

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

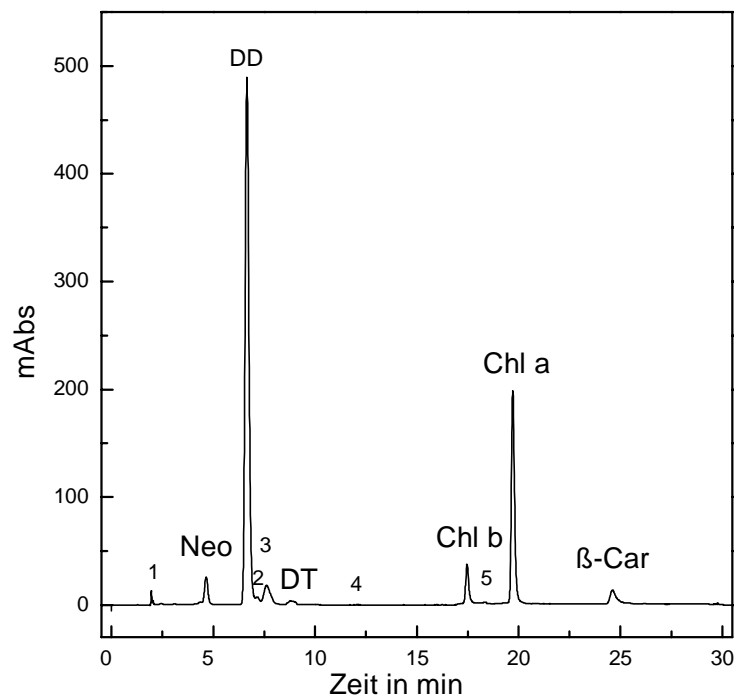


Abb.1 HPLC-Chromatogramm von *Euglena gracilis* (445 nm) (mixotroph, 6d, 25°C, 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

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 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
Neoxanthin	0,051	0,068	0,123	0,240	0,218	0,221
Diadinoxanthin	1,290	2,051	2,536	3,297	3,610	4,415
Diatoxanthin	0,071	0,108	0,023	0,024	0,018	0,020
Canthaxanthin	n.b.	n.b.	n.b.	0,008	0,021	0,085
β-Carotin	0,148	0,116	0,236	0,370	0,489	0,610
Chlorophyll a	5,145	7,113	8,622	10,879	7,611	6,332
Chlorophyll b	0,229	0,625	0,761	1,089	0,747	0,494
Σ Carotinoide	1,560	2,340	2,918	3,930	4,418	5,449
Σ Car/Σ Chl	0,290	0,302	0,310	0,328	0,528	0,798
Chl a / Chl 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 β -Cryptoxanthin gefunden. Echinenon hatte einen Anteil von 0,09% und β -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 β -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).

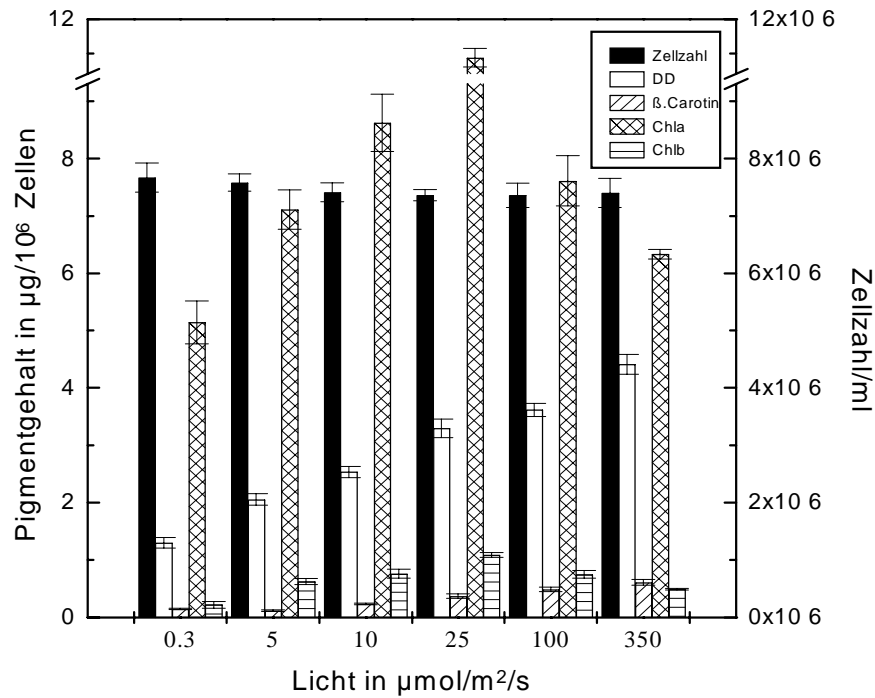


Abb.2 Einfluß der Lichtintensität auf einzelne Carotinoide und Chlorophylle sowie die Zellzahl/ml Kulturmedium während des mixotrophen Wachstums ; n = 5-12

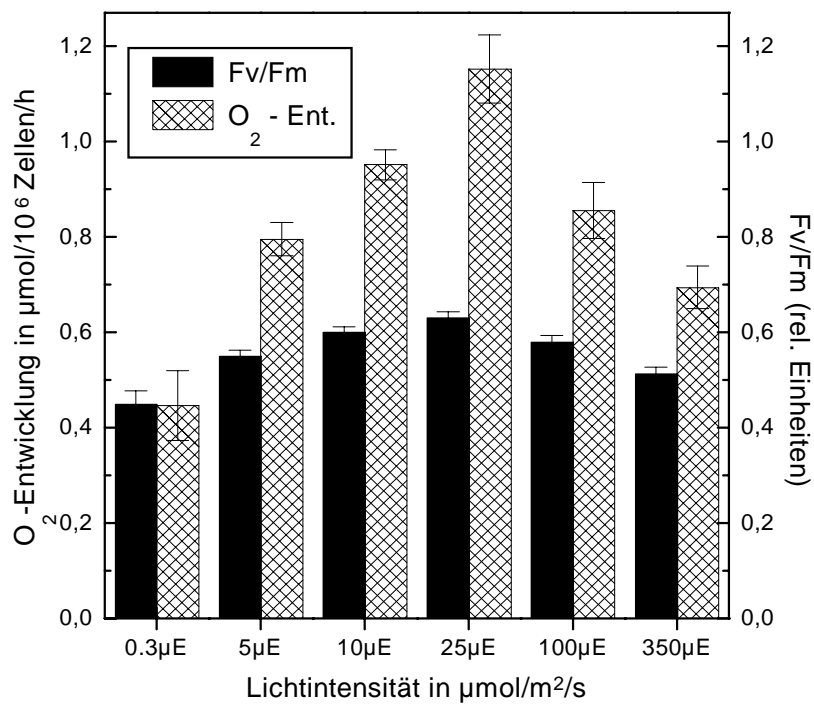


Abb.3 Einfluß der Lichtintensität auf den Quotienten Fv/Fm (rel. Einheiten) sowie auf die photosynthetische Sauerstoffentwicklung in $\mu\text{mol}/10^6$ Zellen/h während des mixotrophen Wachstums; n = 4

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).

