN et al., 1993, 1994). Ebenso wird durch die Zugabe von DTT zum Wildtyp als auch zur Chl b-Mutante der Gerste (LOKSTEIN et al., 1994) wie auch zu Spinat (DEMMIG-ADAMS, 1990) der  $\Delta pH$ -abhängige Quench durch Inhibierung des Xanthophyllzyklus drastisch reduziert. Der Verlust dieser für  $q_E$  verantwortlichen Mechanismen (Aggregation der LHC II bzw. Xanthophyllzyklus) führt zu einer Erhöhung von Fs der behandelten Pflanzen im Vergleich zu ihren Kontrollen. Neben der Erhöhung der stationären Fluoreszenz (Fs) kommt es in diesen Pflanzen auch zur Verminderung des Quench von  $F_0$ . Das Fluoreszenzmeßprotokoll von *Euglena gracilis* gleicht dem der Chl b-Mutante bzw. dem von DTT behandelten Pflanzen. Neben dem niedrigen Gehalt an Chl b und der fehlenden Segregation der Thylakoidmembranen im Vergleich zu höheren Pflanzen und Grünalgen ließ das abweichende Fluoreszenzverhalten von *Euglena gracilis* vermuten, daß die fluoreszenzlöschenden Prozesse dieser Alge sich von denen der höheren Pflanze unterscheiden.

Die Belichtung der unbehandelten aber auch der carotinoidverarmten Algenzellen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten führte zu einem Quench der Chl a-Fluoreszenz. Dabei stieg dieser mit zunehmender Lichtintensität an. Im Vergleich der Löschung der maximalen Fluoreszenz durch 5minütige Belichtung der unbehandelten mit den carotinoidverarmten Zellen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten wurde ersichtlich, daß die schwachen Lichtintensitäten (bis  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) einen höheren Quench von  $F_m$  bei den unbehandelten Zellen zur Folge hatten. Erst mit Erreichen der Lichtsättigung nahm die Löschung der maximalen Fluoreszenz bei den carotinoidverarmten Zellen deutlich zu. Es ist wahrscheinlich, daß für die stärkere Löschung von  $F_m$  der carotinoidverarmten Zellen bei 5minütiger Belichtung mit höheren Lichtintensitäten photo-

inhibitorische Prozesse verantwortlich sind, da schon die kurzzeitige Belichtung (5 min, 2000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) zur Reduktion der Sauerstoffproduktion führte.

Im Gegensatz zu der 5minütigen Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten führte die längere Belichtung (20 min) zu einer deutlich höheren Löschung der maximalen Fluoreszenz der unbehandelten Algen im Vergleich zu carotinoidverarmten Zellen. Ausgehend von der Tatsache, daß carotinoidverarmte Zellen empfindlicher auf Licht reagierten (z.B. D1 Abbau, Reduzierung der PS I-Aktivität) muß angenommen werden, daß die geringere Löschung der maximalen Fluoreszenz durch Carotinoidverarmung Ausdruck des Verlustes eines fluoreszenzquenchen, photoprotektiven Mechanismus ist und nicht auf die Zunahme schädigender Prozesse zurückzuführen ist.

Nichtphotochemische Löschung der Fluoreszenz, welche aus einer Zunahme der strahlungslosen Energieabgabe der angeregten Antennen hervorgeht, ist neben einem Quench von Fm durch einen Quench von Fo charakterisiert (DEMMIG-ADAMS, 1990; GILMORE UND YAMAMOTO, 1991; HORTON et al., 1991; RUBAN et al., 1992; HORTON UND RUBAN, 1993; HAVAUX, 1993; DAU, 1994a,b). Das  $Q_A$  Reoxidationsmodell (KRIEGER UND WEIS, 1992) bietet keine Erklärung für einen Quench von Fo. Somit kann angenommen werden, daß das Auftreten eines Fo-Quench in Zusammenhang mit einem Quench von Fm in *Euglena gracilis* nach bisherigem Erkenntnisstand den fluoreszenzlöschenden Mechanismen innerhalb des LHC II zuzuordnen ist (HORTON UND RUBAN, 1993; DAU, 1994a).

Aus der Betrachtung des Quotienten  $SV_m/SV_0$  in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität wird der unterschiedliche Zusammenhang des Quench von Fm und Fo bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen deutlich. Die Erhöhung des Quotienten bei carotinoidverarmten Zellen gegenüber der Kontrolle stellt klar, daß bei diesen Zellen ein großer Anteil von Fm ohne gleichzeitige Beeinflussung von Fo gelöscht wird. Die weitere Zunahme des Quotienten bzw. das Auftreten negativer Werte nach Erreichen der Intensitäten für die Lichtsättigung zeigt klar den Einsatz photoinhibitorischer Prozesse bei beiden Algenkulturen. Die unter diesen Bedingungen auftretende Fo-Erhöhung ist der starken Reduktion des PQ-Pools geschuldet, welche sich in dem Term  $(1-qp)$  widerspiegelt (SETLIK et al., 1990) und auf photoinhibitorische Bedingungen verweist (BJÖRKMAN, 1987; KRAUSE UND WEIS, 1991). Bei den carotinoidverarmten Zellen war die Löschung der Grundfluoreszenz nahezu vollständig unterdrückt. Durch die Carotinoidverarmung kommt es in *Euglena gracilis* zum Verlust eines Pigment-Proteinkomplexes, welcher als peripherer LHC II identifiziert wurde, was das Ausbleiben eines fluoreszenzlöschenden Mechanismus zur Konsequenz hatte, welcher neben Fm auch Fo quencht.

Nach 20 minütiger Belichtung unbehandelter Zellen mit 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  war die Löschung von Fo im Vergleich zu der von Fm geringer als bei den anderen untersuchten Lichtintensitäten. Die gleichzeitige Reduktion der photosynthetischen Sauerstoffproduktion bei der Belichtung mit der hohen Lichtintensität läßt auf die Zunahme von photoinhibitorischen Mechanismen schließen, welche hauptsächlich einen Quench der maximalen Fluoreszenz bewirken und zu einer Zunahme der Grundfluoreszenz führen (BJÖRKMAN, 1987). Photoinhibierung kann zwei unterschiedliche Schritte der Inaktivierung zur Folge haben: eine reversible Inaktivierung bei welcher keine Schädigung des PS II auftritt (LEITSCH et al., 1994; JAHNS UND MIEHE 1996) und eine Inaktivierung des Photosyntheseapparates, welche mit einem D1-Protein Abbau einher geht.

Die 20 minütige Belichtung von unbehandelten *Euglena*-Zellen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten führte zu keinem beobachtbaren Abbau des D1-Proteins.

Die Abnahme von qP schon bei geringen Lichtintensitäten verdeutlicht, daß absorbierte Energie sogar unterhalb der Lichtsättigung auch über andere Wege als der des photochemischen Umsatzes dissipiert wird. Weiterhin weist die Abnahme von qP auf das Schließen der RC II hin, welches auf die  $Q_A$ -Reduktion zurückzuführen ist (DAU 1994a). Der Einsatz von Lichtstreß ist durch eine signifikante Reduktion von qP charakterisiert, wobei ein Wert für  $qP < 0,6$  Lichtstreßbedingungen verdeutlicht (ÖQUIST et al., 1992). Die Belichtung mit Intensitäten oberhalb der Lichtsättigung, aber auch schon eine 20 minütige Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  führte bei unseren Untersuchungen an *Euglena gracilis* zur Reduktion des photochemischen Quench ( $< 0,6$ ). Eine Abnahme der Sauerstoffentwicklung war bei der Belichtung mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  jedoch noch nicht zu beobachten und trat erst bei 20 minütiger Belichtung mit  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  ein. Neben der Reduzierung von qP spricht die nicht vollständige Wiederherstellung der Quantenausbeute des PS II nach dem „recovery“ für das Auftreten photoinhibitorischer Prozesse ab der Belichtung mit einer Intensität von  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (20 min). Der Quench der Chlorophyllfluoreszenz durch Photosynthese (qP) ist bei den carotinoidverarmten Zellen ab einer Belichtung mit  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  bei annähernd gleicher Quantenausbeute größer als bei der unbehandelten Kontrolle. Dies kann als Indiz gewertet werden, daß bei den unbehandelten Zellen die Zunahme der absorbierten Lichtenergie verstärkt über andere Kanäle als die photochemische Nutzung dissipiert wird oder die Energie durch eine hohe Fluoreszenzemission (Fs) abgeleitet wird.

Für die Reduzierung der Quantenausbeute des PS II werden oft photoinhibitorische Prozesse verantwortlich gemacht. Der Abfall des Quotienten unter Starklicht verhält sich quasi linear zur sinkenden PS II-Kapazität (GIERSCH UND KRAUSE, 1991; KRAUSE UND WEIS, 1991). Demgegenüber wird argumentiert, daß die Abnahme von  $F_v/F_m$  nicht auf der Schädigung der RC II beruht, sondern als Resultat protektiver Energiedissipation anzusehen ist (DEMMIG-ADAMS UND ADAMS III., 1996). Die Belichtung von *Euglena gracilis* führt zum Sinken der effektiven und maximalen Quantenausbeute, welche nach Belichtung mit Schwachlicht ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) unter FR-Licht vollständig wiederhergestellt wird. Der nach Belichtung mit unterschiedlichen Intensitäten unter FR erholbare Anteil von  $F_v/F_m$  muß als Indiz der Verringerung der Quantenausbeute des PS II durch photoprotektive Mechanismen gewertet werden.

Im Gegensatz zu anderen Algen und höheren Pflanzen konnte der Hauptanteil des nichtphotochemischen Quench bei einer Belichtung der unbehandelten Zellen mit größeren Intensitäten als  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  nicht durch einen Entkoppler beeinflußt werden und schien damit zum größten Teil unabhängig von einer Ansäuerung des Thylakoidlumens zu sein. Demgegenüber stehen die carotinoidverarmten Zellen, welche bei allen Belichtungsbedingungen einen deutlich höheren  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Anteil des nichtphotochemischen Quench im Vergleich zu unbehandelten Zellen besaßen. Bei der 20minütigen Belichtung carotinoidverarmter Zellen mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  waren 78,8% der Löschung von  $F_m$  vom Aufbau eines  $\Delta\text{pH}$ -Gradienten abhängig. Allgemein wird angenommen, daß der Hauptanteil des nichtphotochemischen Quench über den Aufbau eines  $\Delta\text{pH}$ -Gradienten reguliert wird (BRIANTAIS et al., 1979; KRAUSE UND WEIS, 1991; HORTON et al., 1996).

Die deutliche Verminderung des oligomeren (trimeren) LHC II bei unbehandelten Zellen bzw. sogar einen nahezu vollständigen Verlust dieses Komplexes bei carotinoidverarmten Zellen im Vergleich zu höheren Pflanzen (DREYFUSS UND THORNER, 1994; LEE UND THORNER, 1995) läßt vermuten, daß der von einer Ansäuerung des Thylakoidlumens abhängige Anteil von qN, welcher z.T. an die Existenz von trimeren LHC II gebunden ist (HORTON et al., 1994; LOKSTEIN

et al., 1993, 1994; BRITANTAIS, 1994; JAHNS UND KRAUSE, 1994; HÄRTEL UND LOKSTEIN, 1995), in *Euglena gracilis* reduziert oder nicht vorhanden ist. JAHNS UND KRAUSE (1994) konnten zeigen, daß in IML-Pflanzen, in welchen der LHC II reduziert (der trimere LHC II fehlt vollständig) der Anteil von qE verringert ist. Wie schon diskutiert, wird durch eine Reihe weiterer Arbeiten (LEVERENZ et al., 1992; LOKSTEIN et al., 1993; 1994; HÄRTEL et al., 1996) eine Reduzierung des  $\Delta$ pH-abhängigen Quench in Chl b-Mutanten der Gerste im Vergleich zum Wildtyp beschrieben. Diese Mutanten besitzen keinen trimeren LHC II (Lhcb1, Lhcb2), jedoch die monomeren LHC II (Lhcb3-6) (PETER UND THORNER, 1991; HARRISON et al., 1993; JANNSON, 1994; PREISS UND THORNER, 1995), was die Bedeutung des trimeren LHC II für einen effektiven  $\Delta$ pH-abhängigen Quench (qE) unterstreicht. Weiterhin wird der qE-Anteil der nichtphotochemischen Löschung in Abhängigkeit von dem  $\Delta$ pH-regulierten Xanthophyllzyklus betrachtet (GILMORE UND YAMAMOTO, 1991; GILMORE et al., 1994), was für *Euglena gracilis* aufgrund des Fehlens eines Xanthophyllzyklus nicht möglich ist. Der hohe Anteil von qE am nichtphotochemischen Quench der Chlorophyllfluoreszenz bei carotinoidverarmten Zellen muß als unabhängig vom LHC II angesehen werden.

GENTY et al. (1989) erörtern den linearen Zusammenhang zwischen dem Ertrag der CO<sub>2</sub>-Fixierung und dem Fluoreszenzparameter  $\Phi_P$  (aktuelle Quantenausbeute des PS II), HEINZE et al. (1995) konnte diesen Zusammenhang zwischen der atemungskorrigierten Sauerstoffentwicklung bezogen auf die Lichtintensität ( $\Phi_{OX}$ : effektiver photochemische Ertrag) und  $\Phi_P$  in der Grünalge *Scenedesmus* darstellen. Auch für die unbehandelten Zellen von *Euglena gracilis* war dieser Zusammenhang gegeben. Im Gegensatz dazu konnte bei den carotinoidverarmten Zellen keine lineare Beziehung dieser Größen ermittelt werden. Abweichungen von der linearen Beziehung zwischen  $\Phi_P$  und  $\Phi_{OX}$  können durch einen zyklischen Elektronentransport um das PS II (FALKOWSKI et al., 1986 a,b; PRASIL et al. 1996), wie auch durch das Vorhandensein von Q<sub>B</sub>-nichtreduzierenden RC II (GOVINDJEE, 1990; KARUKSTIS, 1992) verursacht sein. HORMANN et al. (1994) beobachten den Verlust der Linearität zwischen  $\Phi_P$  und  $\Phi_{OX}$  in Thylakoiden von Spinat, was er auf eine Involvierung inaktiver PS II, welche sich durch einen ineffizienten Elektronentransport zwischen Q<sub>A</sub> und Q<sub>B</sub> auszeichnen, zurückführte. Ein zyklischer Elektronentransport um das PS II oder eine Beeinflussung von Redoxprozessen an der Akzeptorseite des PS II werden als Ursachen eines  $\Delta$ pH-abhängigen Quench der Fluoreszenz durch das Reaktionszentrum angesehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, daß die bei *Euglena gracilis* auftretende  $\Delta$ pH-abhängige Löschung der Fluoreszenz einen Quench durch das RC II darstellt. Durch die Carotinoidverarmung wird in *Euglena gracilis* eine nahezu vollständige Reduzierung des oligomeren LHC II ausgelöst, was notwendigerweise dann auch zu einem Verlust der an diesen Komplex gebundenen photoprotektiven Mechanismen führt. Im Unterschied zu unbehandelten Zellen ist in carotinoidverarmten daher der  $\Delta$ pH-abhängige Quench der Chlorophyllfluoreszenz im RC II dominierend. Untermauert wird dieses Ergebnis durch den beinahe vollständigen Verlust des Quench der Grundfluoreszenz (F<sub>o</sub>) als Folge der Carotinoidverarmung. Somit kann angenommen werden, daß qE in *Euglena gracilis* offenbar nicht zu einem Quench der Grundfluoreszenz führt. DELPHIN et al. (1996) untersuchten den  $\Delta$ pH-abhängigen Quench in *Rhodella violacea* (Rotalge) und ordneten aufgrund des fehlenden Quench von F<sub>o</sub> diesen dem Reaktionszentrum zu. Die lichtinduzierte Zunahme der Rate der strahlungslosen Energieabgabe kann durch Ansäuerung des Chloroplastenlumens während der Photosynthese (KRIEGER et al., 1992), aber auch durch die Modifizierung von Reaktionszentren (WEIS UND BERRY, 1987) zu einem Quench von

Fm unabhängig von Fo führen. OLAIZOLA UND YAMAMOTO (1994) konnten eine lineare Regression zwischen der Zunahme von  $SV_0$  und dem Diatoxanthingehalt in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) nachweisen und vermuten die Ursache des Quench von Fo in der thermalen Energiedissipation aufgrund des Diadinoxanthinzyklus innerhalb der Antennen.