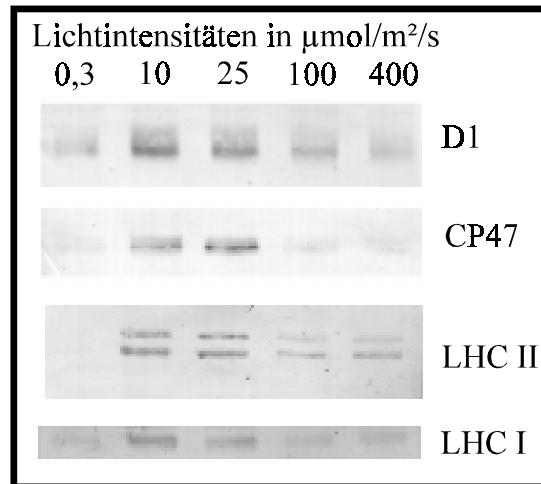


Abb.4 Immunologische Untersuchung des D1-Protein, des CP47, des LHC II und des LHC I nach Anzucht unter unterschiedlichen Lichtintensitäten; pro Bahn wurden die Proteine aus 10^6 Zellen aufgetragen

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).

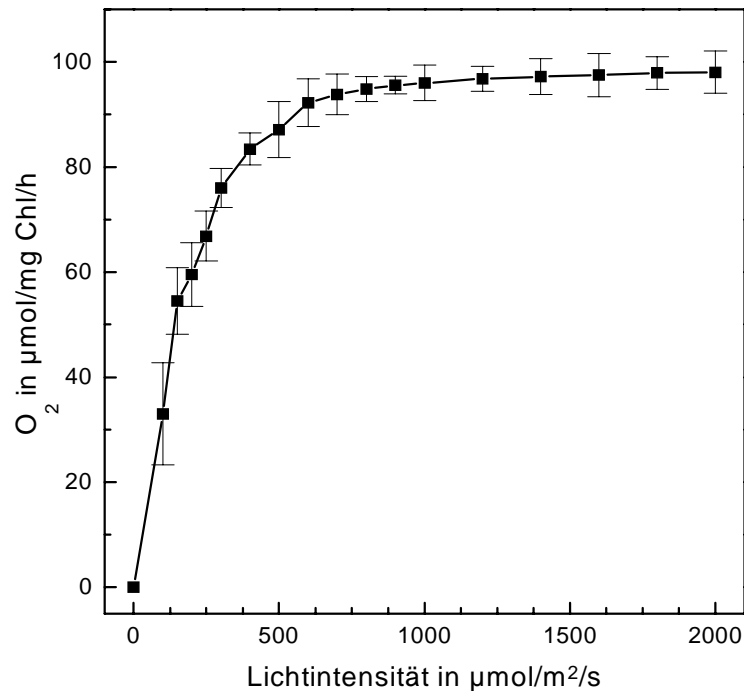


Abb.5 Lichtsättigungskurve der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung mixotropher Zellen von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration 20µg/ml; n = 5

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, ΔpH -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.

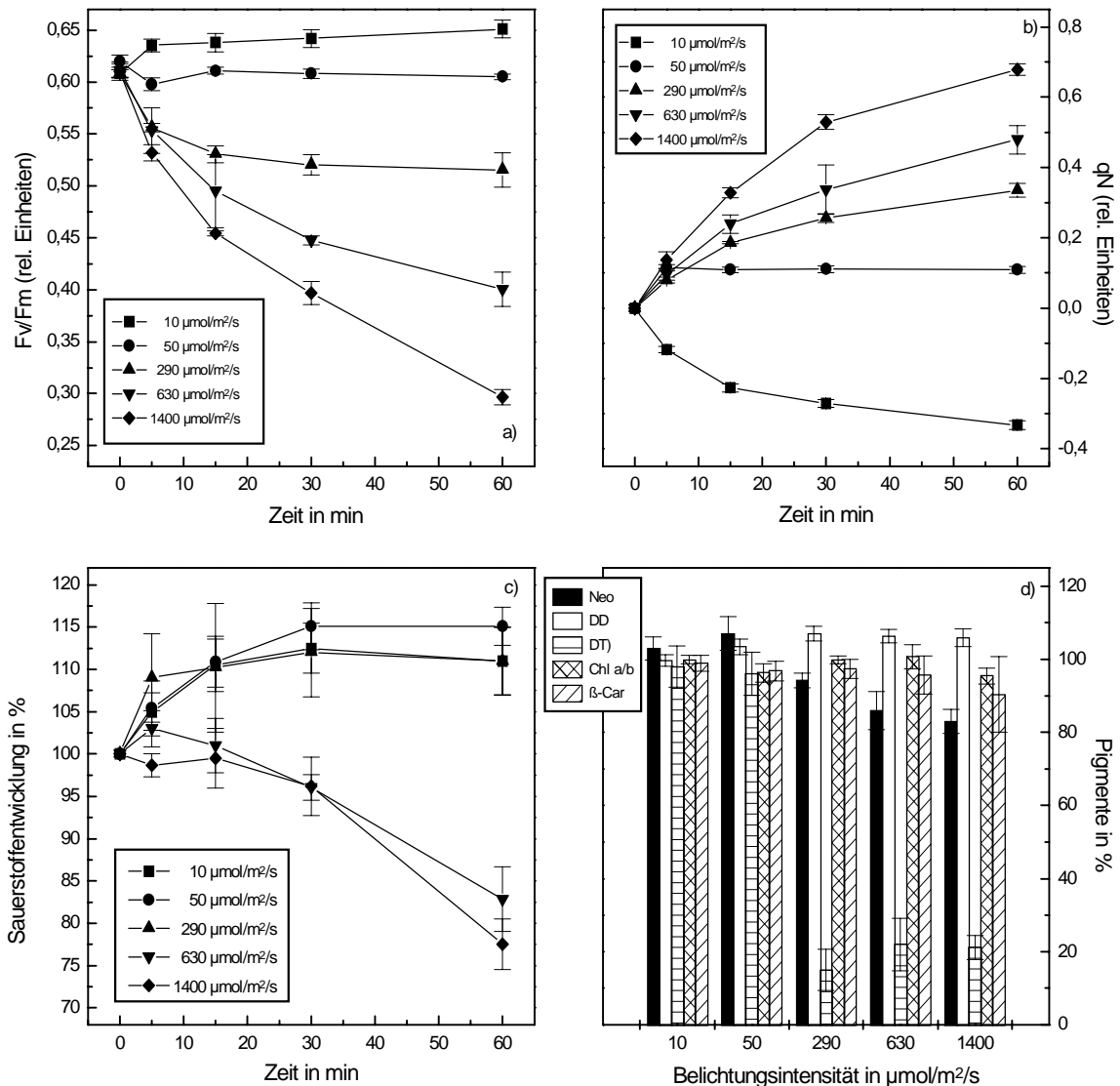


Abb.6 Einfluß von 60minütiger Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten auf Fv/Fm 6a); qN 6b); Sauerstoffentwicklung (100%: $97,9 \pm 2,5 \mu\text{mol/mg Chl/h}$) 6c) und den Pigmentgehalt (100% siehe Tab.4) 6d) unbehandelter Zellen von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration $20\mu\text{g/ml}$;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

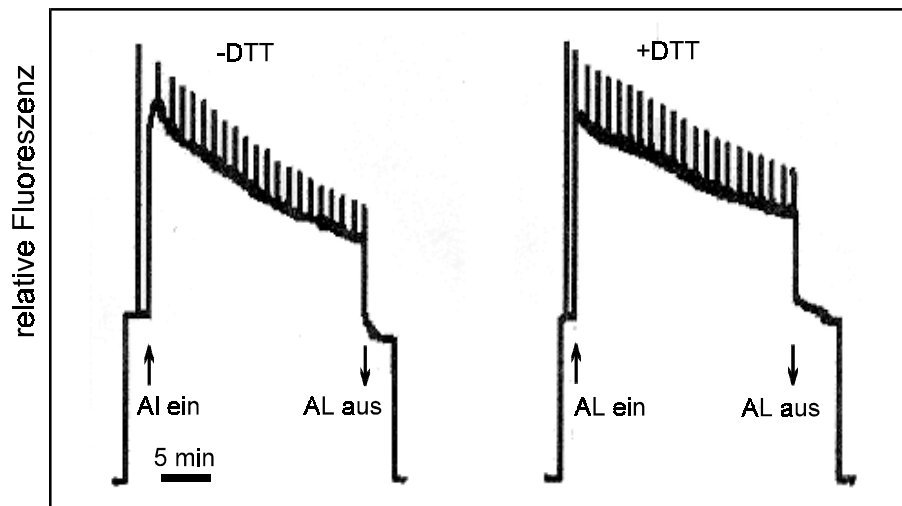


Abb.7 Wirkung von DTT ($50 \mu\text{M}$) auf die Chlorophyll a-Fluoreszenz von *Euglena gracilis* während 20minütiger Belichtung mit einer Intensität von $600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; Chl-Konzentration $12 \mu\text{g}/\text{ml}$; Proben 10 min vor Belichtung dunkeladaptiert

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 μ M) während der Belichtung mit 600 μ mol/m²/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_o	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 I₅₀-Wert für die photosynthetische Sauerstoffentwicklung bei *Euglena* liegt bei 20 μ M NF und für die Hemmung der Ergrünung bei 0,35 μ 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 CO₂-

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 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

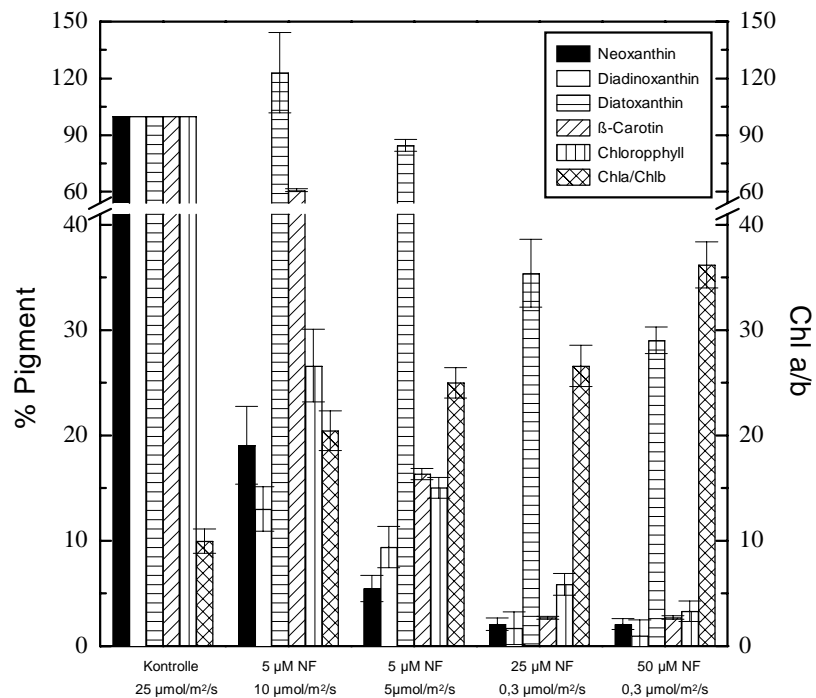


Abb.8 Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen des Phytoendesaturaseinhibitors Norflurazon auf den Pigmentgehalt und das Chl a/b Verhältnis während des mixotrophen Wachstums im Vergleich zur unbehandelten Kultur (Kontrolle) (erhöhte NF-Konzentrationen erfordern die Verminderung des Anzuchtlichtes); 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 Carotinoiden 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 μM NF 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	+5 μM NF 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	+25 μM NF 0,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	+50 μM NF 0,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
Neoxanthin	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
Diadinoxanthin	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
Diatoxanthin	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
β-Carotin	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
Σ Carotinoide	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
Σ Chlorophyll	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
Chl a/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
DD/DT	172 \pm 2,140	20,8 \pm 0,560	17,3 \pm 0,960	7,60 \pm 1,1000	5,33 \pm 0,3020
Fv/Fm	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
O₂-Produktion	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

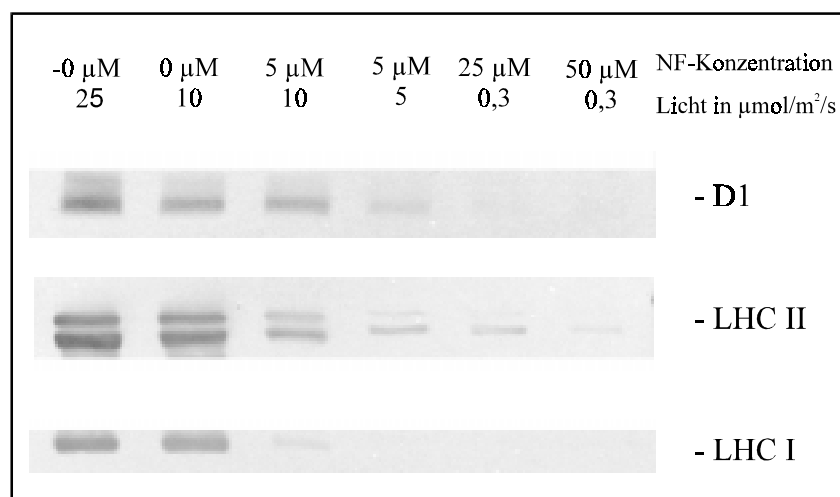


Abb.9 Einfluß des Carotinoidgehaltes von *Euglena gracilis* auf den Gehalt an D1-Protein, LHC II und LHC I (Western-Blots); 1 Mill. Zellen pro Bahn

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.