Unabhängig von einem  $\Delta pH$ -Gradienten können „state transitions“ die Löschung der Fluoreszenz bei höheren Pflanzen und Algen bewirken. Diese dienen der Vermeidung der Inbalance der Elektronentransportrate zwischen PS II und PS I oder der Balancierung der ATP und NADPH Produktion (BLUTÉ et al., 1990). WALTERS UND HORTON (1991) konnten maximale Phosphorylierung der LHC II nur bei schwachen Lichtintensitäten beobachten und argumentierten, daß „state transitions“ unter Bedingungen, welche qE oder qI Mechanismen auslösen, unterdrückt werden. ALLEN (1992, 1995) beschreibt die Redoxkontrolle des Phosphatase/Kinase-System wobei ein bestimmter Reduktionsgrad des Plastochinon-Pools die Phosphorylierung von LHC-Proteinen durch Kinase verursacht. Damit ist die Möglichkeit für den Übergang in „state 2“ gegeben. Umgekehrt wird die Phosphatase durch die Oxidierung des PQ-Pools aktiviert. Die Proteine werden dephosphoryliert und „state 1“ liegt vor. In Anwesenheit eines Phosphataseinhibitors (NaF) wird der Übergang von „state 2“ zu „state 1“ verhindert, indem die Dephosphorylierung der LHC II verhindert wird (CANAAANI et al., 1984). So bleibt der quenchende Zustand erhalten.

Der Einsatz eines Phosphataseinhibitors (NaF) sollte klären, ob der  $\Delta pH$ -unabhängige Anteil der Fluoreszenzlöschung von der Aktivität eines Kinase/Phosphatase-Systems abhängig war und somit möglicherweise durch „state transitions“ zu erklären ist. Die Erholung der nichtphotochemischen Löschung unter FR-Licht war durch NaF beeinflussbar. Nur 22% von Fm relaxierten in Anwesenheit des Inhibitors. Die Involvierung eines Kinase/Phosphatase-Systems innerhalb der quenchenden Mechanismen scheint wahrscheinlich. Das Vorhandensein von „state transitions“ würde den unabhängig von einem Protonengradienten auftretenden Quench bei  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  erklären. Für Grünalgen konnte eine nahezu 30%ige Reduktion der PS II Fluoreszenzemission durch „state transitions“ gezeigt werden (HARRISON UND ALLEN, 1993). Auch konnten WINTER UND BRANDT (1986) die Mobilität von neu synthetisiertem LHC II während des Zellzyklus in *Euglena gracilis* nachweisen.

Neben der, vom Reduktionsgrad des PQ-Pools abhängigen, Phosphorylierung des LHC II, werden bei höheren Pflanzen auch das CP43, D1 und D2-Protein phosphoryliert (PURSIHEIMO et al., 1998). Die Stabilität der PS II-Dimere wird möglicherweise über eine reversible Phosphorylierung der PS II-core Proteine reguliert (KRUSE et al., 1997). DELRIEU (1998) beschreibt einen Quench der Fluoreszenz durch eine Veränderung der Organisation der PS II-Zentren, welche möglicherweise eine Umwandlung von PS II Dimeren in PS II Monomere sein könnte. Damit soll angedeutet werden, daß der Einfluß von NaF auf das „recovery“ der maximalen Fluoreszenz auch anderen Prozessen geschuldet sein könnte. Für eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse bei NaF-Hemmung plädierten auch LOKSTEIN et al. (1993), welche in einer Chl b-Mutante von *Hordeum vulgare*, trotz des Nichtvorhandenseins von trimeren LHC II, Effekte von NaF messen konnten. Neben der Wirkung auf qT konnten sie eine Beeinflussung von  $qN_f$  und der Sauerstoffentwicklung beobachten. Die Beeinträchtigung der Photosynthese durch Fluoride ist auch von QUICK et al. (1989) beschrieben. Obwohl der Einfluß von NaF auf die Erholung von Fm das Auftreten von „state transitions“ wahrscheinlich machte, zeigen jedoch die Ergebnisse zur Dunkelinkubation (siehe: Analyse des „recovery“) sowie der Einfluß der Belichtung auf das

Fluoreszenzemissionsspektrum, daß der  $\Delta\text{pH}$ -unabhängige Quench der Chlorophyllfluoreszenz nicht durch „state transitions“ im herkömmlichen Sinne zu erklären ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Belichtung von *Euglena gracilis* zu einem Quench der Chlorophyllfluoreszenz führt, welcher bei Intensitäten im Bereich der Lichtsättigung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung und darüber zum großen Teil unabhängig von einem  $\Delta\text{pH}$ -Gradienten ist. Die Carotinoidverarmung führt zur Reduzierung von  $\text{SV}_m$  und zum Verlust von Mechanismen, welche einen  $\Delta\text{pH}$ -unabhängigen Quench der Fluoreszenz bewirken. Diese spiegelt sich in der Dominanz des  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Quench der Chlorophyllfluoreszenz sowie im geringeren Quench von  $F_0$  im Vergleich zur unbehandelten Zelle wider.

### Analyse des „recovery“

Die Analyse der Relaxation der maximalen Fluoreszenz nach Belichtung ergab 3 kinetisch unterschiedliche Phasen, wie dies auch für höhere Pflanzen beschrieben ist (QUICK UND STITT, 1989; KRAUSE UND WEIS, 1991; WALTERS UND HORTON, 1991). Ein deutlicher Unterschied hierzu war jedoch eine abweichende HWZ für diese schnelle Relaxationsphase ( $qN_f$ ). Während bei höheren Pflanzen eine HWZ von 30s-60s für die schnelle Relaxation der Fluoreszenzlöschung, welche nahezu vollständig durch einen  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen Quench verursacht wurde, beschrieben wurde, war die HWZ für die schnelle Phase der Relaxation der maximalen Fluoreszenz bei *Euglena* deutlich verlängert. Dieser Effekt tritt auch bei IML-Pflanzen von *Pisum sativum* auf (JAHNS UND KRAUSE, 1994), welche keinen trimeren LHC II besitzen und auch eine starke Reduzierung der anderen Antennenproteine aufweisen. Die HWZ von  $qE$  verlängerte sich dabei von 50-90 s der Kontrollpflanzen auf 120-180 s bei den IML-Pflanzen. Somit, argumentieren die Autoren, kann angenommen werden, daß der noch auftretende  $qE$  der IML-Pflanzen, mit einer verlängerten HWZ der Relaxation der Fluoreszenz, unabhängig von einer strukturellen Änderung der PS II Antennen sein muß (HORTON et al., 1991). In diesem Zusammenhang spekulieren die Autoren über die Möglichkeit quencher Mechanismen innerhalb des RC II. In einem nachfolgenden Artikel wird darüber hinaus die Abhängigkeit des in IML-Pflanzen auftretenden  $qE$  vom Zeaxanthingehalt beschrieben (JAHNS UND SCHWEIG, 1995).

Damit ergab sich bei *Euglena gracilis* ein deutlicher Unterschied im kinetischen Verlauf der Relaxation der zur Löschung der Fluoreszenz führenden Mechanismen gegenüber den höheren Pflanzen (QUICK UND STITT, 1989; WALTERS UND HORTON, 1991; KRAUSE UND WEIS, 1991). Bei Grünalgen und höheren Pflanzen wird angenommen, daß der schnell relaxierende und  $\Delta\text{pH}$ -abhängige Quench durch Energiedissipation innerhalb des LHC II entsteht (HORTON et al., 1991, 1994, 1996; BILGER et al., 1989; DEMMIG-ADAMS, 1990; GILMORE UND YAMAMOTO, 1991; DEMMIG-ADAMS UND ADAMS III, 1996; GILMORE, 1997). Durch das Fehlen eines Carotinoidzyklus und durch die Reduktion des oligomeren LHC im Vergleich zu höheren Pflanzen sind in *Euglena* zwei für diese Prozesse notwendige Komponenten nicht vorhanden bzw. reduziert. Die Verschiebung der HWZ der Relaxation des  $\Delta\text{pH}$ -abhängigen schnellen Anteils des Fluoreszenzquenches unterstreicht noch einmal das Vorhandensein anderer Mechanismen bei *Euglena gracilis* im Vergleich zu Organismen mit beschriebenem Fluoreszenzquench innerhalb der Antennen. Der  $\Delta\text{pH}$ -abhängige Anteil des nichtphotochemischen Quench in *Euglena gracilis* muß daher durch einen Quench des RC II ausgelöst werden.

Wie schon angesprochen, unterscheidet sich die HWZ der schnellen Relaxationsphase von  $F_m$  ( $qN_f$ ) der unbehandelten wie auch der carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* von

denen für andere Organismen beschrieben und erscheint deutlich verlangsamt. Eine graphische Auftragung des  $q_{ESV}$  beider Zellkulturen in Abhängigkeit der HWZ des „recovery“ des nicht-photochemischen Quench ergab für die Annahme 100%  $q_{ESV}$  eine HWZ von 2,9 min für beide Zellkulturen. Aufgrund dessen wird vermutet, daß  $q_{ESV}$  auf die gleichen Mechanismen bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen zurückzuführen ist. In Zusammenfassung der bisher diskutierten Fakten werden quenchende Mechanismen innerhalb des RC II (KRIEGER et al., 1992) für den  $\Delta pH$ -abhängigen Anteil angenommen.

Der bei unbehandelten Zellen auftretende Quench von  $F_0$  wird folglich der mittleren Phase des Fluoreszenzquenches (HWZ des „recovery“ 6,5-7,5 min) zugeschrieben. Dieser mittlere Teil der Relaxationskinetik besitzt eine HWZ, welche der für „state transitions“ beschriebenen entspricht (QUICK UND STITT, 1989; KRAUSE UND WEIS, 1991; WALTERS UND HORTON, 1991; JAHNS UND KRAUSE, 1994; LOKSTEIN et al., 1994). Bei den carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* konnte diese mittlere Phase der Relaxation der Chlorophyllfluoreszenz nicht nachgewiesen werden. Die Carotinoidverarmung führte zum Verlust des oligomeren LHC, somit scheint diese mittlere, nicht von einem Protonengradienten abhängige Phase an die Existenz von oligomerem LHC gebunden zu sein. Aggregationsmechanismen des LHC II (HORTON et al., 1991) können aufgrund der Unabhängigkeit vom Protonengradienten für diesen Anteil am nicht-photochemischen Quench ausgeschlossen werden.

Die Interpretation der mittleren Phase bereitet Schwierigkeiten. Generell wird  $q_{N_m}$  auf das Vorhandensein von „state transitions“ zurückgeführt (QUICK UND STITT, 1989). Horton und Mitarbeiter (HORTON et al., 1988; WALTERS UND HORTON, 1991, 1993) argumentierten, daß „state transitions“, wie schon diskutiert, nur unter Schwachlichtbedingungen relevant sind. Dem gegenüber steht das gemessene Vorhandensein eines  $q_{N_m}$  auch bei höheren Belichtungsbedingungen, ja sogar die Zunahme dieses Anteils mit steigender Belichtungsintensität bei *Euglena gracilis*. Ähnliches wurde bei anderen Objekten von WALTERS UND HORTON (1991) sowie LOKSTEIN et al. (1994) beobachtet.

Wie schon diskutiert, weist auch die Beeinflussung des „recovery“ durch NaF auf das Vorhandensein eines Mechanismus hin, bei welchem eine Phosphorylierung von Proteinen zu einer Löschung der Fluoreszenz führt.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen ergab sich bei der Analyse der Relaxationsdaten der maximalen Fluoreszenz. Generell zeichneten sich die carotinoidverarmten Zellen durch eine schnellere Relaxation von  $F_m$  nach der Belichtung gegenüber den unbehandelten Zellen aus. In Anbetracht der höheren Anteile von  $q_{ESV}$  am nichtphotochemischen Quench carotinoidverarmter Zellen ist dieses verständlich. Nach der Auflösung der kinetisch unterschiedlichen Phasen des „recovery“ der Fluoreszenz nach QUICK UND STITT (1989) konnten in carotinoidverarmten Zellen nur zwei unterschiedlich schnell relaxierende Prozesse voneinander getrennt werden. Die Carotinoidverarmung führte zum Verlust der mittleren Phase der Erholung von  $F_m$  ( $q_{N_m}$ ), für welche im allgemeinen „state transitions“ als auslösende Prozesse ( $q_T$ ) verantwortlich gemacht werden (QUICK UND STITT, 1989; WALTERS UND HORTON, 1991; JAHNS UND KRAUSE, 1994; LOKSTEIN et al. 1994). Der Verlust von „state transitions“ der Chl b-Mutante von *Hordeum vulgare* wurde von LOKSTEIN et al. (1994) demonstriert. JAHNS UND KRAUSE (1994) wiesen neben der Reduzierung des  $q_E$  den Verlust von  $q_T$  in IML-Pflanzen von *Pisum sativum* nach. Wie die Trennung der Pigment-Proteinkomplexe bei *Euglena gracilis* ergab, verursachte die Carotinoidverarmung den nahezu

vollständigen Verlust des peripheren LHC II sowie der Bande 3, einem Komplex aus LHC I und LHC II. Der mittlere Teil ( $qN_m$ ) scheint an die Existenz dieser gebunden.

Eine dritte Phase der Relaxationskinetik ergab einen Anteil des nichtphotochemischen Quench mit einer HWZ über 30 min und kann somit dem Vorhandensein photoinhibitorischer Prozesse zugeschrieben werden. Diese photoinhibitorische Löschung der Fluoreszenz wird allgemein dem PS II-core zugeschrieben, jedoch scheint ein Teil von  $qI$  in den Antennen lokalisiert (RUBAN UND HORTON, 1995a). Eine Zeaxanthinanreicherung im Lhcb4 oder im PS II-core Komplex scheint für diese Prozesse bei höheren Pflanzen verantwortlich zu sein (FÄRBER et al., 1997). Zeaxanthin kommt in *Euglena gracilis* nicht vor. Nach 20 min Belichtung konnte eine geringe Erhöhung des Diadinoxanthins gemessen werden, jedoch könnte über eine photoprotektive Rolle dieses Pigments innerhalb photoinhibitorischer Prozesse nur spekuliert werden. BAROLI UND MELIS (1998) publizierten, daß aller Wahrscheinlichkeit nach, die Photoinhibierung des PS II vom Redoxstatus des primären Akzeptors  $Q_A$  abhängig ist. Dieser Redoxzustand wird durch die Lichtabsorption, welche durch die Größe der Antennen bestimmt wird, moduliert. Wie durch den Term  $(1-qp)$  gezeigt werden konnte, ist  $Q_A$  in unbehandelten Zellen stärker reduziert. Schon die 20minütige Belichtung der unterschiedlichen Algensuspensionen mit  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  induzierte einen Quench der Chlorophyllfluoreszenz durch photoinhibitorische Prozesse. Dieser war bei unbehandelten Zellen im Vergleich zu den carotinoidverarmten unter diesen Bedingungen erhöht. Klar wird dieses, wenn man bedenkt, daß die Belichtung mit einer Intensität von  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  bei unbehandelten Zellen nahe des errechneten Lichtsättigungs-Parameters lag. Bei den carotinoidverarmten Zellen wurde dieser erst bei  $524 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  erreicht.

Weiterhin könnte aber auch die Verringerung der Antennenkomplexe durch Carotinoidverarmung zum Verlust protektiver photoinhibitorischer Prozesse führen, für welche eine HWZ von 16 min beschrieben wurde (HIDEG UND MURATA, 1997). Somit könnte es zu einem geringeren  $qI$  bei der Belichtung  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  carotinoidverarmter Zellen kommen. Thermale Energiedissipation der Antennen oder des RC II (BJÖRKMAN, 1987; KRAUSE UND WEIS, 1991), bei der möglicherweise Carotinoide in die Energiedissipation involviert sind (JAHNS UND MIEHE, 1995; UHRMACHER et al., 1995; DEMMIG-ADAMS et al., 1998; DEPKA et al., 1998) oder die Reduzierung der Lichtsammelfunktion der Carotinoide bei exzessivem Licht (HAVAUX et al., 1998) werden gerade in letzter Zeit als Bestandteil von  $qI$  diskutiert. Betrachtet man  $qI$  also als regulatorischen photoprotektiven Mechanismus, so könnte durch Reduzierung einzelner Pigment-Proteinkomplexe der carotinoidverarmten Algen der photoprotektive Anteil photoinhibitorischer Prozesse in diesen Algen im Vergleich zur Kontrolle ausgeschaltet oder reduziert sein.