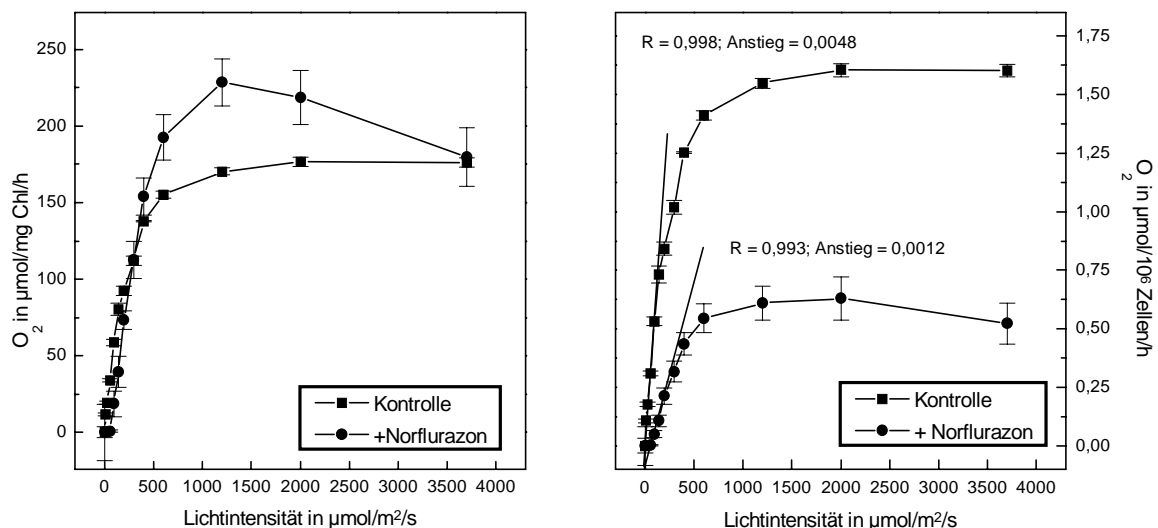


Abb.10 Lichtsättigungskurven der photosynthetischen Sauerstoffproduktion von *Euglena gracilis*; Kontrolle: Anzucht bei $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ -Norflurazon; carotinoidverarmte Zelle: Anzucht bei $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ + $5 \mu\text{M}$ Norflurazon; a) Sauerstoffproduktion 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 α , 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 β -Carotins zurück.

Die von uns eingesetzten stark carotinoidreduzierten Zellen besitzen jedoch noch 100% des β -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 β -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 β -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.

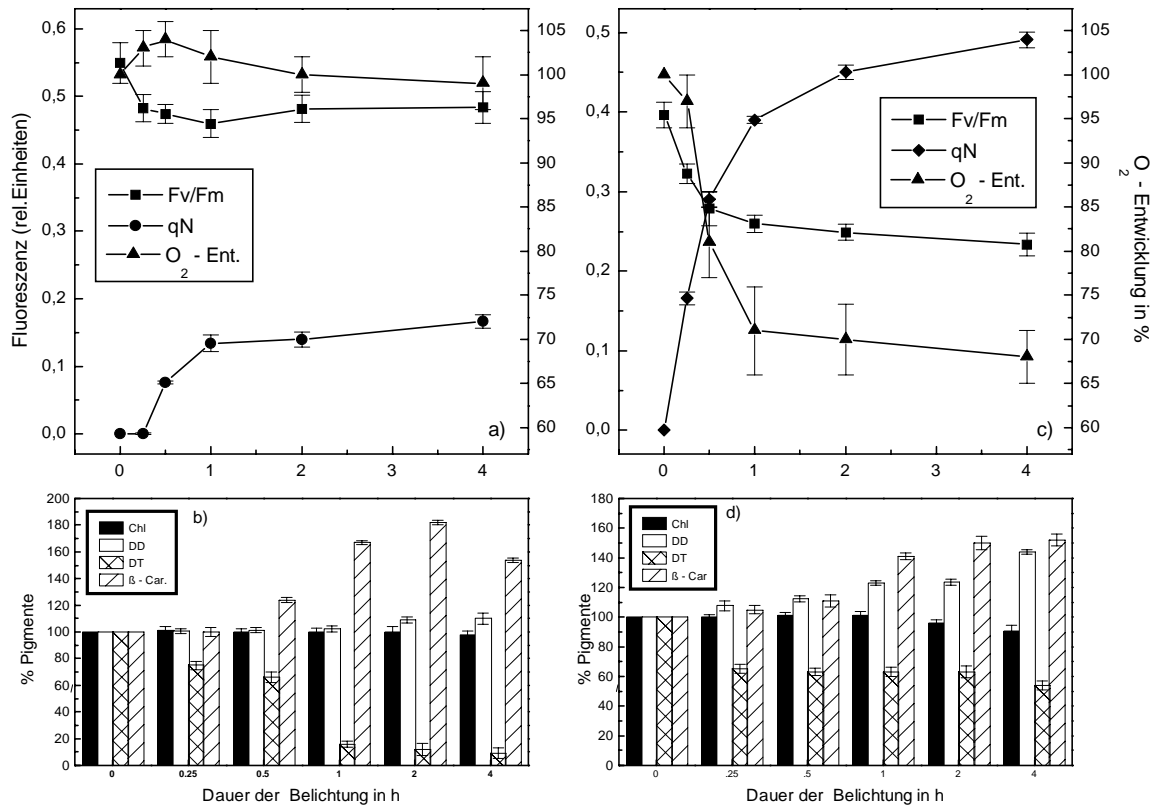


Abb.11 Einfluß der Belichtung (4h) mit einer Intensität von $290 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ auf Fv/Fm, qN, die photosynthetische Sauerstoffproduktion und auf den Pigmentgehalt bei a) + b) unbehandelten und c) + d) carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis* (beide Kulturen 6d bei $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 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 unbehandelten Kontrolle über den Versuchszeitraum nicht abnahm.

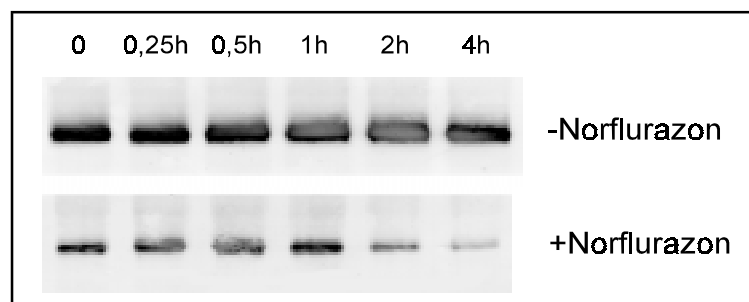


Abb.12 Einfluß der vierstündigen Belichtung mit einer Intensität von $290 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ auf den Gehalt des D1-Proteins von unbehandelten (-NF) und carotinoidverarmten Zellen (+NF), Western-Blots; 2 Mill. Zellen pro Bahn

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% β -Carotin, während in der Kontrolle 120% DD und 92% β -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 β -Carotin der Kontrolle enthielten.

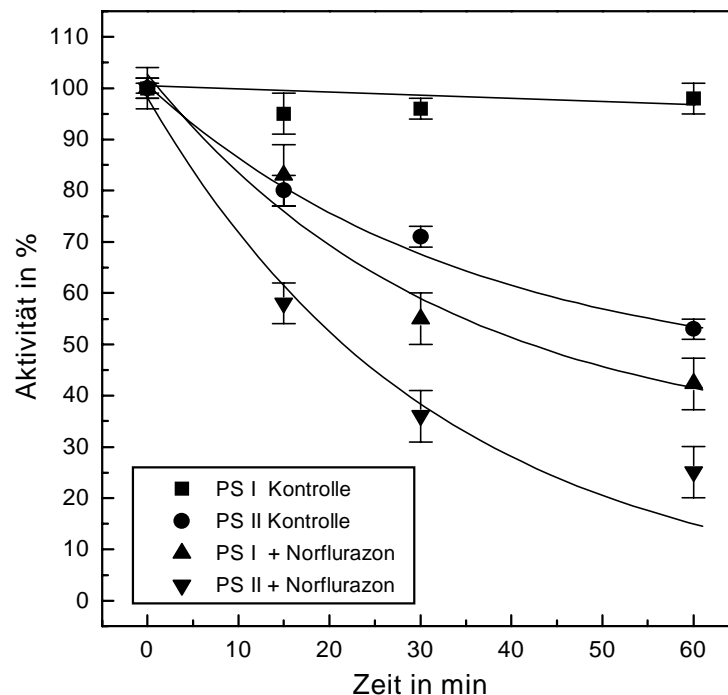


Abb.13 Einfluß von Starklicht ($1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) auf die PS I- und PS II-Aktivität in unbehandelten und carotinoidverarmten Chloroplasten von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration: $20 \mu\text{g}/\text{ml}$; ($n = 3$)

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 Photoinhibition 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.

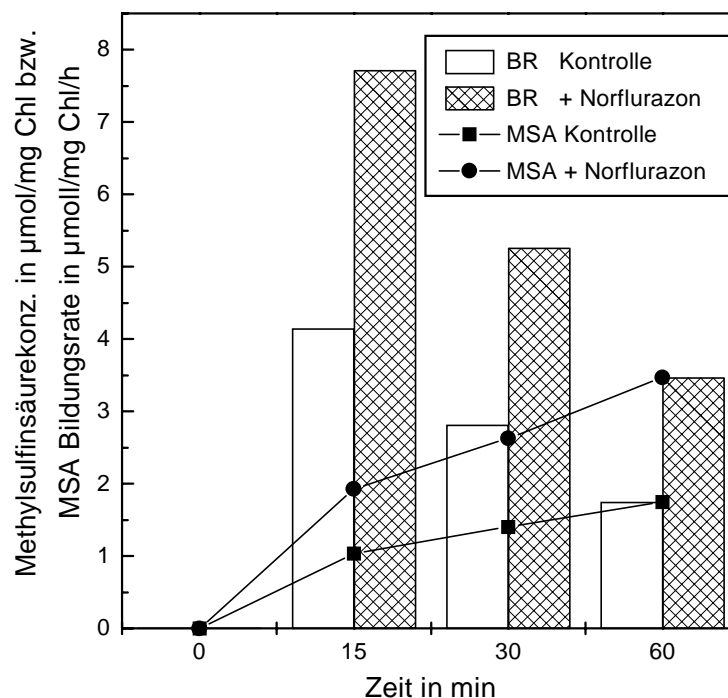


Abb.14 Einfluß von Starklicht ($1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) auf die Konzentration und Bildungsrate der Methylsulfinsäure in unbehandelten und carotinoidverarmten Chloroplasten von *Euglena gracilis*; Chl-Konzentration $20 \mu\text{g}/\text{ml}$; $n = 5$

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 $q_{N_{SV}}$ (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“ (q_E), die mittlere Phase der Energieumverteilung aufgrund von „state transitions“ (q_T) und die langsame Phase der Photoinhibierung (q_I) 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.

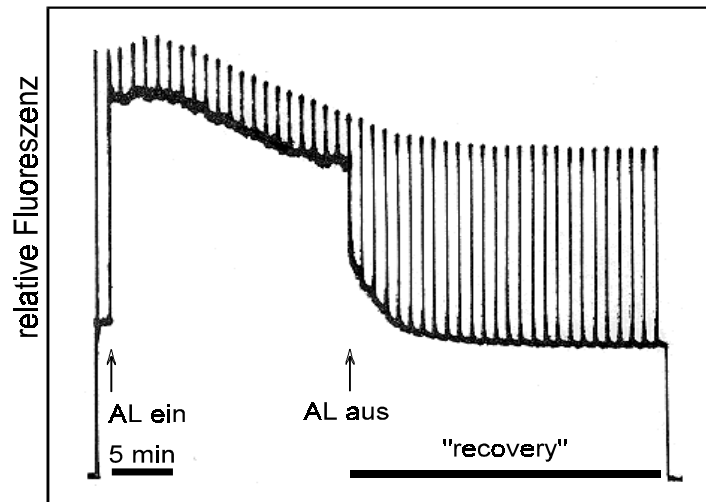


Abb.15 Fluoreszenzverhalten von *Euglena gracilis* nach 5minütiger Dunkelinkubation während der Belichtung mit $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ und anschließendem „recovery“ im Dunkeln; OD = 1,1

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

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.