Anhand der bisher diskutierten Ergebnisse läßt sich die nichtphotochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz der Alge *Euglena gracilis* wie folgt charakterisieren: Die Belichtung mit Intensitäten im Bereich der Lichtsättigung führt zu einem Quench der Fluoreszenz, welcher sich in drei distinkte Phasen gliedert. Ein  $\Delta\text{pH}$ -abhängiger Anteil, welcher die schnellste HWZ des „recovery“ aufweist. Die HWZ dieser Phase der Relaxation von  $F_m$  ist jedoch deutlich gegenüber der höherer Pflanzen verlangsamt und wird dem RC II zugeordnet. Als zweites tritt ein  $\Delta\text{pH}$ -unabhängiger Quench auf, welcher wahrscheinlich auf Phosphorylierungsprozessen einzelner Pigment-Proteinkomplexe beruht, die zur Energiebalance beider Photosysteme beitragen, jedoch wahrscheinlich nicht durch „state transitions“ im herkömmlichen Sinne zu erklären ist. Die dritte Phase ist von photoinhibitorischen Bedingungen abhängig und steigt mit zunehmender Belichtungsintensität.

## Der dunkelinduzierte Quench der Chlorophyll a-Fluoreszenz

Die Dunkelinkubation von *Euglena gracilis* führte zu einer nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz. Dieses Phänomen ist für verschiedene Algen beschrieben worden (WILHELM et al., 1989; TING UND OWENS, 1993; SCHREIBER et al., 1995; CASPER-LINDLEY UND BJÖRKMAN, 1996; ENDO UND ASADA, 1996).

Ein respiratorischer Elektronentransport in Chloroplasten, bekannt als Chlororespiration, (BENNOUN, 1982) wurde für Algen (PELITIER et al., 1987, 1995; CARON et al., 1987; WILHELM UND DUVAL, 1990; TING UND OWENS 1993) und für höhere Pflanzen (GARAB, et al. 1989; CORNEILLE et al., 1998; FEILD et al., 1998) publiziert. Durch den chlororespiratorischen Elektronenfluß, vom NAD(P)H über den PQ-Pool zum Sauerstoff als Elektronenakzeptor, wird ein  $\Delta$ pH-Gradient in den Thylakoidmembranen aufgebaut (WILHELM UND DUVAL, 1990; TING UND OWENS, 1993), Dieser kann zum Einsatz von fluoreszenzlöschenden Prozessen führen (WILHELM UND DUVAL, 1990; TING UND OWENS, 1993; ENDO UND ASADA, 1996). Anhand des Vorhandensein eines  $\Delta$ pH-Gradienten im Dunkeln kann ein chlororespiratorischer Elektronenfluß in *Euglena gracilis* angenommen werden.

Die Zunahme des Reduktionsgrades des PQ-Pools durch chlororespiratorische Aktivität kann weiterhin zum Auslösen von redoxregulierten „state transitions“ führen, welche auch einen Quench der Chlorophyllfluoreszenz induzieren (CASPER-LINDLEY UND BJÖRKMAN, 1996; ENDO UND ASADA, 1996). BÜCHEL UND WILHELM (1990a,b) konnten zwei unterschiedliche Zustände der Thylakoidmembran hinsichtlich der Absorptionskapazität des PS II, des Reduktionsgrades des PQ-Pools und des Vorkommens von Chlororespiration von *Pleurochloris meiringensis* in Abhängigkeit einer Vorbelichtung oder Dunkelinkubation charakterisieren und somit annehmen, daß diese Alge auch im Dunkeln eine Energiekontrolle in den Chloroplasten besitzt. Eine Zunahme der maximalen Fluoreszenz und der Grundfluoreszenz bei Belichtung sowie der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung von dunkeladaptierten Pflanzen konnte von DAU UND CANAANI (1989,1992) beschrieben werden. In Gegenwart von NaF wird dieser Effekt verhindert und tritt auch in Chl b-Mutanten nicht auf. Im Gegensatz dazu hat Nigericin keinen Einfluß auf diese Zunahme. Erklärt wird diese Beobachtung mit einer Dephosphorylierung des trimeren LHC II und der damit verbundenen Übergang dieses Komplexes an das PS II.

Der durch Dunkelheit induzierte Quench in *Euglena gracilis* war, ebenso wie bei *Dunaliella* bzw. *Chlamydomonas* beschrieben (CASPER-LINDLEY UND BJÖRKMANN, 1996; ENDO UND ASADA, 1996), jedoch nur zu einem geringen Anteil von der Wirkung eines Entkopplers (Nigericin) abhängig und somit zum größten Teil unabhängig von der Existenz eines  $\Delta$ pH-Gradienten.

Durch FR-Licht konnte der dunkelinduzierte Quench der Fluoreszenz bei *Euglena gracilis* unterdrückt werden. Die alleinige Anregung des PS I durch Rotlicht (FR) führt zur Oxidation des P700 und somit auch zur Oxidation des PQ-Pools. So kann zum einen der „state 1“ der redoxregulierten „state transitions“ induziert werden, zum anderen auch die Chlororespiration inhibiert werden. Beide Effekte könnten zu einem nicht gequenchten Zustand der Thylakoidmembranen führen.

Ebenso wie das „recovery“ des lichtinduzierten Quench war auch die Relaxation von Fm nach der Dunkelinkubation durch den Phosphataseinhibitor NaF sehr stark inhibiert. Aufgrund der Beeinflussung des Dunkelquenches durch FR-Licht (Oxydierung des PQ-Pool) sowie des Effektes von NaF auf das Recovery vom Dunkelquench könnte angenommen werden, daß eine Phosphorylierung von Proteinen für diesen Quench notwendig ist.

Wichtig ist anzumerken, daß der durch Dunkelheit induzierte Quench der Chlorophyllfluoreszenz in *Euglena gracilis* im Gegensatz zu dem bei *Chlamydomonas reinhardtii* beschriebenen (DELOSME et al., 1996) unter anaeroben Bedingungen nicht vorhanden ist (TSCHIERSCHE: persönliche Mitteilung). DELMROSE et al. (1996) induziert mit anaeroben Bedingungen einen stark reduzierten PQ-Pool und somit den „state 2“, also den gequenchten Zustand, der beschriebenen „state transitions“ (WILLIAMS UND ALLEN, 1987; ALLEN, 1995). Anaerobiose führt bei dunkeladaptierten *Euglena*-Zellen zu einer drastischen Fo-Erhöhung, welche eine hohe bis vollständige Reduktion des PQ-Pools widerspiegelt (TSCHIERSCHE: persönliche Mitteilung). Sollten in *Euglena gracilis* über den Reduktionsstatus des PQ-Pools regulierte „state transitions“ auftreten, so müßte es zu einer Löschung der Chlorophyll a-Fluoreszenz auch unter anaeroben Bedingungen kommen. Dieses konnte nicht beobachtet werden. Neben der Chlororespiration muß somit ein anderer  $\Delta$ pH-unabhängiger Mechanismus zum Quench der Fluoreszenz von dunkeladaptierten *Euglena gracilis* führen. Dieses wird von den Ergebnissen der dunkelinkubierten carotinoidverarmten Zellen untermauert. Der in diesen Zellen vorhandene Dunkelquench war stärker als bei unbehandelten Zellen ausgeprägt. Die elektrophoretische Isolierung der Pigment-Proteinkomplexe ergab, daß die für „state transitions“ verantwortlichen Strukturen (peripherer LHC II) durch die Carotinoidverarmung vollständig reduziert waren und somit „state transitions“ nicht die Erklärung für den  $\Delta$ pH-unabhängigen Quench im Dunkeln abgeben können. Auch die Reduktion der PS II-Effizienz durch die Dunkelinkubation von *Euglena gracilis* macht das Vorhandensein von „state transitions“ als quencheden Mechanismus dieser Alge im Dunkeln unwahrscheinlich. Die PS II-Effizienz wird durch „state transitions“ nicht beeinflußt (CASPER-LINDLEY UND BJÖRKMAN, 1996). Somit wird trotz der Effekte von NaF die Beteiligung von „state transitions“ im herkömmlichen Sinne auch an dem durch Dunkelheit induzierten Quench ausgeschlossen.

### **Die Fluoreszenzemission der Zelle und der isolierten Pigment-Proteinkomplexe**

Um die Frage nach Vorhandensein von „state transitions“ näher zu untersuchen, wurde die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren bei 77 K gewählt. Zu unserer Überraschung erhielten wir ein Emissionsspektrum, bei dem die charakteristische PS II-Fluoreszenzemission im Gegensatz zu anderen Algen und höheren Pflanzen nahezu vollständig fehlte.

Es stellte sich die Frage, ob das abweichende Verhalten der PS II-Fluoreszenzemission bei RT auf Unterschiede im Vorhandensein der einzelnen Pigment-Proteinkomplexe in *Euglena gracilis* im Vergleich zu höheren Pflanzen (DREYFUSS UND THORNER, 1994) zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den Absorptionsspektren der ganzen Zelle war auch die Fluoreszenzemission bei RT in den Rotbereich des Spektrums verschoben und besaß ein Maximum bei 696-700 nm. Solch eine langwellige PS II-Emission wurde für eine Fluoreszenzemission aus dem PS II-core Komplex (D1, D2, CP43; CP47) (SIEFERMANN-HARMS, 1988; BARBATO et al., 1990) bzw. dem CP47 (ALFONSO et al., 1994; GROOT et al., 1995) beschrieben. Folgende Argumente sprechen gegen eine dominante PS II-core Fluoreszenz von *Euglena gracilis*. Zum einen konnte für den isolierten PS II-core Komplex (Bande 2) ein Maximum der Fluoreszenzemission bei 683 nm (RT) gemessen werden. Andererseits emittierte die Bande 3 (Komplex aus LHC I + LHC II) bei RT langwellige Fluoreszenz (695 nm). In dieser konnten keine Proteine des RC II nachgewiesen werden.

Eine Reihe von Studien ergaben, daß eine reversible Aggregation des LHC II qE induziert (HORTON et al., 1991, 1994; BARZDA et al., 1996 a,b). Die Abnahme der Fluoreszenz und das

Auftauchen einer langwelligen Komponente im Fluoreszenz-emissions- und Absorptionsspektrum konnte durch die Aggregation von LHC II (in vitro) erklärt werden (BARZDA et al., 1996). Ein Emissionspeak (77K) bei 700 nm in vitro und in intakten PS II (RUBAN UND HORTON, 1992, 1994) konnte im gequenchten Zustand beobachtet werden. Bei Raumtemperatur ist dieser Peak sehr niedrig, steigt aber mit zunehmender Abkühlung (RUBAN UND HORTON, 1992). VASIL'EV et al. (1997) beschrieben die Abhängigkeit der spektralen Eigenschaften und des Anregungszustandes der LHC Aggregate von der Lipidkomposition der Membran, den inneren Antennen sowie der Phosphorylierung der Proteine. Da eine Aggregation von Antennen als ein regulatorischer Prozeß, welcher über eine Protonierung vom LHC gesteuert wird (HORTON et al., 1991; RUBAN UND HORTON, 1992), beschrieben wurde sowie das Auftreten der langwelligen Komponente erst bei tiefen Temperaturen zu beobachten ist, wird angenommen, daß die Verschiebung der RT-Fluoreszenz-emission von *Euglena gracilis* nicht auf einer Aggregation des LHC II beruht.

Die Analyse der Excitationspektren (77K) bei der Fluoreszenzdetektion von 685 nm bzw. 725 nm ergab eine deutlich höhere Beteiligung von Chl b und den Carotinoiden an der Energieübertragung für die Fluoreszenz-emission bei 725 nm im Vergleich zu der typischen PS II Emissionswellenlänge bei 685 nm. Der Hauptanteil des Chl b ist auch bei *Euglena gracilis* im LHC II gebunden (BRANDT UND WILHELM, 1990; CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986a), was sich auch in den Absorptionsspektren der isolierten Komplexe widerspiegelt. Folglich muß dieser Chl b bindende Komplex an der langwelligen Fluoreszenz-emission beteiligt sein.

Die Raumtemperaturfluoreszenz von *Euglena gracilis* ist variabel und kann durch DCMU vollständig induziert werden (Daten nicht gezeigt), was für die Fluoreszenz-emission des PS II typisch ist. Die Analyse der Fluoreszenzspektren (RT) in Form von weiteren Ableitungen bei Anwesenheit von DCMU ergab die Zunahme der 685 nm aber auch der langwelligen Banden bei 699 nm und 711 nm. Somit müssen diese Fluoreszenzemitter an das PS II gekoppelt sein. Außerdem finden sich in der Induktionskurve die typischen Phasen der Induktionskinetik wieder (TSCHIRSCH: persönliche Mitteilung). Diese Fakten heben klar hervor, daß die Fluoreszenz-emission bei 696-700 nm bei RT durch das PS II bestimmt ist. SCHILLER et al. (1998) untersuchten die Bindung längerwellig absorbierender Chl a-Moleküle ( $\lambda_{\text{Peak}} > 680 \text{ nm}$ ) innerhalb beider PS in Abhängigkeit vom Anzuchtlicht und legten Einflüsse dieser Komponenten auf die Fluoreszenz-emission dar. Die Isolierung der einzelnen Pigment-Proteinkomplexe von *Euglena gracilis* ergab eine Übereinstimmung der spektralen Eigenschaften dieser Komplexe mit denen für höhere Pflanzen beschriebenen. Eine Ausnahme bildet hier die Bande 3. Somit kann die abweichende Fluoreszenz-emission nicht durch veränderte spektrale Eigenschaften bekannter Pigment-Proteinkomplexe erklärt werden, wie dies z.B. durch erhöhte Anbindung längerwellig absorbierender Chl a-Moleküle im PS II der Fall wäre. Da die isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Alge *Euglena gracilis* in ihren spektralen Eigenschaften denen von Grünalgen und höheren Pflanzen entsprechen, wird angenommen, daß eine Kombination aus LHC I und LHC II Proteinen (Bande 3) für die Verschiebung der Fluoreszenz-emission verantwortlich ist. Unterstützt wird diese Annahme durch das Vorhandensein einer grünen Bande mit langwelliger Fluoreszenz-emission, welche den Fluoreszenzeigenschaften der ganzen Zelle gleicht. Charakteristisch war für diese Bande, daß bei 77K eine Verschiebung des Emissionsmaximums erfolgte, wie dies für das PS I typisch ist (CORCE et al., 1996). Weiterhin konnte nur in dieser Bande eine deutliche Schulter bei 690 nm im Absorptionsspektrum detektiert werden. Die langwellig absorbierenden und emittierenden Chl a-Moleküle werden hauptsächlich dem PS I zugeordnet (SCHILLER et al.,

1998), sind aber auch im PS II-core Komplex nachgewiesen (ZUCHELLI et al., 1990; JENNINGS et al., 1993).

Das Excitationsspektrum der Bande 3 bei 685 nm weist eine hohe Chl b-Anregung auf und ist dem des LHC II ähnlich. Neben dem immunologischen Nachweis von LHC II und LHC I weisen auch die spektralen Daten auf das Vorhandensein von Komponenten aus beiden Photosystemen hin.

Die Bedeutung der Bande 3 wird dadurch unterstrichen, daß diese Bande sowohl bei carotinoidverarmten wie bei autotroph gewachsenen Zellen trotz struktureller Unterschiede der Thylakoidmembranen isoliert werden konnte. Daneben ist diese Bande der einzige Komplex, welcher den Emissionseigenschaften der Zelle gleicht und im Vergleich zu den anderen Komponenten, bezogen auf den Chlorophyllgehalt, sehr stark fluoresziert. BROWN (1980) konnte anhand unterschiedlicher Methoden die Isolierung eines Pigment-Proteinkomplexes aus *Euglena gracilis* mit längerwelligen Fluoreszenzeigenschaften publizieren, diesem jedoch keine physiologische Relevanz zuordnen.

Die Carotinoidverarmung führt zu einer Veränderung der Fluoreszenzemission. Zum einen trat bei RT eine deutliche Schulter bei 683 nm sowie eine Abnahme der längerwelligen Komponenten auf. Das Maximum der Fluoreszenzemission (RT) ist in den kürzerwelligen Bereich verschoben. Zum anderen konnte unter Kühlung (77K) in diesen Zellen eine für das PS II charakteristische Fluoreszenzemission detektiert werden. Auch unter diesen Bedingungen wurde die Reduzierung der langwelligen Komponenten (713 nm) in der zweiten Ableitung deutlich. Die beobachtete Zunahme von kürzerwellig emittierenden (673 nm) Chl a-Molekülen ist auch von LEBEDEV et al. (1988) für mit Norflurazon behandelte Pflanzen (*Hordeum vulgare*) beschrieben. Die Reduzierung der Bande 3 und der nahezu vollständigen Verlust der Bande 4 durch Carotinoidverarmung hatten somit starke Einflüsse auf die Fluoreszenzemission der ganzen Zelle. Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Komplexe veränderten sich durch die Carotinoidverarmung nicht. Dies unterstreicht erneut die Verantwortlichkeit dieser Pigment-Proteinkomplexe für die Fluoreszenzemission der Zelle.