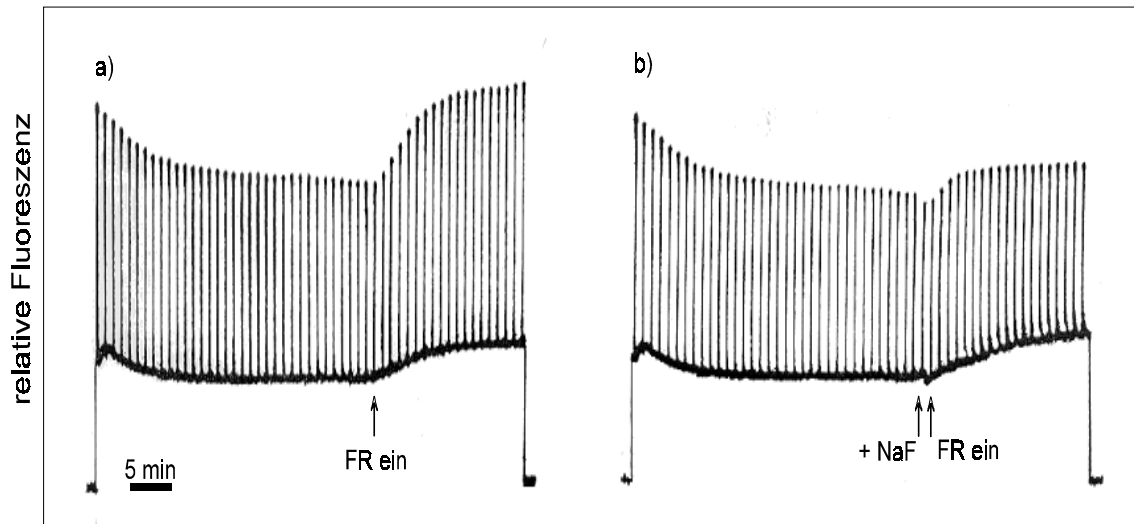


Abb.16 Einfluß der Dunkelinkubation (34 min) auf die Fluoreszenz von *Euglena gracilis* sowie der Einfluß des Phosphataseinhibitors NaF auf das „recovery“ unter FR-Licht; a) - NaF; b) + NaF; OD = 1,1

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 Δ 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 μM 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

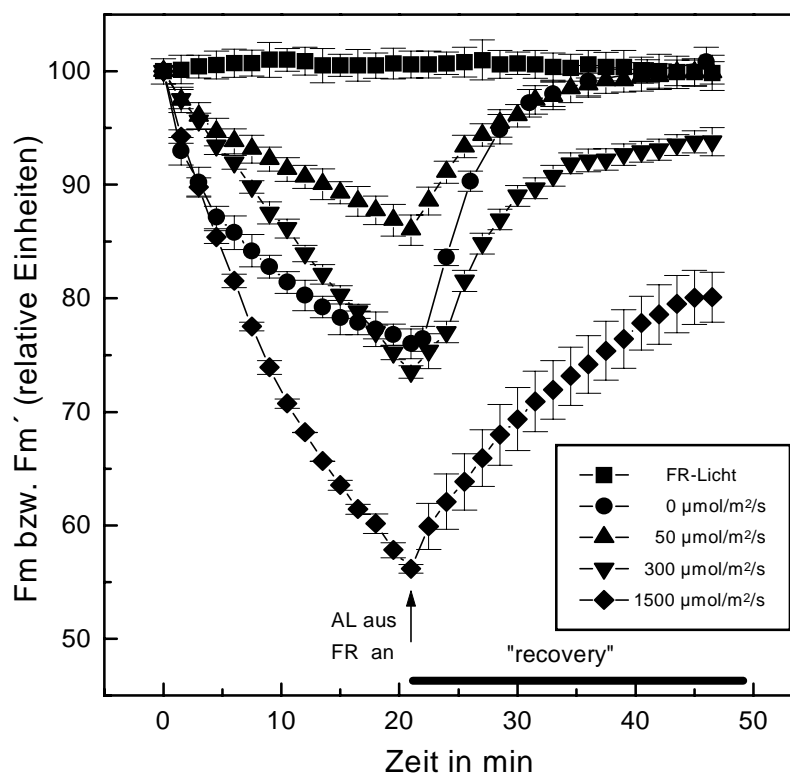


Abb.17 Einfluß unterschiedlicher Belichtungsintensitäten (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ und 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) und der Dunkelinkubation auf die maximalen Fluoreszenz von *Euglena gracilis*; „recovery“ unter FR-Licht ; Belichtungsdauer 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_{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_{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 %*
0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	76,00	83,08	0,609	0,279	-	0,315	0,204	100,0
50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	85,82	90,90	0,620	0,170	0,799	0,165	0,100	107,5
300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	73,80	88,90	0,568	0,346	0,337	0,355	0,124	106,3
1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	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 gequenchet 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
0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$100,80 \pm 1,3$	$102,80 \pm 0,6$	$0,643 \pm 0,006$	-	-	4,60
50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$99,86 \pm 1,8$	$100,00 \pm 2,0$	$0,641 \pm 0,005$	$0,002 \pm 1,8 \times 10^{-5}$	$1,21 \pm 0,9$	3,95
300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$93,38 \pm 2,0$	$98,97 \pm 2,1$	$0,619 \pm 0,009$	$0,071 \pm 8 \times 10^{-4}$	$20,00 \pm 1,2$	5,15
1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$80,10 \pm 3,1$	$95,90 \pm 3,2$	$0,573 \pm 0,010$	$0,248 \pm 0,025$	$32,80 \pm 2,5$	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.

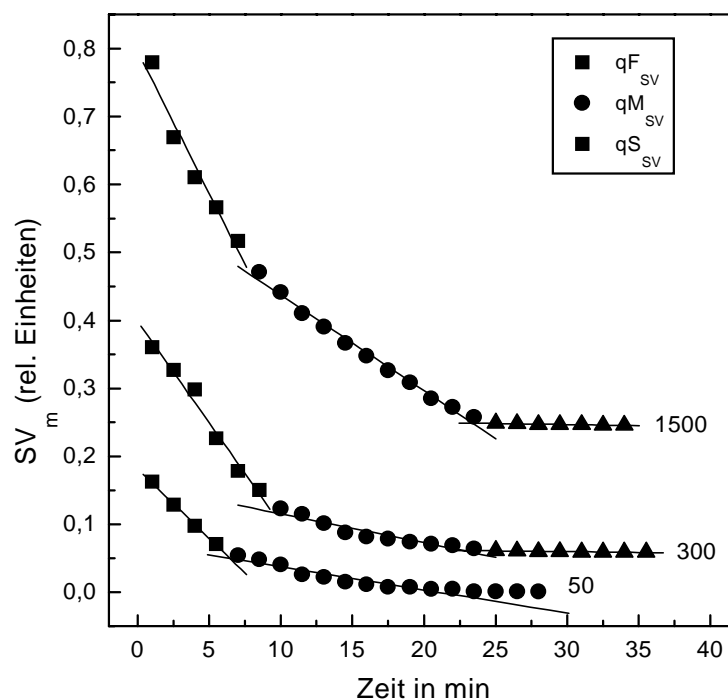


Abb.18 Lineare Anpassung der SV_m „recovery“-Daten (vgl. Abb.17) nach 21minütiger Belichtung von *Euglena gracilis* mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ und $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), „recovery“ mit FR-Licht