Ursprünglich sollten die Untersuchungen der Emissionsspektren Aussagen zum Vorkommen von „state transitions“ in *Euglena gracilis* liefern. Anhand der Ergebnisse kann klar gezeigt werden, daß „state transitions“ im herkömmlichen Sinne in *Euglena gracilis* aufgrund struktureller Besonderheiten des Photosyntheseapparates nicht auftreten. Jedoch scheint eine Regulation der Effizienz beider Photosysteme über einen möglicherweise von beiden Photosystemen nutzbaren Antennenkomplex realisiert. Dieses würde eine Mobilität von LHC II und LHC I Komponenten erfordern. Die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren (77K) nach Inkubation der unbehandelten Zellen unter FR-Licht, Dunkelheit bzw. moderatem weißem Licht (300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), welche unterschiedlich gequenchte Zustände der RT-Fluoreszenz bedingen, ergab eine geringe Verschiebung des Maximums in den kürzerwelligen Bereich unter FR-Licht. Dieses weist möglicherweise bereits auf eine Verschiebung der Energieübertragung einzelner Pigment-Proteinkomplexe an die Photosysteme hin. Die zweite Ableitung dieser Spektren machte eine Abnahme der bei 713 nm emittierenden Bande durch die Belichtung deutlich.

Bemerkenswert ist außerdem, daß die PS I Fluoreszenz von Algen allgemein als kürzerwellig (710nm-720nm) im Vergleich zu höheren Pflanzen beschrieben ist. Auch *Euglena* weist ein Emissionsmaximum (77K) bei 722 nm auf. Die Isolation des PS I Komplexes erbrachte dagegen ein Fluoreszenzmaximum bei 731 nm und ist damit mit höheren Pflanzen vergleichbar. Eine

Verschiebung der PS I Fluoreszenzemission von 735 nm beim Wildtyp in den kürzerwelligen Bereich (720 nm) bei der Chl b-Mutante (CD3) von *Triticum aestivum* wurde von FABEL et al. (1994) beschrieben. Allgemein wird die Fluoreszenzemission bei 720 nm den core-Antennen des PS I und die Emission bei 735 nm den LHC des PS I zugeordnet (ANDREEVA UND VELITCHKOVA, 1998; TURKONI et al., 1994). Für *Euglena gracilis* muß angenommen werden, daß die Fluoreszenzemission (77K) bei 720 nm möglicherweise aus der Überlagerung der PS I-Emission (735 nm) und der Fluoreszenzemission (711nm) eines aus LHC I und LHC II bestehenden Antennenkomplexes resultiert.

### **Besonderheiten des Photosyntheseapparates von *Euglena gracilis***

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Unterschiede im Fluoreszenzverhalten sowie in der Regulation der Energiedissipation von *Euglena gracilis* auf einer Modifikation des LHC der photosynthetischen Membranen beruhen.

Der Chloroplast von *Euglena gracilis* ist im Gegensatz zu dem der höheren Pflanzen von 3 Membranen umgeben und weist Unterschiede im Import von Proteinen des LHC im Vergleich zu Grünalgen und höheren Pflanzen auf. Er reflektiert somit Unterschiede in der Evolution der Chloroplasten im Vergleich zu den höheren Pflanzen (SULLI UND SCHWARTZBACH, 1996; SCHIFF et al., 1991). Generell konnten jedoch spezifische Antennen der unterschiedlichen Photosysteme ähnlich denen der Grünalgen und höheren Pflanzen beschrieben (CUNNINGHAM UND SCHIFF, 1986b; HOULNÉ UND SCHANTZ, 1988; MUCHAL UND SCHWARTZBACH, 1990; BRANDT UND WILHELM, 1990) sowie die Immunreaktionen mit Antikörpern aus höheren Pflanzen gezeigt werden (BRANDT UND WILHELM, 1990; PLUMLEY et al., 1993). Bei Einsatz unterschiedlicher Antikörper konnten wir in Übereinstimmung mit HOULNÉ UND SCHANTZ (1988); BRANDT UND WILHELM (1990); PLUMLEY et al. (1993) ein ca. 18-20 kDa Protein als LHC I identifizieren. Proteine mit höheren Molekulargewichten zeigten, abgesehen von bereits beschriebenen Kreuzreaktionen mit dem LHC II (HØYER-HANSEN et al., 1988; HOULNÉ UND SCHANTZ, 1988) mit unserem Antikörper keine Reaktion. Neben der Identifizierung des LHC I konnten wir Proteine im Bereich von 24-28 kDa als LHC II Komponenten nachweisen. Damit befinden wir uns in Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Autoren, welche durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper entsprechende Proteine als LHC II beschreiben konnten. Wichtig erscheint uns ferner festzuhalten, daß die Aminosäuresequenz der LHC II Proteine von *Euglena gracilis* dem LHCb1, LHCb2 und dem LHCb3 sehr ähnlich ist und das ca. 20 kDa schwere LHC I Protein in der Aminosäuresequenz dem LHCa und dem LHCb höherer Pflanzen gleicht (HOULNÉ UND SCHANTZ, 1988; JANSSON, 1994). Für *Euglena gracilis* konnte somit eine hohe Homologie der Aminosäuresequenz des LHC I und der des LHC II beschrieben werden (HOULNÉ UND SCHANTZ, 1988).

Weiterhin besitzt der Chloroplast dieses Phytoflagellaten nicht die für höhere Pflanzen (ANDERSON UND MELIS, 1983; TRISSL UND WILHELM, 1993; ANDERSON UND ARO, 1994; ALBERTSSON, 1995; STYS, 1995; JANSSON et al., 1997) typische Differenzierung in Grana- und Stromabereiche, weist jedoch eine geringe Gruppierung einzelner Thylakoidmembranen auf (SALVADOR et al., 1971; WINTER UND BRANDT, 1986; OSAFUNE et al., 1992). Zudem besitzen diese Algen einen hohen Anteil an PS II $\beta$  Zentren (max. 55% PS II $\alpha$ ) (EL KAOUA UND LAVAL-MARTIN, 1995), wie er bei höheren Pflanzen innerhalb der Stromathylakoide zu finden ist. Die Autoren argumentieren, daß möglicherweise nur die PS II $\alpha$  Zentren zur Energieübertragung an

das PS I (linearer Elektronentransport) befähigt sind. Im Vergleich zu PS II $\alpha$  besitzen PS II $\beta$  viel kleinere Antennen. Gegenüber höheren Pflanzen ist der Gehalt an PS II $\beta$  Zentren in *Euglena* stark erhöht. Dieses wurde auch für Chl b-Mutanten von Reis gefunden (TERAO et al., 1996), welche durch die Chl b Reduktion eine Zunahme der inaktiven Zentren aufwiesen. Man nimmt an, daß die inaktiven PS II $\beta$ -Zentren nicht am Elektronentransport beteiligt sind, wohl aber licht-sammelnde Funktion haben und ein wichtiger Bestandteil der photosynthetischen Membran hinsichtlich des Gleichgewichts der Lichtabsorption und des Elektronentransportes zwischen PS I und PS II sind (TERAO UND KATOH, 1996).

Ein weiterer Unterschied zu höheren Pflanzen ist das Fehlen von  $\beta,\epsilon$ -Carotinoiden in *Euglena gracilis*, wie z.B. Lutein. BISCHOP (1996) konnte anhand einer Mutante von *Scenedesmus obliquus* die Limitierung der Chl b-Biosynthese und der LHC II (und zwar der oligomeren Form des LHC II) in Abhängigkeit vom Vorkommen solcher Carotinoide zeigen. Für die Stabilisierung der dimeren und trimeren LHC II Formen scheint das Vorhandensein von  $\beta,\epsilon$ -Carotinoiden notwendig (BISCHOP, 1996). Alle in *Euglena gracilis* vorkommenden Carotinoide sind  $\beta,\beta$  Carotinoide. Verglichen mit Grünalgen und höheren Pflanzen hat diese Alge einen viel geringeren Chl b-Gehalt. Weiterhin ist der Gehalt an oligomerem LHC II, wie schon diskutiert, verringert, welches möglicherweise als Ursache für die nichtvorhandene Stapelung der Thylakoidmembran in Grana- und Stromathylakoide angesehen werden kann.

Der Anteil vom PS I an der Grundfluoreszenz kann bis zu 30% von  $F_0$  betragen (ROELOFS et al., 1992; DAU, 1994a). Trotz Aufhebung des Dunkelquenches kann auch unter FR-Licht nur ein maximales  $F_v/F_m$  Verhältnis von 0,642 erreicht werden. Somit ist die Quantenausbeute im Vergleich zu höheren Pflanzen bei *Euglena gracilis* deutlich verringert. Eine Erhöhung der Grundfluoreszenz durch hohe Beteiligung des PS I wäre eine mögliche Erklärung dafür. Eine andere Möglichkeit wäre der teilweise Quench der maximalen Fluoreszenz durch das PS I.

Trotz fehlender Stapelung der Thylakoidmembranen muß *Euglena gracilis* die Trennung zwischen PS I und PS II realisieren, da eine hohe photosynthetische Sauerstoffentwicklung sowie variable Fluoreszenz ( $F_m/F_0 = 2,79$ ) gemessen werden können. HECKS et al. (1996) postulieren für die Alge *Mantoniella squamata*, welche ebenfalls keine Stapelung der Thylakoide aufweist, daß die PS II Einheiten untereinander in einem engeren Kontakt stehen als zum PS I und nehmen eine Organisation dieser Zentren als PS II Dimere an.

Der in der Bande 3 vorliegende Zustand der Antennen ist unseren Messungen nach für die im Gegensatz zu Grünalgen und höheren Pflanzen unterschiedliche Fluoreszenzemission verantwortlich. Die FR-Belichtung führte zu einer Zunahme dieses Antennenkomplexes unter gleichzeitiger Erhöhung der an der PAM gemessenen PS II Fluoreszenz bei RT. Auch die Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzemissionsspektren bei 77K der mit FR-Licht bestrahlten Probe im Vergleich zur belichteten Probe könnte durch die Zunahme eines Fluoreszenzemitters mit einer Emissionswellenlänge bei ca. 710nm-712nm (Maximum der Bande 3) erklärt werden. Möglicherweise wird dies auch noch von der Reduktion der PS I Fluoreszenzemission (731 nm) begleitet. Die Zunahme der Fluoreszenzemission bei 710nm-712nm und die Abnahme der Emission bei 731nm wurden in der zweiten Ableitung dieser Spektren deutlich.

Die Carotinoidverarmung führte zum Verlust der Bande 4 und auch zur Reduktion der Bande 3. Gleichzeitig trat eine Veränderung des RT-Fluoreszenzspektrums sowie eine typische PS II Emission bei 77 K auf. Die Analyse der Fluoreszenzkinetiken (PAM) ergab den Verlust eines fluoreszenzquenchenden Prozesses mit einer mittleren HWZ, wie sie für Prozesse, in denen die Mobilität von Pigment-Proteinkomplexen eine Rolle spielt, beschrieben ist.

Da eine Aggregation von LHC II nicht anzunehmen ist und die Verschiebung der PS II Fluoreszenz auch nicht durch Fluoreszenzemission des PS II-core Komplexes zu erklären ist, kann anhand der vorliegenden spektralen wie auch immunologischen Daten nur der Komplex bestehend aus LHC I und LHC II für die Verschiebung der Emissionsspektren verantwortlich gemacht werden. Die Annahme der wahlweisen Energieübertragung an PS II oder PS I in Abhängigkeit äußerer Bedingungen könnte die gemessenen FR-Licht Effekte sowie die Ergebnisse der PAM Fluoreszenzanalyse erklären und würde nicht im Widerspruch zur Variabilität der RT Fluoreszenz sowie zur DCMU Beeinflußbarkeit der Fluoreszenzemission stehen.

Folgendes Modell wäre anhand unserer Daten denkbar: *Euglena gracilis* besitzt aufgrund der Nähe beider Photosysteme oder des geringeren Gehalts an peripherem LHC II eine Antenne aus lichtsammelnden Proteinen des LHC I und des LHC II. Dieses führt zu einer Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzemission des PS II. Generell muß dieser gemeinsame Antennenkomplex als starker Fluoreszenzemittor angesehen werden, da er als dominierende Bande des Emissionsspektrums erscheint. Unter bevorzugter Belichtung des PS I wird die absorbierte Energie dieses Lichtsammelkomplexes verstärkt als Fluoreszenz emittiert oder möglicherweise an das PS II übertragen. Belichtung mit weißem Licht führt zur bevorzugten Energieübertragung an das PS I und somit zur Löschung der Fluoreszenz. Hypothetisch betrachtet könnte dieser Mechanismus als eine spezielle Form des „spill over“ von Anregungsenergie über einen gemeinsamen Antennenkomplex beider Photosysteme bezeichnet werden. Innerhalb der kinetisch unterschiedlichen Phasen der Fluoreszenzlöschung wird dieser Mechanismus als verantwortlich für die mittlere Phase des Fluoreszenzquenches angesehen. Aufgrund der fehlenden Stabilität der Apoproteine in Abhängigkeit von der Carotinoidanbindung führt die Carotinoidverarmung zur Reduzierung bzw. zum Verlust der beteiligten Komponenten. In Folge dessen tritt die mittlere Phase des Fluoreszenzquenches nicht auf. Die höhere Empfindlichkeit der carotinoidverarmten Zellen gegenüber Licht unterstreicht die Bedeutung dieses Regulationsprinzipes innerhalb photoprotektiver Mechanismen. Die Ergebnisse der Experimente mit NaF sprechen für die Involvierung einer Phosphorylierungsreaktion und damit möglicherweise für eine Regulation in Abhängigkeit des Redoxzustandes des PQ-Pools. Der Unterschied zu „state transitions“ wäre zum einen die Beteiligung von LHC I an diesem Mechanismus und zum anderen das generelle Vorhandensein der gemeinsamen Antenne unabhängig von den Inkubationsbedingungen. Dieses wird durch die generell hohe Fluoreszenzemission (Fs) und das Vorhandensein der Verschiebung der PS II Fluoreszenzemission unter allen untersuchten Bedingungen untermauert.

Die Evolution von photosynthetischen Organismen muß mit der Entwicklung effizienter photoprotektiver Mechanismen (z.B. Xanthophyllzyklus) einhergegangen sein, ohne die eine oxygene Photosynthese nicht denkbar wäre. In Anbetracht des phylogenetischen Alters und der Besonderheiten des Chloroplasten und der Thylakoidmembranen von *Euglena gracilis* vermuten wir, daß in ursprünglichen Organismen möglicherweise andere photoprotektive Mechanismen (spill over, Quench im RC II) dominant sind.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

1. *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) unterscheidet sich im Pigmentstatus stark von Grünalgen und höheren Pflanzen und enthält bei Anzucht mit einer Lichtintensität von  $25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  neben den Chlorophyllen a,b- Diadinoxanthin als Hauptcarotinoid (83,9 % des Gesamtcarotinoidgehaltes). Des weiteren konnten  $\beta$ -Carotin, Neoxanthin, Diatoxanthin, Canthaxanthin, Echinenon und  $\beta$ -Cryptoxanthin mittels HPLC identifiziert werden.
2. Es kommen beide Komponenten eines alternativ zum Violaxanthinzyklus beschriebenen Carotinoidzyklus in *Euglena gracilis* vor, jedoch konnte eine durch Belichtung hervorgerufene Deepoxidierung von Diadinoxanthin nicht beobachtet werden. Somit fungiert unter unseren experimentellen Bedingungen in *Euglena gracilis* keine reversible Carotinoidumwandlung als photoprotektiver Regulationsmechanismus, was durch Experimente mit DTT, einem Deepoxidaseinhibitor unterstrichen wurde.
3. Optimale Wachstumbedingungen konnten für diese Alge bei einem Anzuchtlicht von  $25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  ermittelt werden. Intensitäten unter- bzw. oberhalb dieser Belichtungsbedingungen führten zu einer Reduktion der photosynthetischen Sauerstoffproduktion sowie der Quantenausbeute des PS II (Fv/Fm). Bei einer Anzucht mit Lichtintensitäten oberhalb  $25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  kam es neben der Reduktion des Chlorophyllgehaltes zu einer verstärkten Akkumulation von Diadinoxanthin,  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin. Da keine lichtinduzierte Pigmentumwandlung in *Euglena gracilis* beobachtet werden konnte, kann die Erhöhung von Diadinoxanthin nicht als Poolerhöhung der Xanthophyllzykluspigmente angesehen werden, trotzdem scheint die Erhöhung dieser Carotinoide von photoprotektiver Bedeutung zu sein.
4. Eine Belichtung mit Schwachlicht ( $10 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ) von dunkeladaptierten Algen führte zu einer Optimierung des photosynthetischen Apparates. Ausdruck fand dieses in einem höheren Fv/Fm-Verhältnis sowie in der Zunahme der photosynthetischen Sauerstoffproduktion. Dadurch wurde deutlich, daß ein im Dunkeln ablaufender Mechanismus, welcher eine Fluoreszenzlöschung induzierte, durch Schwachlicht unterdrückt wurde.
5. Eine Dunkelinkubation dieser Algenzellen führte zur Löschung der Chlorophyllfluoreszenz. FR-Licht verhinderte den dunkelinduzierten Quench der Chlorophyllfluoreszenz. Nach 20 minütiger Dunkelinkubation waren nur  $21,04\% \pm 1,5\%$  des Gesamtquench von einem transthylakoidalen Protonengradienten abhängig. Ein Elektronenfluß im Dunkeln durch Chlororespiration scheint zur Energetisierung der Thylakoidmembranen sowie zur Reduktion des Plastochinon-Pools zu führen, welches fluoreszenzlöschende Mechanismen zur Folge hat. Die Inhibierung des „recovery“ durch einen Phosphataseinhibitor (NaF) spricht für die Involvierung eines Kinase/Phosphatase-Systems, innerhalb dieser Mechanismen.
6. Die Belichtung von Algensuspensionen, welche bei  $25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  gewachsen waren, mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ( $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ - $1500 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ) führte zur Verringerung der Quantenausbeute sowie zur nichtphotochemischen Löschung der Chlorophyllfluoreszenz. Mit

zunehmender Belichtungsdauer bzw. -intensität erhöhte sich auch der nichtphotochemische Quench.

7. Anhand der Untersuchungen des „recovery“ der Chlorophyllfluoreszenz nach Belichtung konnten 3 kinetisch unterschiedliche Phasen der Fluoreszenzrelaxation beschrieben werden. Somit konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche Mechanismen zur lichtinduzierten Löschung der Chlorophyllfluoreszenz führten.

8. In Anbetracht der Ergebnisse an carotinoidverarmten Zellen hinsichtlich der Unterschiede des Fo-Quench sowie der Wirkung eines Entkoppler, ist der schnell relaxierende und zum größten Teil  $\Delta\text{pH}$ -abhängige Anteil des nichtphotochemischen Quench möglicherweise auf thermale Energiedissipation innerhalb der Reaktionszentren zurückzuführen. Der Anteil mit einer HWZ des „recovery“ von 6,5 min - 7,4 min ist auf die Mobilität einzelner Lichtsammelproteine, möglicherweise LHC I + LHC II, innerhalb der Thylakoidmembran und damit einer Reduktion des Energietransfers von den Antennen zum RC II zurückzuführen. Der innerhalb von 26 min nicht relaxierende Anteil am nichtphotochemischen Quench wurde durch photoinhibitorische Prozesse ausgelöst.

9. Durch den Einsatz von Norflurazon, einem Phytoendesaturaseinhibitor, erhielten wir photosynthetisch aktive Zellen mit stark reduziertem Gehalt an Carotinoiden, an denen die Bedeutung der Carotinoide als photoprotektive Substanzen gezeigt werden konnte. Bei der Belichtung reagierten carotinoidverarmte Zellen empfindlicher als die Kontrollen. Im Gegensatz zur Kontrolle traten bei carotinoidverarmten Zellen ein durch Belichtung induzierter D1-Abbau und eine Abnahme der photosynthetischen Sauerstoffproduktion auf. Die Reduzierung der Carotinoide führte bei Chloroplasten zur erhöhten Hydroxylradikalbildung. Neben der Schädigung des PS II trat durch die Carotinoidverarmung auch eine Inaktivierung des PS I auf. Außer  $\beta$ -Carotin scheint auch Diadinoxanthin für die Verhinderung einer Schädigung durch Licht notwendig zu sein.

10. Mit Hilfe von Untersuchungen an carotinoidverarmten Zellen -insbesondere der Auftrennung der Thylakoide der carotinoidverarmten Zellen mittels der Gelelektrophorese- wurde deutlich, daß die Carotinoidverarmung zum beinahe vollständigem Verlust einer oligomeren Form des LHC II (Bande 4) sowie zur Abnahme des Komplexes bestehend aus LHC I und LHC II (Bande 3) führte. Gleichzeitig trat bei den carotinoidverarmten Zellen der Verlust eines zur Löschung der Fluoreszenz führenden Mechanismus auf, welcher bei unbehandelten Zellen neben der Löschung der maximalen Fluoreszenz auch zum Quench der Grundfluoreszenz führte.

11. Die Löschung der Chlorophyll a-Fluoreszenz konnte bei carotinoidverarmten Zellen vollständig durch  $\Delta\text{pH}$ -abhängige (Quench der Fluoreszenz durch das RC II) bzw. photoinhibitorische Prozesse beschrieben werden. Somit muß das Vorhandensein des oligomeren LHC II möglicherweise aber auch der Bande 3 als notwendige Voraussetzung für das Auftreten von  $qM_{SV}$  angesehen werden.

12. *Euglena gracilis* weicht im Fluoreszenzemissionsspektrum stark von Grünalgen und höheren Pflanzen ab. Die Fluoreszenzemission bei RT besaß ein Maximum bei 699 nm und ist da-

mit im Vergleich zu Grünalgen und höheren Pflanzen langwelliger. Bei der Aufnahme der Emissionsspektren (77 K) fehlte die typische PS II-Fluoreszenzemission (680 nm-685 nm) nahezu vollständig. Unter Kühlung wurde das Maximum der Fluoreszenzemission bei 722 nm gemessen.

13. Der isolierte PS II-core Komplex zeigte keine längerwellige Verschiebung der Fluoreszenzemission bei Raumtemperatur. Somit wird ausgeschlossen, daß die langwellige Verschiebung der Fluoreszenzemission der ganzen Zelle aus einer hohen PS II-core Fluoreszenz resultiert.

14. Der Vergleich der bei 685 nm und 725 nm gemessenen Excitationsspektren der ganzen Zellen ergab, daß eine Anregung im Absorptionsbereich des Chl b und der Carotinoide zur höheren Fluoreszenzemission bei 725 nm führte. Es muß somit angenommen werden, daß Komponenten des PS II an der langwelligen Fluoreszenzemission beteiligt sein müssen oder eine Energieübertragung von PS II-Komponenten auf langwellige Fluoreszenzemittoren stattfindet.

15. Die Isolierung der Pigment-Proteinkomplexe und die Untersuchung der spektralen Eigenschaften dieser ergab eine gute Übereinstimmung mit den für höhere Pflanzen und Grünalgen beschriebenen Daten. Jedoch ist der Gehalt an oligomeren LHC II im Vergleich zu diesen Organismen äußerst gering. Zusätzlich zu den bekannten Komplexen konnte für *Euglena gracilis* ein weiterer Komplex beschrieben werden, welcher Analogien zum Emissionsspektrum der Zelle bei Raum- bzw. Tieftemperatur aufwies. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Aggregat aus Proteinen des LHC I und des LHC II, welches für die generell hohe Fluoreszenzemission (Fs) sowie deren langwellige Verschiebung bei der ganzen Zelle verantwortlich zu sein scheint.

16. Die Ableitung der Fluoreszenzemissionsspektren (77K) der ganzen Zelle machte eine Verstärkung einer bei 713 nm emittierenden Komponente durch die FR-Belichtung deutlich. Möglicherweise führt eine spezielle Form eines „spill over“ an das PS I unter Beteiligung eines gemeinsamen Antennenkomplexes beider Photosysteme in *Euglena gracilis* zum Auftreten eines  $\Delta$ pH-unabhängigen, nichtphotochemischen Quench der Fluoreszenz.

## 6. LITERATUR

- Albertsson, P.-Å. (1995) : The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane - a model for the domain organisation. *Photosynth. Res.* 46, 141-146
- Alfonso, M., G. Montoya, R. Cases, R. Rodriguez und R. Picorel (1994) : Core antenna complexes, CP43 and CP47, of higher plant photosystem II. Spectral properties, pigment stoichiometry, and amino acid composition. *Biochemistry* 33, 10494-10500
- Allen, J.F. (1992) : Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 275-335
- Allen, J.F. (1995) : Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol. Plantarum* 93, 196-205
- Anderson, J. M. (1980) : P-700 content and polypeptides profile of chlorophyll complexes of spinach and barley thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 591, 113-126
- Anderson, J.M. und A. Melis (1983) : Localisation of different photosystem in separate regions of chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 745-749
- Anderson, J.M. und E.V. Aro (1994) Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plants leaves under sustained high irradiances: An hypothesis. *Photosynth. Res.* 41, 315-326
- Andréasson, L.-E., I. Vass und S. Styring (1995) : Ca<sup>2+</sup> depletion modifies the electron on both donor and acceptor side in photosystem 2 from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 1230, 155-164
- Andreeva, A. und M. Velitchkova (1998) : Mutual orientation of absorbing chromophores and long wavelength pigments in photosystem I particles. *Spectrochimica Acta Part A* 54, 639-644
- Arnon, D.J. (1949) : Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Polyoxidases in Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15
- Aro, E.-M., I. Virgin und B. Andersson (1993) : Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 113-134
- Arsalane, W., B. Rousseau und J.C. Duval (1994) : Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* 60, 237-243
- Arvidsson, P.-O., C.E. Bratt, M. Carlsson und H.-E. Åkerlund (1996) : Purification and identification of the violaxanthin deepoxidase as a 43 kDa protein. *Photosynth. Res.* 49, 119-129
- Asada, K. und M. Takahashi, (1987) : Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In : *Topics in photosynthesis*, Vol. 9 (Kyle, D.J., Osmond, C.B. und C.J. Arntzen, eds.) 227-288, Elsevier, Amsterdam
- Barbato, R., F. Rigoni, M.T. Giardi und G.M. Giacometti (1990) : The minor antenna complexes in an oxygen evolving PSII preparation. In : *Current Research in Photosynthesis*, Vol.I, (M. Baltscheffsky, ed.), 339-342, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Baroli, I. und A. Melis (1998) : Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem II light harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 205, 288-296
- Barzda, V., A. Istokovics, I. Simidjiev und G. Garab (1996a) : Structural flexibility of chiral magroaggregates of light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complexes. Light-induced reversible structural changes associated with energy dissipation. *Biochemistry* 35, 8981-8985
- Barzda, V., G. Garab, V. Gulbinas und L. Valkunas (1996b) : Evidence for long-range excitation energy migration in magroaggregates of the chlorophyll a/b light-harvesting antenna complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 231-236

- Bassi, R. und F.A. Wollmann (1991) : The chlorophyll- a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 183, 423-433
- Bassi, R., B. Pineau, P. Dainese und J. Marquardt (1993) : Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 212, 297-303
- Bennett, J. (1983) : Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochem. J.* 212, 1-13
- Bennoun, P. (1982) : Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 79, 4352-4356
- Bilger, W. und O. Björkman (1990) : Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurement of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25, 173-185
- Bilger, W., O. Björkman und S.S. Thayer (1989) : Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol.* 91, 542-551
- Bishop, N. (1996) : The  $\beta,\epsilon$ -Carotenoid, lutein, is specifically required for the formation of the oligomeric forms of the light harvesting complex in the green alga, *Scenedesmus obliquus*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36, 279-283
- Bishop, N.I., K. Humbeck, S. Römer und H. Senger (1989) : The mode of adaptation of the photosynthetic apparatus of a pigment mutant of *Scenedesmus* to different light intensities. *J. Plant Physiol.* 135, 144-149
- Björnland, T. (1990) : Carotenoids structure and lower plant phylogeny. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology* (N.I. Krinsky, M.M. Mathews-Roth und R. Taylor, eds.) 21-37, Plenum Press, New York
- Björnland, T.A. Fiksdahl, F.T. Haxo und S. Liaaen-Jensen. (1987) : New and unusual carotenoid feature of *Euglena gracilis* (Euglenophyceae). 8th. Intl. Symp. Carotenoids: P1. Boston
- Björkman, O. (1987) : Low temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationships to photon yield of photosynthesis in photoinhibition. In: *Topics in Photosynthesis*, Vol. 9 (Kyle, D.J., C.B. Osmond und C.J. Arntzen eds.) 123-144, Elsevier, Amsterdam
- Böger, P. und U. Schlue (1976): Long-term effects of herbicides on the photosynthetic apparatus. I. Influence of diuron, triazines and pyridazinones. *Weed Res.* 16, 149-154
- Bolychevtseva, Y.V., M.G. Rakhimberdieva, N.V. Karapetyan, V.I. Popov, A.A. Moskalenko und N.Y. Kuznetsova (1995) : The development of carotenoid-deficient membranes in plastids of barley seedlings treated with norflurazon. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 27, 153-160
- Bradbury, M. und N.R. Baker (1984) : A quantitative determination of photochemical and non-photochemical quenching during the slow phase of the chlorophyll fluorescence induction curve of bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 765, 275-281
- Brandt, P. (1980) : Stadienspezifische Quantitätsveränderungen der Chlorophyll-Protein-Komplexe CP I und CP II von synchronisierter *Euglena gracilis*, *Stamm Z. Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 100, 95-105
- Brandt, P. und C. Wilhelm (1990) : The light-harvesting system of *Euglena gracilis* during the cell cycle. *Planta* 180, 293-296
- Briantais, J.M. (1994) : Light-harvesting chlorophyll a/b complex requirement for regulation of photosystem II photochemistry by non-photochemical quenching. *Photosynth. Res.* 40, 287-294
- Briantais, J.M., C. Vernotte, M. Picaud und G.H. Krause (1979) : A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 548, 128-138
- Britton, G. (1985) : General carotenoid methods. *Methods in Enzymol.* 111, 113-149

- Britton, G. (1995) : UV/Visible spectroscopy. In: Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy. (G. Britton, S. Liaaen-Jensen und H. Pfander, eds.), 13-62; Birkhäuser Verlag, Basel
- Brown, J. (1980) : Absorption and fluorescence spectra of chlorophyll-proteins isolated from *Euglena gracilis*. Biochim Biophys. Acta 591, 9-21
- Brown, J.S. (1985) Three photosynthetic antenna porphyrins in a primitive green alga. Biochim. Biophys. Acta 807, 143-146
- Bruce, D., G. Samson und C. Carpenter (1997) : The origins of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct quenching by P680 (+) in photosystem II enriched membranes at low pH. Biochemistry 36, 749-755
- Büchel, C. und C. Wilhelm (1990a) : Wavelength state transition and light regulated chlororespiration as mechanism to control the energy status in the chloroplast of *Pleurochloris meiringensis*. Plant Physiol. Biochem. 28, 307-314
- Büchel, C. und C. Wilhelm (1990b) : The interaction of state transition and chlororespiration in the xanthophycean alga *Pleurochloris meiringensis*. In Current Research in Photosynthesis, Vol.II (M. Baltscheffsky, Ed.) 943-946, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Büchel, C. und C. Wilhelm (1993) : In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. Photochem. Photobiol. 58, 137-148
- Büchel, C., C. Wilhelm und I. Lenartz-Weiler (1988) : The molecular analysis of the light adaptation reaction in the yellow-green alga *Pleurochloris meiringensis* (Xanthophyceae). Botanica Acta 101, 306-310
- Bugos, R.C. und H.Y. Yamamoto (1996) : Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6320-6325
- Bulté, L., P. Gans, F. Rébeillé und F.-A. Wollmann (1990) : ATP control on state transitions in vivo on *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta 1020, 72-80
- Burton, G.W. (1990) : Antioxidant properties of carotenoids. J. Nutr. 119, 109-111
- Butler, W.L. (1978) : Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 345-378
- Campell, D. und G. Öquist (1996) : Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence, which reflects state transitions in these organisms. Plant Physiol. 111, 1293-1298
- Canaani, O. und S. Malkin (1984) : Distribution of light excitation in an intact leaf between the two photosystems of photosynthesis - changes in absorption cross-section following state 1-state 2 transitions. Biophys. Biochem. Acta 766, 513-524
- Caron, L., C. Berkaloff, J.C. Duval und H. Jupin (1987) : Chlorophyll fluorescence transients from the diatom *Phaeodactylum tricorutum*: relative rates of cyclic phosphorylation and chlororespiration. Photosynth. Res. 11, 131-139
- Casper-Lindley, C. und O. Björkman (1996) : Nigericin insensitive post-illumination reduction in fluorescence yield in *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyte). Photosynth. Res. 50, 209-222
- Corneille, S., L. Cornac, G. Guedeney, M. Havaux und G. Peltier (1998) : Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NADPH in higher plant chloroplasts characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity. Biochim. Biophys. Acta 1363, 59-69
- Croce, R., G. Zucchelli, F.M. Garlaschi, R. Bassi und R.C. Jennings (1996) : Excited state equilibration in the photosystem I-light harvesting complex: P700 is almost isoenergetic with its antenna. Biochemistry 35, 8572-8579