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
50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	64,5 ± 1,5	2,6	35,4 ± 7,9	6,5	-	-
300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	52,4 ± 7,1	4,0	28,9 ± 5,6	6,7	18,6 ± 1,4	> 30
1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	27,5 ± 10,3	3,1	30,6 ± 2,8	7,4	41,9 ± 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% ± 0,6% des Ausgangswertes gelöscht. Die Grundfluoreszenz nahm auf 93,38% ± 2,0% des Ausgangswertes ab. Der Zusatz von NaF nach Belichtung verhinderte die Relaxation von Fm zu einem großen Teil. Ein 31,52% ± 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.

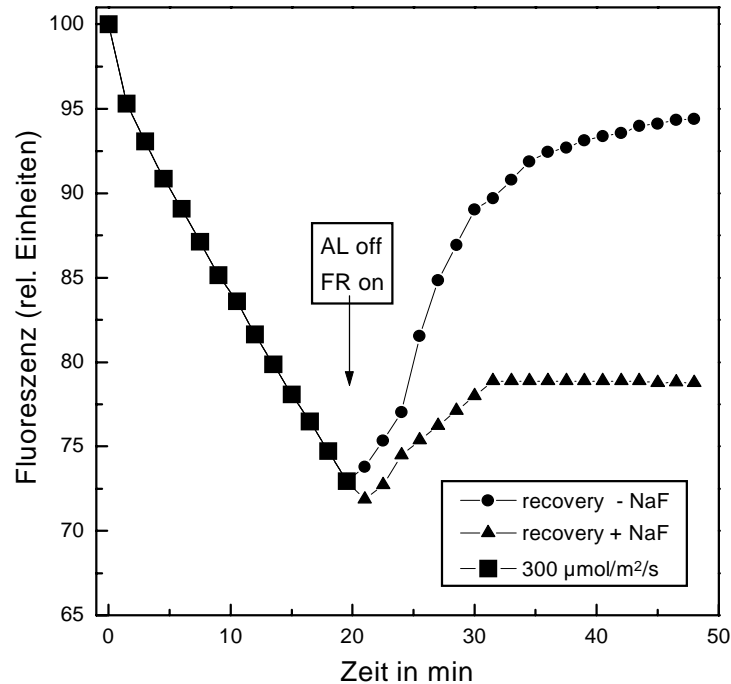


Abb.19 Einfluß des Phosphataseinhibitors NaF (20 mM) auf das „recovery“ von Fm nach 21minütiger Belichtung mit $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; Chl-konzentration: $12 \mu\text{g}/\text{ml}$

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 ΔpH -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.

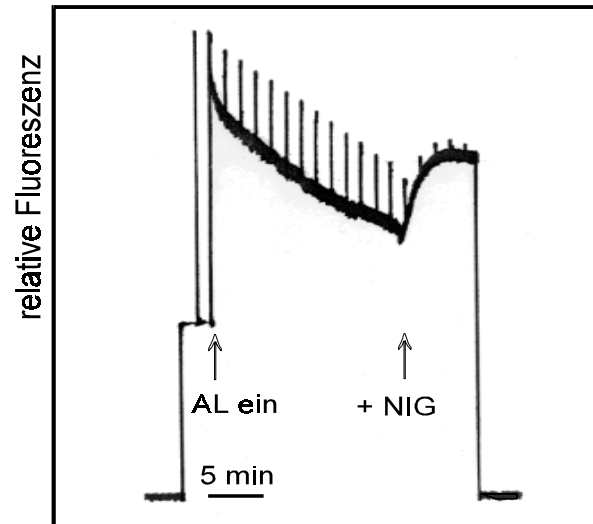


Abb.20 Einfluß von Nigericin ($60 \mu\text{M}$) auf die PS II-Fluoreszenz von *Euglena gracilis*; Belichtung $300 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$; Zugabe von Nigericin in der 20. Belichtungsminute

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 ΔpH -abhängigen Quench an SV_m ; $n = 3-5$

	SV_m	qE_{SV}	$qE_{\text{SV}}\%$
0 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	$0,315 \pm 0,043$	0,066	$21,04 \pm 1,50$
50 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	$0,165 \pm 0,041$	0,117	$71,00 \pm 3,92$
300 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	$0,355 \pm 0,020$	0,123	$34,91 \pm 3,95$
1500 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	$0,758 \pm 0,059$	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_{SV} . So war bei der Belichtung mit Starklicht noch $13,92\% \pm 1,54\%$ von SV_m vom Aufbau eines Protonengradienten abhängig.

Bis in die Bereiche der Lichtsättigung ist eine Zunahme des absoluten Wertes von qE_{SV} an 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 ΔpH -abhängige als auch der ΔpH -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 ΔpH -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 ΔpH -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 ΔpH -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 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 ΔpH -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 ΔpH -abhängige Quench bei *Euglena gracilis* unterschied sich in der HWZ stark von den Literaturdaten für höhere Pflanzen. Für die schnelle, ΔpH -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).