- Crofts, J. und P. Horton : (1991) Dissipation of excitation energy by photosystem II particles at low pH. *Biochim. Biophys. Acta* 1058, 187-193
- Cunningham, JR., F.X. und J.A. Schiff ( 1986a) : Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll b. 1. Pigment composition. *Plant Physiol.* 80, 223-230
- Cunningham, JR., F.X. und J.A. Schiff (1986b) : Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll b. 2. Polypeptide composition. *Plant Physiol.* 80, 231-238
- Czapski, G. (1984) : Reaction of \*OH. *Methods in Enzymol.* 105, 209-219
- Dau, H. (1994a) : Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.* 60, 1-23
- Dau, H. (1994b) : Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. *J. of Photochem Photobiol. B: Biol.* 26, 3-27
- Dau, H. und O. Canaani (1989) : The involvement of LHC 2 phosphorylation in the adaptation to changing light intensities and some results on the regulation of the LHC 2 phosphorylation in vivo. In : *Current Research in Photosynthesis* (Baltscheffsky, M. ed.) Vol. IV, 325-328, Kluwer Academic, Dordrecht
- Dau, H. und O. Canaani (1992) : Short-term adaptation of higher plants to changing light intensities and evidence for the involvement of phosphorylation of the light harvesting chlorophyll a/b protein complex of photosystem II. *Photochem Photobiol.* 55, 873-885
- De Martino, A., D. Douady, J.C. Duval und L. Caron (1997) : Characterization of two light-harvesting subunits isolated from the brown alga *Pelvetia canaliculata*: heterogeneity of xanthophyll distribution *Photochem. Photobiol.* 66, 190-197
- Debus, R.J. (1992) : The manganese and the calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 269-253
- Delosme, R., J. Olive und F.-A. Wollman (1996) : Changes in light energy distribution upon state transition. an in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 150-158
- Delphin, E., J.C. Duval, A.-L. Etienne und d. Kirilovsky (1996) : State transitions or  $\Delta$ pH-dependent quenching of photosystem II fluorescence in red algae. *Biochemistry* 35, 9435-9445
- Delrieu, M.J. (1998) : Regulation of thermal dissipation of absorbed excitation energy and violaxanthin de-epoxidation in the thylakoids of *Lactuca sativa*. Photoprotective mechanism of a population of photosystem II centres. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 157-173
- Demers, S., S. Roy, R. Gagnon und c. Vignault (1991) : Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Marine Ecol. Prog. Ser.* 76, 185-193
- Demmig, B. und O. Björkman (1987) : Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171, 171-184
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 1-24
- Demmig-Adams, B. und W.W. Adams III (1992) : Photoprotection and other responses of plant to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599-626
- Demmig-Adams, B. und W.W. Adams III (1993) : The xanthophyll cycle. In : *Carotenoids in Photosynthesis* (A. Young, G. Britton, eds.) 206-251, Chapman & Hall, London

- Demmig-Adams, B. und W.W. Adams III (1996) : The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21-26
- Demmig-Adams, B., D.L. Moeller, B.A. Logan und W.W. Adams III (1998) : Positive correlation between levels of retained zeaxanthin + antheraxanthin and degree of photoinhibition in shade leaves of *Schefflera arboricola* (Hayata) Merrill. *Planta* 205, 367-374
- Demmig-Adams, B., W.W. Adams III, U. Heber, S. Neimanis, K. Winter, A. Krüger, F.-C. Czygan, W. Bilger und O. Björkman (1990): Inhibition of zeaxanthin formation and rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol.* 92, 293-301
- Depka, B., P. Jahns und A. Trebst (1998) :  $\beta$ -Carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II. *FEBS Letters* 424, 267-270
- Dreyfuss, B.W. und J.P. Thornber (1994) : Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II. *Plant Physiol.* 106, 829-839
- El Kaoua, M. und D. Laval-Martin (1995) : Evolution of PS II $\alpha$  and PSII $\beta$  centres during the greening of *Euglena gracilis* Z: Correlation with changes in lipid content. *Photosynth. Res.* 43, 155-163
- Elstner, E.F. (1990) : Der Sauerstoff. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich
- Endo, T. und K. Asada (1996) : Dark induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 37(4), 551-555
- Fabel, T.G., L.A. Staehelin und W.W. Adams III (1994) : Analysis of xanthophyll cycle carotenoids and chlorophyll fluorescence in light intensity-dependent chlorophyll-deficient mutants of wheat and barley. *Photosynth. Res.* 42, 191-202
- Falkowski, G.P. und J. LaRoche (1991) : Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27, 14-20
- Falkowski, G.P., Z. Dubinsky und K. Wyman (1985) : Growth-irradiance relationships in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 30, 311-321
- Falkowski, P.G., K. Wyman, A.C. Ley und D.C. Mauzerall (1986a) : Relationship of steady-state photosynthesis to fluorescence in eucaryotic algae. *Biochim. Biophys. Acta* 849, 183-192
- Falkowski, P.G., Y. Fujita, A. Ley und D. Mauzerall (1986b) : Evidence for cyclic electron flow around photosystem II in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* 81, 310-312
- Färber, A. und P. Jahns (1998) : The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 47-58
- Färber, A., A. Young, A.V. Ruban, P. Horton und P. Jahns (1997) : Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol.* 115, 1609-1618
- Feierabend, J. und T. Winkelhusener (1982) : Nature of photooxidative events in leaves treated with chlorosis-induced herbicides. *Plant Physiol.* 70, 1277-1282
- Feild, T.S., L. Nedbal und D.R. Ort (1998) : Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant Physiol.* 116, 1209-1218
- Flachmann, R. (1997) : Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. *Plant Physiol.* 113, 787-794
- Foyer, C.H. und J. Harbinson (1994) : Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In : Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in plants. (Foyer, C.H. und P.M. Mullineaux eds.) 1-42, CRC Press, Boca Raton, FL

- Frank, H.A. und R.J. Cogdell (1993) The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In : Carotenoids in Photosynthesis (Young, A. und G. Britton, eds.) 252-325, Chapman & Hall, London
- Frank, H.A. und R.J. Cogdell (1996) : Carotenoids in photosynthesis. Photochem. Photobiol. 63, 257-264
- Frank, H.A., A. Cua, V. Chynwat, A. Young, D. Gosztola und M.R. Wasielewski (1996) : The lifetime and energies of the excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. Biochim. Biophys. Acta 1277, 243-252
- Frank, H.A., A. Cua, V. Chynwat, A. Young, D. Gosztola und M.R. Wasielewski (1994) : Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. Photosynth. Res. 41, 389-395
- Genge, S., D. Pilger und R.G. Hiller (1974) : The relationship between chlorophyll b and pigment-protein complex II. Biochim. Biophys. Acta 347, 22-30
- Genty, B., J.M. Briantais und N.R. Baker (1989) : The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta 990, 87-92
- Gibbs, S.P. (1978) : The chloroplast of *Euglena* may have evolved from Symbiotic green algae. Can. J. Bot. 56, 2883-2889
- Giersch, C. und G.H. Krause (1991) : A simple model relating photoinhibitory fluorescence quenching in chloroplasts to a population of altered photosystem II reaction centres. Photosynth. Res. 30, 115-121
- Gilmore, A.M. (1997) : Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. Physiol. Plant 99, 197-209
- Gilmore, A.M. und H.Y. Yamamoto (1991) : Zeaxanthin formation and energy-dependent fluorescence quenching in pea chloroplasts under artificially mediated linear and cyclic electron transport. Plant Physiol. 96, 635-643
- Gilmore, A.M., N. Mohanty und H.Y. Yamamoto (1994) : Epoxidation of zeaxanthin and antheraxanthin reverses non-photochemical quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence in the presence of trans-thylakoid  $\Delta$ pH. FEBS Letters 350, 271-274
- Gilmore, A.M. und H.Y. Yamamoto (1993) : Linear models relating xanthophyll and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explain zeaxanthin independent quenching. Photosynth. Res. 35, 67-78
- Godde, D., J. Buchhold, V. Ebbert und W. Oettmeier (1992) : Photoinhibition in intact spinach plants: effect of high light intensities on the function of the two photosystems and on the content of the D1 protein under nitrogen. Biochim. Biophys. Acta 1140, 69-77
- Gomez-Silva, B., M.P. Timko und J.A. Schiff (1985) : Chloroplast biosynthesis from glutamate or 5-aminolevulinate in intact *Euglena* chloroplast. Planta 165, 12-22
- Goodwin, W. (1980) : The biochemistry of the carotenoids. Vol. 1 Plants. Chapman and Hall, London, New York
- Govindjee (1990) : Photosystem II heterogeneity: the acceptor side. Photosynth. Res. 25, 151-160
- Govindjee (1995) : Sixty-three years since Kautsky : Chlorophyll a Fluorescence. Aust. J. Plant Physiol. 22, 131-160
- Govindjee und K. Satoh (1986) : Fluorescence properties of Chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. In: Light emission by plants and bacteria. (Govindjee, J. Amez und D.C. Fork; eds.) 499-539, Academic Press, INC.
- Green, B.R. und D.G. Durnford (1996) : The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 47, 685-714
- Groot, M.-L., E.J.G. Peterman, I.H.M. van Stokkum, J.A. Dekker und R. van Grondelle (1995) : Triplet and Fluorescing states of the studied as a function of temperature. Biophysical J. 68, 281-290

- Gruszecki, W.I. und K. Strzalka (1991) : Does the xanthophyll cycle take part in the regulation of fluidity of the thylakoid membrane? *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 310-314
- Høyer-Hansen, G., R. Bassi, L. Hønborg und D. Simpson (1988) : Immunological characterization of chlorophyll a/b-binding proteins of barley thylakoids. *Planta* 173, 12-21
- Hagen, C., A.A. Pascal, P. Horton und Y. Inoue (1995) : Influence of changes in the photon protective energy dissipation on red light-induced detrapping of the thermoluminescence Z-band. *Photochem. Photobiol.* 62, 514-521
- Hager, A. (1980) : The reversible, light-induced conversion of xanthophylls in the chloroplast. In : *Pigment in plants* (F.-C. Czygan, ed.) 57-79, Akademie der Wissenschaften, Berlin
- Hager, A. und H. Stransky (1970) : Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae und Phaeophyceae. *Arch. Mikrobiol.* 73, 77-89
- Hager, A. und K. Holocher (1994) : Localisation of the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192, 581-589
- Harrison, M.A. und J.F. Allen (1993) : Differential phosphorylation of individual LHC-II polypeptides during short-term and long-term acclimation to light regime in the green alga *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1141, 37-44
- Harrison, M.A., A. Melis und J.F. Allen (1992) : Restoration of irradiance-stressed *Dunaliella salina* (green alga) to physiological growth conditions: changes in antenna size and composition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1100, 83-91
- Harrison, M.A., J.A. Nemson und A. Melis (1993) : Assembly and composition of the chlorophyll a-b light harvesting complex of barley (*Hordeum vulgare* L.): immunochemical analysis of chlorophyll b-less and chlorophyll b-deficient mutants. *Photosynth. Res.* 38, 141-151
- Härtel, H. und H. Lokstein (1995) : Relationship between quenching of maximum and dark-level chlorophyll fluorescence in vivo: dependence on photosystem II antenna size. *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 91-94
- Härtel, H., H. Lokstein, B. Grimm und B. Rank (1996) : Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. *Plant Physiol.* 110, 471-482
- Havaux, M. (1993) : Non-photochemical energy dissipation in photosystem II: theoretical modelling of the „energy-dependent quenching“ of chlorophyll fluorescence emission from intact plant leaves. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19, 97-104
- Havaux, M. (1998) : Carotenoids as membrane stabilizer in chloroplasts. *Trends in Plant Sci.* 3, 147-151
- Havaux, M. und F. Tardy (1997) : Thermostability and photostability of photosystem II in leaves of the *Chlorina-f2* mutant deficient in light-harvesting chlorophyll a/b protein complexes. *Plant Physiol.* 113, 913-923
- Havaux, M. und W.I. Gruszecki (1993) : Heat-and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin: indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochem. Photobiol.* 58, 607-614
- Havaux, M., F. Tardy und Y. Lemoine (1998) : Photosynthetic light-harvesting function of carotenoids in higher-plant leaves exposed to high light irradiances. *Planta* 205, 242-250
- Hecks, B., C. Wilhelm und H.-W. Trissl (1996) : Functional organisation of the photosynthetic apparatus of the primitive alga *Mantoniella squamata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1274, 21-30
- Heinze, I., H. Dau und H. Senger (1996) : The relation between photochemical yield and variable fluorescence of photosystem II in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 32, 89-95

- Hemelrijk, P.W., S.L.S. Kwa, R. van Grondelle und J.P. Dekker (1992) : Spectroscopic properties of LHC II, the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from chloroplast membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 159-166
- Henley, W. (1993) : Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.* 29, 729-739
- Hideg, E. und N. Murata (1997) : The irreversible photoinhibition of the photosystem II complex in leaves of *Vicia faba* under strong light. *Plant Sci.* 130, 151-158
- Hodges, M., G. Cornic und J.M. Briantais (1989) : Chlorophyll fluorescence from spinach leaves: resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 974, 289-293
- Hormann, H.H., C. Neubauer und U. Schreiber (1994) : On the relationship between chlorophyll fluorescence quenching and the quantum yield of electron transport in isolated thylakoids. *Photosynth. Res.* 40, 93-106
- Horton, P und A.V. Ruban (1993) :  $\Delta$ pH-dependent quenching of the Fo level of chlorophyll fluorescence in spinach leaves. *Biochim Biophys. Acta* 1142, 203-206
- Horton, P und A.V. Ruban (1994) : The role of light-harvesting complex II in energy quenching. In : *Photoinhibition in Photosynthesis.* (Baker, N.R. und J.R. Bowyer eds.) 111-128, Bios. Scientific Publishers, Oxford
- Horton, P. und A. Hague ( 1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 932, 107-115
- Horton, P., A.V. Ruban und R.G. Walters (1994) : Regulation of light harvesting in green plants: indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 106, 415-420
- Horton, P., A.V. Ruban und R.G. Walters (1996) : Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-684
- Horton, P., A.V. Ruban, D. Rees, A.A. Pascal, G. Noctor und A.J. Young (1991) : Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Letters* 292, 1-4
- Houlné, G. und R. Schantz (1988) : Characterization of cDNA sequences for LHCI apoproteins in *Euglena gracilis* : The mRNA encodes a large precursor containing several consecutive divergent polypeptides. *Mol Gen Genet* 213, 479-486
- Humbeck, K., S. Römer und H. Senger (1988) : Changes in carotenoid composition and function of the photosynthetic apparatus during light-dependent chloroplast differentiation in mutant C-6D of *Scenedesmus obliquus*. *Botanica Acta* 101, 220-228
- Humbeck, K., S. Römer und H. Senger (1989) : Evidence for an essential role of carotenoids in the assembly of an active photosystem II. *Planta* 179, 242-250
- Irrgang, K.-D., B. Geiken, B. Lange und G. Renger (1992) : Disulfide bridge modifiers and sulfohydryl group blockers are inactivating the oxygen evolving enzyme of PS II from spinach. In : *Research in Photosynthesis, Vol. 2* (Murata, N. ed.) 417-420, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Izawa, I. (1980) : Acceptor and donors for chloroplast electron transport. *Methods in Enzymol.* 69, 413-433
- Jahns, P. und B. Miede (1996) : Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198, 202-210
- Jahns, P. und G.H. Krause (1994) : Xanthophyll cycle and energy-dependent fluorescence quenching in leaves from pea plants grown under intermittent light. *Planta* 192, 176-182

- Jahns, P. und S. Schweig (1995) : Energy-dependent fluorescence quenching in thylakoids from intermittent light grown pea plants: Evidence for an interaction of zeaxanthin and the chlorophyll a/b binding protein CP26. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 683-687
- Jansson, S. (1994) : The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1-19
- Jansson, S., H. Stefánsson; U. Nyström, P. Gustasson und P.-Å. Albertson (1997) Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 297-309
- Jennings, R.C., R. Bassi, F.M. Garlaschi, P. Dainese und G. Zucchelli (1993) : Distribution of the chlorophyll spectral forms in the chlorophyll-protein complexes of PS II antenna. *Biochemistry* 32, 3203-3210
- John, J.B. (1976) : Manipulation of galactolipid fatty acid composition with substituted pyridazinones. *Plant Physiol.* 57, 38-40
- Johnson, G. und A. Krieger (1994) : Thermoluminescence as a probe of photosystem II in intact leaves: non-photochemical fluorescence quenching in pea grown in an intermittent light regime. *Photosynth. Res.* 41, 371-379
- Johnson, G.N., A.W. Rutherford und A. Krieger (1995) : A change in the midpoint potential of quinone Q<sub>A</sub> in photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 202-207
- Junesch, V. und P. Gräber (1985) : The rate of ATP synthesis as a function of  $\Delta$ pH in normal and dithiothreitol-modified chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 809, 429-434
- Karukstis, K.K. (1992) : Chlorophyll fluorescence analysis of photosystem II reaction centre heterogeneity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 15, 63-74
- Kim, J.H., J.A. Nemson und A. Melis (1993) : Photosystem II reaction center damage and repair in *Dunaliella salina* (green alga). *Plant Physiol.* 103, 191-189
- Kitajima, M. und W.L. Butler (1975) : Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys, Acta* 376, 105-115
- Knoll, A.H. (1992) : The early evolution of eukaryotes: A geological perspective. *Science* 256, 622-627
- Koll, M., P. Brandt und W. Wiessner (1980) : Hemmung der lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung durch Glukose. *Protoplasma* 105, 121-128
- Konermann, L. und A. Holzwarth (1996) : Analysis of the absorption spectrum of photosystem II reaction centers: Temperature dependence, pigment assignment, and inhomogeneous broadening. *Biochemistry* 35, 829-842
- Kooten, van O. und J.F.H. Snel (1990) : The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, 147-150
- Król, M., M.D. Spangfort, N.P.A. Huner, G. Öquist, P. Gustafsson und S. Jansson (1995) : Chlorophyll a/b -binding proteins, pigment conversions, and early light-induced protein in a chlorophyll b-less barley mutant. *Plant Physiol.* 107, 873-883
- Kramer, H.J.M., W.H.J. Westerhuis und J. Amesz (1985) : Low temperature spectroscopy of intact algae. *Physiol. Veg.* 23, 534-543
- Krause, G.H. und E. Weis (1991) : Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basic. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349
- Krause, H.G., H. Laasch und E. Weis (1988) : Regulation of thermal dissipation of absorbed light energy in chloroplasts indicated by energy-dependent fluorescence quenching. *Plant Physiol. Biochem* 26, 445-452

- Krieger, A. und E. Weis (1992) : Energy dependent quenching of chlorophyll-a-fluorescence. The involvement of proton-calcium exchange at photosystem II. *Photosynthetica* 27, 89-98
- Krieger, A. und E. Weis (1993) : The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II. *Photosynth. Res.* 37, 117-130
- Krieger, A., A.W. Rutherford und G.N. Johnson (1995) : On the redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor, Q<sub>A</sub>, in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 193-201
- Krieger, A., E. Weis und S. Demeter (1993) : Low-pH-induced Ca<sup>2+</sup> ion release in the water-splitting system is accompanied by a shift in the midpoint redox potential of the primary quinone acceptor Q<sub>A</sub>. *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 411-418
- Krieger, A., I. Moya und E. Weis (1992) : Energy dependent quenching of chlorophyll a fluorescence: effect of chlorophyll a fluorescence and picosecond-relaxation kinetics in thylakoid membranes and photosystem II preparations. *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 167-176
- Krinsky, N.I., A. Gordon und A.I. Stern (1964) : The appearance of neoxanthin during the greening of dark-grown *Euglena*. *Plant Physiol.* 39, 441-445
- Krishna Rao, R.K., R. Mannan, A. Gnanm and S. Bose (1988) : Inhibition of nitrite reductase and nitrate reductase activities by bleaching and non-bleaching herbicides. *Biochem. Internat.* 17, 691-700
- Krishna, K.B. und P. Mohanty (1998) : Secondary carotenoid production in green algae. *J. Scientific & Industrial Research* 57, 51-63
- Kruse, O., D. Zheleva und J. Barber (1997) : Stabilisation of photosystem II dimes by phosphorylation: Implication for the regulation turnover of D1 protein. *FEBS Letters* 408, 276-280
- Kubin, S. (1985) : The improved two-wavelength spectrophotometric methods for the determination of chlorophylls a and b. Vortrag Symposium Trebon
- Kübler, J.E. und J.A. Raven (1995) : The interaction between inorganic carbon acquisition and light supply in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 31, 369-375
- Kühlbrandt, W. (1994) : Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Current Opinion in Structural Biol.* 4, 519-528
- Kühlbrandt, W. D.G. Wang und Y. Fujiyoshi (1994) : Atomic model of plant light harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614-621
- Kyle, D.J. (1987) : The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In: *Topics in Photosynthesis*, Vol. 9 (Kyle, D.J., C.B. Osmond und C.J. Arntzen eds.) 197-226, Elsevier, Amsterdam
- Laemmli, U.K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Latasa, M. (1995) : Pigment composition of *Heterocapsa sp.* and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Sci. Mar.* 59, 25-37
- Lebedev, N.N., E.V. Pakshina, Y.V. Bolychevtseva und N.V. Karapetyan (1988) : Fluorescence characterization of chlorophyll-proteins in barley seedlings grown with the herbicide Norflurazon under low irradiance. *Photosynthetica* 22, 371-376
- Lee, A. I.-C. und J.P. Thornber (1995) : Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.* 107, 565-574
- Leitsch, J., b. Schnettger, C. Critchley und G.H. Krause (1994) : Two mechanism of recovery from photoinhibition in vivo: Reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. *Planta* 194, 15-21

- Leverenz, J.W., G. Öquist und G. Wingle (1992) : Photosynthesis and photoinhibition in leaves of chlorophyll b-less barley in relation to absorbed light. *Physiol. Plantarum* 85, 495-502
- Liaaen-Jensen, S. (1985) : Carotenoids of lower plant-recent progress. *Pure Appl. Chem.* 57, 649-662
- Lokstein, H., H. Härtel und P. Hoffmann (1993) : Comparison of chlorophyll fluorescence quenching in leaves of wild-type with a chlorophyll-b-mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19, 217-225
- Lokstein, H., H. Härtel, P. Hoffmann, P. Voitke und G. Renger (1994): The role of light-harvesting complex II in excess excitation dissipation: an in-vivo fluorescence study on the origin of high-energy quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 26, 175-184
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr und R.J. Randall (1951) : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Mantoura, R.F.C. und C.A. Llewellyn (1983) : The rapid determination of alga chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 151, 297-314
- Markgraf, T. und R. Oelmüller (1991) : Evidence that carotenoids are required for the accumulation of a functional photosystem II, but not photosystem I in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta* 185, 97-104
- Marquardt, J. (1998) : Effects of carotenoid-depletion on the photosynthetic apparatus of a *Gladiaria sulphuraria* (Rhodophyta) strain that retains its photosynthetic apparatus in the dark. *J. Plant Physiol.* 152, 372-380
- Marquardt, J. und R. Bassi (1993) : Chlorophyll-proteins from maize seedlings grown under intermittent light conditions. *Planta* 191, 265-273
- Mason, B.C., S. Matthews, T.M. Bricker, J.V. Monrey (1991) : Simplified procedure for isolation of intact chloroplasts from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 97, 1576-1580
- Meunier, P.C. und D.S. Bendall (1993) : On the rates of cyclic electron transport around photosystem II in the presence of donor side limitation. *Photosynth. Res.* 37, 147-158
- Meyer, M. C. Wilhelm und G. Garab (1996) : Pigment-pigment interactions and secondary structure of reconstituted alga chlorophyll a/b-binding light-harvesting complexes of *Chlorella fusca* with different pigment compositions and pigment-protein stoichiometries. *Photosynth. Res.* 49, 71-81
- Mishra, R.K., N.P. Mishra, S. Kambourakis, M. Orfanopoulos und D.F. Ghanotakis (1996) : Generation and trapping of singlet oxygen during strong illumination of a photosystem II core complex. *Plant Sci.* 115, 151-155
- Miyao, M. (1994) : Involvement of active oxygen species in degradation of the D1 protein under strong illumination in isolated subcomplexes of photosystem II. *Biochemistry* 33, 9722-9730
- Monroy, A.F. und S.D. Schwartzbach (1984) : Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2786-2790
- Moore, T.A., D. Gust und A.L. Moore (1990) : The function of carotenoid pigment in photosynthesis and their possible involvement in the evolution of higher plants. In: *Carotenoids : Chemistry and Biology*, (N.I. Krinsky et. al. eds.), 223-228
- Moskalenko, A.A., und N.V. Karapetyan (1996) : Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes. *Z. Naturforsch.* 51c, 763-771
- Muchhal, U. und S.D. Schwartzbach (1992) : Characterization of a *Euglena* gene encoding a polyprotein precursor to the light harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II. *Plant Mol. Biol.* 18, 287-299
- Mullet, J., J.J. Burke, C.J. Arntzen (1980) : Chlorophyll-proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65, 814-822

- Mullineaux, C., und J.F. Allen (1986) : The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. *FEBS Lett.* 205, 155-160
- Murata, N. und K. Satoh (1986) : Absorption and fluorescence emission by intact cells, chloroplasts, and chlorophyll-protein complexes. In : *Light emission by Plants and Bacteria.* (Govindjee, J. Amesz und D.C. Fork eds.) 137-159, Academic Press, Inc.
- Neale, P. und A. Melis (1986) : Algal photosynthetic membrane complexes and the photosynthesis-irradiance curve: a comparison of light adaptation responses in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 22, 531-538
- Olaizola, M. und H.Y. Yamamoto (1994) : Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield of high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30, 606-612
- Olaizola, M., J. LaRoche, Z. Kolber und P.G. Falkowski (1994) : Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* 41, 357-370
- Öquist, C., W.S. Chow und J.M. Anderson (1992) : Photoinhibition of photosynthesis represent a mechanism for the long term regulation of photosystem II. *Planta* 186, 450-460
- Osafune, T., J.A. Schiff und E. Hase (1992) : Accumulation of LHCP II in wax-rich cells of *Euglena* in low light or in the presence of streptomycin. *J. of Strukt. Biolo.* 109, 97-108
- Owens, T.G., A.P. Sherve und A.C. Albrecht (1992) : Dynamics and mechanism of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophylls. Light harvesting and non-photochemical fluorescence quenching. In *Research in Photosynthesis. Vol.1,* (Murata, N. ed.) 171-178, Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Netherlands
- Panzer, J. (1986) : Der Einfluß von Pyridazinonen auf Entwicklungs- und Abbauvorgänge in Plastiden von *Euglena gracilis*. *Dilp. MLU Halle*
- Panzer, J. (1990) : Der Einfluß von Norflurazon auf die Aktivität und Stabilität des Photosyntheseapparates von *Euglena gracilis*. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Park, Y.-I., W.S. Chow, J.M. Anderson und V.H. Hurry (1996) : Differential susceptibility of photosystem II to light stress in light-acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and non-radiative dissipation of light. *Plant Sci.* 115, 137-149
- Paulsen, H., U. Rumler und W. Ruediger (1990) : Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181, 204-211
- Peltier, G., J. Ravenel und A. Verméglio (1987) : Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. *Biochim. Biophys. Acta* 893, 83-90
- Peltier, G., M. Havaux und J. Ravenel (1995) : Chlororespiration in unicellular green algae. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol.II* (P. Mathis, ed.) 887-890, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Perez-Lloréns, J.L., J.J. Vergara, R.R. Pino, I. Hernandez, G. Peralta und F.X. Niell (1996) : The effect of photoacclimation on the photosynthetic physiology of *Ulva curvata* and *Ulva rotundata* (Uvales, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 31, 349-359
- Peter, G.F. und J.P. Thornber (1991) : Biochemical composition and organisation of higher plants photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 16745-16754
- Peterman, E.J.G., C.C. Gradinaru, F. Calkoen, L.C. Borst, R. van Grondelle und H. van Amerongen (1997) : Xanthophyll in light-harvesting complex II of higher plants: Light harvesting and triplet quenching. *Biochemistry* 36, 12208-12215
- Pfündel, E. und A. Meister (1996) : Flow cytometry of mesophyll and bundle sheath chloroplast thylakoids of maize (*Zea mays* L.). *Cytometry* 23, 97-105

- Pfündel, E. und W. Bilger (1994) : Regulation and possible function of violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42, 89-109
- Pineau, B., G. Dubertret und R. Schantz (1985) : Functional and structural characterisation of chlorophyll in the developing photosynthetic membranes of *Euglena gracilis* Z. V.-separation and characterisation of pigment-protein complexes of the differentiated thylakoids. *Photosynth. Res.* 6, 159-174
- Plumley, F.G., T.A. Martinson und D.L. Herrin (1993) : Structural relationships of the photosystem I and photosystem II chlorophyll a/b and a/c light harvesting apoproteins of plants and algae. *Photochem. and Photobiol.* 57, 143-151
- Plumley, G.F. und G.W. Schmidt (1987) : Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 146-150
- Plumley, G.F. und G.W. Schmidt (1995) : Light-harvesting chlorophyll a/b complexes: interdependent pigment synthesis and protein assembly. *The Plant Cell* 7, 689-704
- Pošpišil, P. (1997) : Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. *Photosynthetica* 34, 343-355
- Powles, S.B. (1984) : Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 15-44
- Prasil, O., Z. Kolber, J.A. Berry und P.G. Falkowski (1996) : Cyclic electron flow around photosystem II in vivo. *Photosynth. Res.* 48, 395-410
- Preiss, S. und P. Thornber (1995) : Stability of the apoprotein of light-harvesting complex I and II during biogenesis of thylakoids in the chlorophyll b-less barley mutant *Chlorina f2*. *Plant Physiol.* 107, 709-717
- Prenzlín, B.B. und R.S. Alberte (1978) : Photosynthetic characteristics and organisation of chlorophyll in marine dinoflagellates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1801-1804
- Price C.A. und E.M. Reardon (1982) : Isolation of chloroplast for protein synthesis from spinach and *Euglena gracilis* by centrifugation in silica gels. In: *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, (Edelman, M., R.B. Hallick und N.H. Chua, eds.), 189-209, Elsevier, Amsterdam
- Pringsheim, E.G. und W. Wiessner (1961) : Ernährung und Stoffwechsel von *Chlamydomonas* (Volvocales). *Arch. Mikrobiol.* 40, 231-244
- Pursiheimo, S., E. Rintamäki, E. Baena-Gonzalez und E.-M. Aro (1998) : Thylakoid protein phosphorylation in evolutionary divergent species with oxygenic photosynthesis. *FEBS Letters* 423, 178-182
- Quick, W.P. und M. Stitt (1989) : An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 977, 287-296
- Ramm, D. und U.P. Hansen (1993) : Can charge recombination as caused by pH-dependent donor-side limitation in PS II account for high-energy dependent state quenching? *Photosynth. Res.* 35, 97-100
- Rikin, A. und S.D. Schwartzbach (1989) : Regulation by light and ethanol of the synthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II in *Euglena*. *Planta* 178, 76-83
- Rockholm, D.C., und H.Y. Yamamoto (1996) : Violaxanthin de-epoxidase - Purification of a 43 kDa luminal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride. *Plant Physiol.* 110, 697-703
- Roelofs, T.A., C.-H. Lee und A.R. Holzwarth (1992) : Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts. *Biophys. J.* 61, 1147-1163
- Römer, S., K. Humbeck und H. Senger (1990) : Relationship between biosynthesis of carotenoids and increasing complexity of photosystem I in mutant C-6D of *Scenedesmus obliquus*. *Planta* 182, 216-222

- Ruban, A.V. und P. Horton (1992) : Mechanism of  $\Delta$ pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes I: spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 30-38
- Ruban, A.V. und P. Horton (1994) : Spectroscopy of non-photochemical and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves; evidence for a role of the light harvesting complex of photosystem II in the regulation of energy dissipation. *Photosynth. Res.* 40, 181-190
- Ruban, A.V. und P. Horton (1995a) : An investigation of the sustained component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and leaves of spinach. *Plant Physiol.* 108, 721-726
- Ruban, A.V. und P. Horton (1995b) : Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 221-230
- Ruban, A.V., A.J. Young, A.A. Pascal und P. Horton (1994) : The effect of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 104, 227-234
- Ruban, A.V., D. Rees, A.A. Pascal, und P. Horton (1992a) : Mechanism of  $\Delta$ pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHC II aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 39-44
- Ruban, A.V., F. Calkoen, S.L.S. Kwa, R. van Grondelle, P. Horton und J.P. Dekker (1997) : Characterisation of LHC II in the aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1321, 61-70
- Ruban, A.V., P. Horton und A.J. Young (1993) : Aggregation of higher plant xanthophylls: Differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 21, 229-234
- Ruban, A.V., R.G. Walters und P. Horton (1992b) : The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes. Inhibition of  $\Delta$ pH-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS Letters* 309, 175-179
- Sàrvàri, E., P. Malatinszky und P. Nyitrai (1995) : Organisation of photosystem I antenna. In : *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, (Mathis, P. ed.) , Vol.1, 195-198, Kluwer Academic, Dordrecht
- Sagar, A.D., B.A. Horwitz, R.C. Elliott, W.F. Thompson und W.R. Briggs (1988) : Light effects on several chloroplast components in norflurazon-treated pea seedlings. *Plant Physiol.* 88, 340-347
- Sagar, A.D., und W.R. Briggs (1990) : Effects of high light stress on carotenoid-deficient chloroplast in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 94, 1663-1670
- Salvador, G., M. Lefort-Tran, V. Nigon und F. Jourdan (1971) : Structure et évolution du corps prolamellaire dans les proplastides d'*Euglena gracilis*. *Exp. Cell Res.* 64, 457-462
- Sandmann, G., M. Kuhn und P. Böger (1993) : Carotenoids in photosynthesis: protection of D1 degradation in the light. *Photosynth. Res.* 35, 185-190
- Sandmann, G., P.M. Bramley und P. Böger (1980) : The inhibitory mode of action of the pyridazinone herbicide norflurazon on a cell-free carotenogenic enzyme system *Pest. Biochem. Physiol.* 14, 185-191
- Scaduto, R.C.Jr. (1995) : Oxidation of DMSO and methansulfonic acid by the hydroxyl radical. *Free Radical Biology & Medicine* 18, 271-277
- Schäfer, C., V. Schmid und M. Roos (1994) : Characterization of high-light-induced increases in xanthophyll cycle pigment and lutein contents in photoautotrophic cell cultures. *J. Photochem- Photobiol. B: Biol.* 22, 67-75
- Scharma, P.K. und D.O. Hall (1992) : Changes in carotenoid composition and photosynthesis in sorghum under high light and salt stress. *Plant Physiol.* 140, 661-666

- Schiff, J.A., S.D. Schwartzbach, T. Osafune und E. Hase (1991) : Photocontrol and processing of LHCP II apoprotein in *Euglena*: possible role of Golgi and other cytoplasmatic sites. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 11, 219-236
- Schiller, H., M. Hühn und H. Dau (1998) : On the long-wavelength spectral forms of chlorophyll a in Photosystem I: Spectroscopic and immunological investigation on a greening mutants of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Photosynth. Res.* 55, 95-107
- Schmidt, A., A. Herold, C. Welte, A. Wild, und C. Wilhelm (1993) : The light-harvesting system of the unicellular alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae): evidence for the lack of a photosystem I-specific antenna complex. *Photochem. Photobiol.* 57, 132-138
- Schreiber, U. und C. Neubauer (1987) : The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Z. Naturforsch.* 42c, 1255-1264
- Schreiber, U. und C. Neubauer (1989) Correlation between dissipative fluorescence quenching at photosystem II and 50  $\mu$ s recombination luminescence. *FEBS Letters* 258, 339-342
- Schreiber, U., Schiwa, U. and Bilger W. (1986) : Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51-62
- Schreiber, U., T. Endo, H. Mi und K. Asada (1995) : Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse methods: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 36, 873-882
- Schubert, H., B.M.A. Kroon und H.C.P. Mattijs (1994) : In vivo manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *J. of Biological Chem.* 269, 7267-7272
- Setlik, I., S.I. Allakhverdiev, L. Nedbal, E. Setlikova und V.V. Klimov (1990) : Three types of photosystem II photoinactivation. I. Damaging processes on the acceptor side. *Photosynth. Res.* 23, 39-48
- Shaish, A., M. Avron, U. Pick und A. Ben-Amotz (1993) : Are active oxygen species involved in induction of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta* 190, 363-368
- Shigeoka, S., R. Yasumoto, T. Onishi, Y. Nakano und S. Kitaoka (1987) : Properties of momodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase and their participation in the regeneration of ascorbate in *Euglena gracilis*. *J. of General Microbiol.* 133, 227-232
- Siefermann-Harms, D. (1985) : Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta* 811, 325-355
- Siefermann-Harms, D. (1987) : The light-harvesting and protective function in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69, 561-568
- Siefermann-Harms, D. (1988) : Fluorescence properties of isolated chlorophyll-protein complexes. In : *Application of Chlorophyll Fluorescence* (H.K. Lichtenthaler ed.) 45-53, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Siefermann-Harms, D. (1990) : Protective function of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll-a/b-protein in pigment photooxidation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 4, 283-295
- Šiffel, P. and Z. Šesták (1988) : Low temperature fluorescence spectra of chloroplasts: methodical aspects and possible applications. In : *Application of Chlorophyll Fluorescence* (H.K. Lichtenthaler ed.) 55-61, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Sonoike, K. und I. Terashima (1994) : Mechanism of photosystem-I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L.. *Planta* 194, 287-293

- Spano, A.J., H. Ghaus und J.A. Schiff (1987) : Chlorophyll-protein complexes and other thylakoid components at the low intensity threshold in *Euglena* chloroplast development. *Plant Cell Physiol.* 28, 1101-1108
- Stegink, S.J. und K.C. Vaughn (1988) : Norflurazon (San-9789) reduces abscisic acid levels in cotton seedlings: a glandless isolate is more sensitive than its glanded counterpart. *Pest. Biochem. Physiol.* 31, 269-275
- Stys, D. (1995) : Stacking and separation of photosystem I and photosystem II in plant thylakoid membranes: A physico-chemical view. *Physiol. Plantarum* 95, 651-657
- Subczynski, W.M., E. Markowska und J. Siewiewski (1991) : Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion-concentration products. An EPR spin label study. *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 68-72
- Sukenik, A., J. Bennett und P. Falkowski (1987) : Light-saturated photosynthesis: Limitation by electron transport of carbon fixation ? *Biochim. Biophys. Acta* 891, 205-215
- Sukenik, A., J. Bennett und P.G. Falkowski (1987)
- Sulli, C. and S.D. Schwartzbach (1996) : A soluble protein is imported into *Euglena* chloroplasts as a membrane-bound precursor. *The Plant Cell* 8, 43-53
- Szabolcs, J. (1990) : Plant carotenoids. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology*. (N.I. Krinsky, M.M. Mathews-Roth und R.F. Taylor, eds.), 39-58, Plenum Press, New York
- Tan, S., G.R. Wolfe, F.X. Cunningham Jr. und E. Gantt (1995) : Decrease of polypeptides in the PS I antenna complex with increasing growth irradiance in the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosynth. Res.* 45, 1-10
- Tardy, F. und M. Havaux (1996) : Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 34, 87-94
- Telfer, A., S. Dhimi, S.M. Bishop, D. Phillips und J. Barber (1994) :  $\beta$ -carotene quenches singlet oxygen by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* 33, 14469-14474
- Terao, T. und S. Katoh (1996) : Antenna sizes of photosystem I and photosystem II in chlorophyll b-deficient mutants of rice. Evidence for an antenna function of photosystem II centres that are inactive in electron transport. *Plant Cell Physiol.* 37, 307-312
- Terao, T., K. Sonoike, J. Yamazaki, Y. Kamimura, und S. Katoh (1996) : Stoichiometries of photosystem I and photosystem II in rice mutants differently deficient in chlorophyll b. *Plant Cell Physiol.* 37, 299-306
- Thiele, A., Winter, K. and Krause, G.H. (1997) Low inactivation of D1 protein of photosystem II in young canopy leaves of *Anacardium excelsum* under high-light stress. *J. Plant Physiol.* 151: 286-292
- Thielmann, J., P. Galland und H. Senger (1991) : Action spectra for photosynthetic adaptation in *Scenedesmus obliquus*. I. Chlorophyll biosynthesis under autotrophic conditions. *Planta* 183, 334-339
- Ting, C.S. und T.G. Owens (1993) : Photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 101, 1323-1330
- Tjus, S.E., B.L.Møller und H.V. Scheller (1998) : Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiol.* 116, 755-764
- Trebst, A. und B. Depka (1997) : Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 400, 359-362
- Trissl, H.-W. und C. Wilhelm (1993) : Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem. Sci.* 18, 415-419
- Tschiersch, H. und E. Ohmann (1993) : Photoinhibition in *Euglena gracilis*: Involvement of reactive oxygen species. *Planta* 191, 316-323

- Tschiersch; H. (1992) : Photoinaktivierung der Photosynthese in *Euglena gracilis*: Untersuchungen zur ursächlichen Beteiligung von aktiven Sauerstoffspezies an der Photoinhibierung des Photosystem II. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Turconi, S., N. Weber, G. Schweitzer, H. Strotmann und A.R. Holzwarth (1994) : Energy transfer and charge separation kinetics in photosystem I: 2. Picosecond fluorescence study of various PS I particles and light-harvesting complex isolated from higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 324-334
- Uhrmacher, S., D. Hanelt und W. Nultsch (1995) : Zeaxanthin content and the degree of photoinhibition are linearly correlated in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Mar. Biol.* 123, 159-165
- Vaisberg, A.J. und J. A. Schiff (1976) : Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. *Plant Physiol.* 57, 260-269
- Vasil'ev, S., K.-D. Irrgang, T. Schrötter, A. Bergmann, H.-J. Eichler und G. Renger (1997) : Quenching of chlorophyll a fluorescence in the aggregates of LHC II: steady state fluorescence and picosecond relaxation kinetics. *Biochemistry* 36, 7503-7512
- Walker, D.A., Z.G. Cerovic und S.P. Robinson (1987) : Isolation of intact chloroplasts: general principles and criteria of integrity. *Methods in Enzym.* 148, 145-157
- Walters, R.G. und P. Horton (1991) : Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth. Res.* 27, 121-133
- Walters, R.G. und P. Horton (1993) : Theoretical assessment of alternative mechanism for non-photochemical quenching of PS II fluorescence in barley leaves. *Photosynth. Res.* 36, 119-139
- Walters, R.G., A.V. Ruban und P. Horton (1996) : Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14204-14209
- Wasielewski, M.R., P.A. Liddell, D. Barrett, T.A. Moore und D. Gust (1986) : Ultrafast carotenoid to pheophorbide energy transfer in a biometric model for antenna function in photosynthesis. *Nature* 322, 570
- Weis, E. (1985) : Chlorophyll fluorescence at 77K in intact leaves: Characterisation of a technique to eliminate artefacts related to self-absorption. *Photosynth. Res.* 6, 73-86
- Weis, E. und J.A. Berry (1987): Quantum efficiency of photosystem II in relation to „energy“-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 894, 198-208
- Wilhelm, C. (1990) : The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. *Plant Physiol. Biochem.* 28, 293-306
- Wilhelm, C. und J.-C. Duval (1990) : Fluorescence induction kinetics as a tool to detect a chlororespiratory activity in the prasinophycean alga *Mantoniella squamata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1016, 197-202
- Wilhelm, C., C. Büchel und B. Rouysseau (1988) : Isolation and characterization of a chlorophyll a/c heteroxanthin/diadinoxanthin light-harvesting complex from *Pleurochloris meiringensis* (Xanthophyceae). In: *Photosynthetic Light-Harvesting systems* (H. Scheer und S. Schneider eds.), 167-174, Walter de Gruyter & Co., Berlin
- Wilhelm, C., I. Leantz-Weiler, I. Wiedemann und A. Wild (1986) : The light-harvesting system of *Micromonas spec.* Butcher (Prasinophyceae): the combination of three different chlorophyll species in one single chlorophyll-protein complex. *Phycologia* 25, 304-312
- Wilhelm, C., J. Bida, A. Domin, C. Hilse, B. Kaiser, J. Kesselmeier, M. Lohr und A.M. Müller (1997) : Interaction between global climate change and the physiological responses of algae. *Photosynthetica* 33, 491-503
- Wilhelm, C., P. Krämer und I. Leantz-Weiler (1989) : The energy distribution between the photosystems and the light induced changes in stoichiometry of system I and II reaction centers in the chlorophyll b-containing alga *Mantoniella squamata*. *Photosynth. Res.* 20, 221-233

- Willemoës, M. und E. Monas (1991) : Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol. Plant.* 83, 449-456
- Williams, W.P. und J.A. Allen (1987) . State 1/state 2 changes in higher plants and algae. *Photosynth. Res.* 13, 19-45
- Winter, J. und P. Brandt (1986) : Stage-specific state I-state II transitions during the cellcycle of *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.* 81, 548-552
- Wolfe, G.R., F.X. Cunningham Jr., B. Grabowski und E. Gantt (1994) : Isolation and characterization of photosystem I and II from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1188, 357-366
- Yamamoto, H.Y. (1979) : Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure Appl. Chem.* 51, 639-648
- Young, A.J. (1993) : Factors that affect the carotenoid composition of higher plants and algae. In: *Carotenoids in Photosynthesis.*(A.J. Young und G. Britton, eds.) 161-205, Chapman and Hall, London
- Young, A.J. (1993) : Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. In: *Carotenoids in Photosynthesis.* (A.J. Young und G. Britton, eds.) 17-71, Chapman and Hall, London
- Young, A.J. und H.A. Frank (1996) : Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36, 3-15
- Zamir, A. (1995) : Studies defences against excessive light studied in the microalga *Dunaliella*. *Endeavour* 19, 152-156
- Zuchelli, G., R.C. Jennings und F.M. Garlaschi (1990) : The presence of long-wavelength chlorophyll a spectral forms in the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 6, 381-394

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle/S., den 24.03.99

## DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Ohmann für die Überlassung des Themas, für wertvolle Anregungen und Diskussionen sowie das Ermöglichen der Aufenthalte in verschiedenen Arbeitsgruppen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Tschiersch für die zahlreichen Diskussionen und die vielfältige Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau J. Eichler für die technische Unterstützung insbesondere bei der Entwicklung der Methoden zur Separation der Pigment-Proteinkomplexe.

Auch Herrn Dr. U. Metzger sei für seine computer-technische Unterstützung gedankt. Mein Dank gilt hier auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzen- und Zellphysiologie.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei folgenden Wissenschaftlern bedanken:

Herrn PD Dr. B. Grimm, Gatersleben (Antikörper PSI)

Herrn Prof. Dr. U. Johannigmeier, Halle (Antikörper D1; CP43)

Herrn Dr. H. Lokstein; Berlin (zahlreiche Diskussionen)

Herrn Dr. E. Pfündel, Gatersleben (Benutzung des Fluorometers)

Herrn PD Dr. P. Ruedi, Zürich (Carotinoidstandards; Einführung in Methoden zur Identifizierung von Pigmenten)

Herrn PD Dr. C. Schäfer, Bayreuth (Antikörper LHC I, LHC II)

Herrn Prof. Dr. H. Senger (Einführung in die HPLC-Technik)

Herrn Prof. Dr. C. Wilhelm (Benutzung des Fluorometers)

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Karsten für sein Verständnis und die vielfältige Unterstützung sowie meinen Kindern Lukas und Jenny.

## **LEBENS LAUF**

Name	Maria Doege
Geburtsdatum	02.05.1967
Geburtsort	Büttstedt
Nationalität	deutsch
Staatsangrhörigkeit	BRD
Familienstand	verheiratet

### **Bildungsweg**

1973-1983	Polytechnische Oberschule in Küllstedt
1983-1985	Berufsausbildung an der BS Deutsche Post in Erfurt
1985-1987	Volkshochschule in Leinefelde, Abitur-Abschluß
1987-1989	Studium der Biologie und Chemie an der PH Wolfgang Radke Köthen
1989-1991	Studium der Biologie und Chemie an der PH Halle
1991-1992	Studium der Biologie und Chemie an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg (Erstes Staatsexamen für Lehramt am Gymnasium)
seit 1993	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzen- und Zellphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### **sonstige Tätigkeit**

1985-1987	Arbeit als Facharbeiter für Postverkehr im Postamt Leinefelde
-----------	---

Halle/S., den 24.03.99