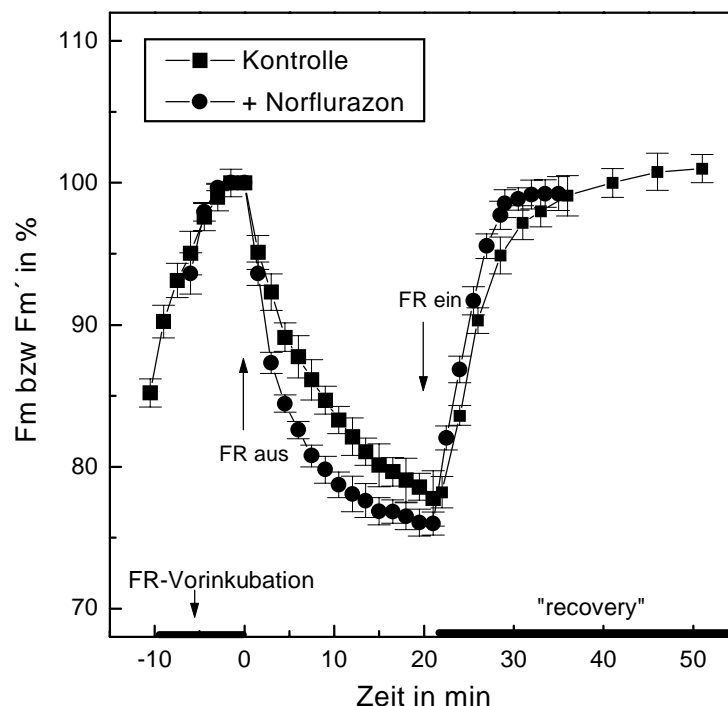


Abb.21 Einfluß der Dunkelinkubation auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen (Anzucht: + 5 μM Norflurazon) und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle); Chl-Konzentration: Kontrolle = 12 $\mu\text{g/ml}$, +Norflurazon = 3,6 $\mu\text{g/ml}$; n = 3-5

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.

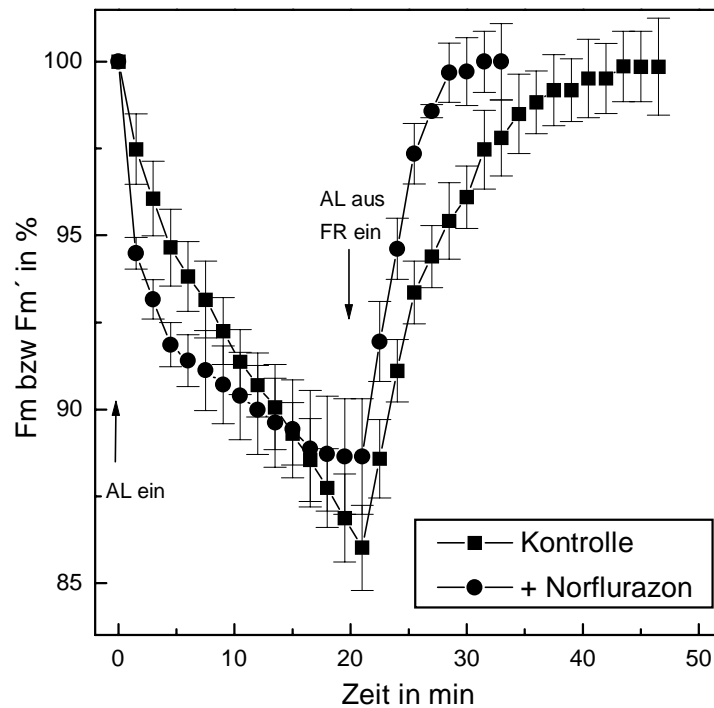


Abb.22 Einfluß der Belichtung ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zur Kontrolle; Bedingungen wie bei Abb.21; $n = 3-5$;

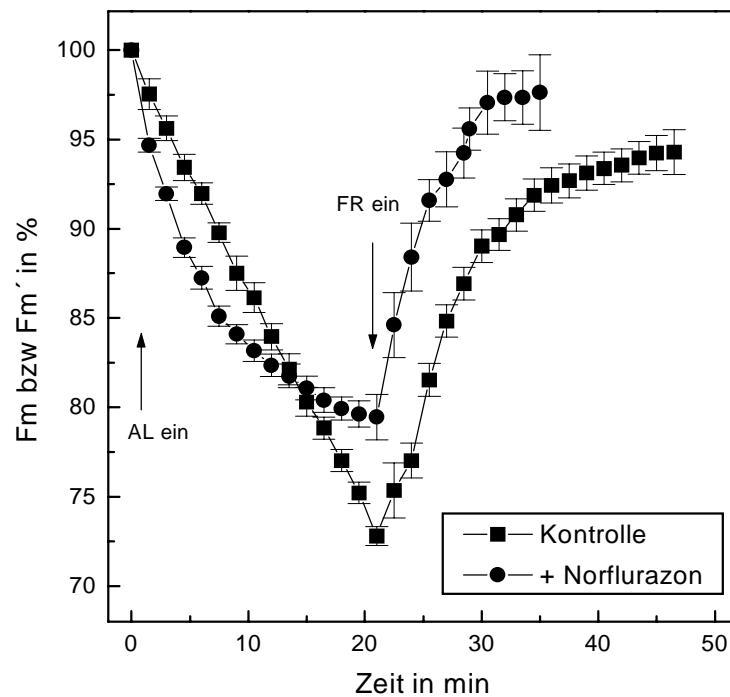


Abb.23 Einfluß der Belichtung ($300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zur Kontrolle; Bedingungen wie bei Abb.21; $n = 3-5$;

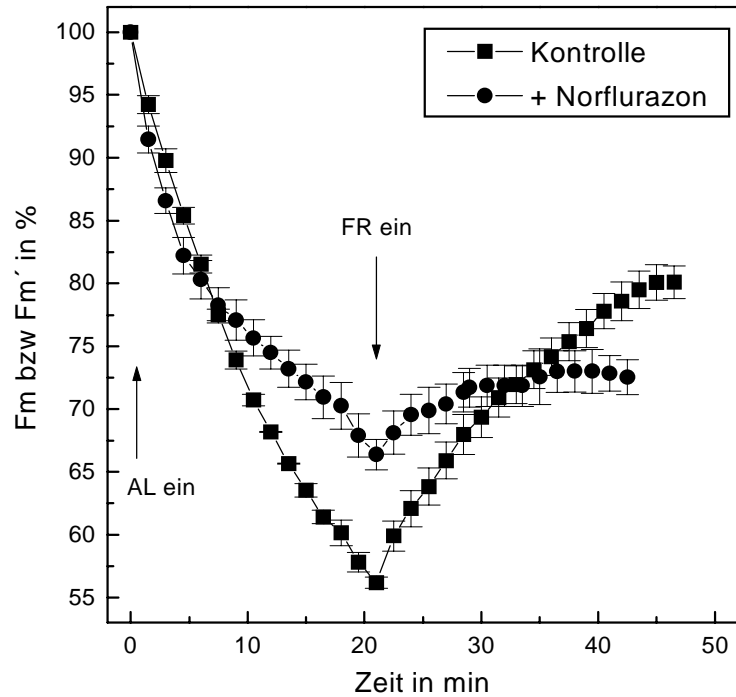


Abb.24 Einfluß der Belichtung ($1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) auf die maximale Fluoreszenz carotinoidverarmter Algen und das „recovery“ unter FR-Licht im Vergleich zur Kontrolle; Bedingungen wie bei Abb.21; $n = 3-5$;

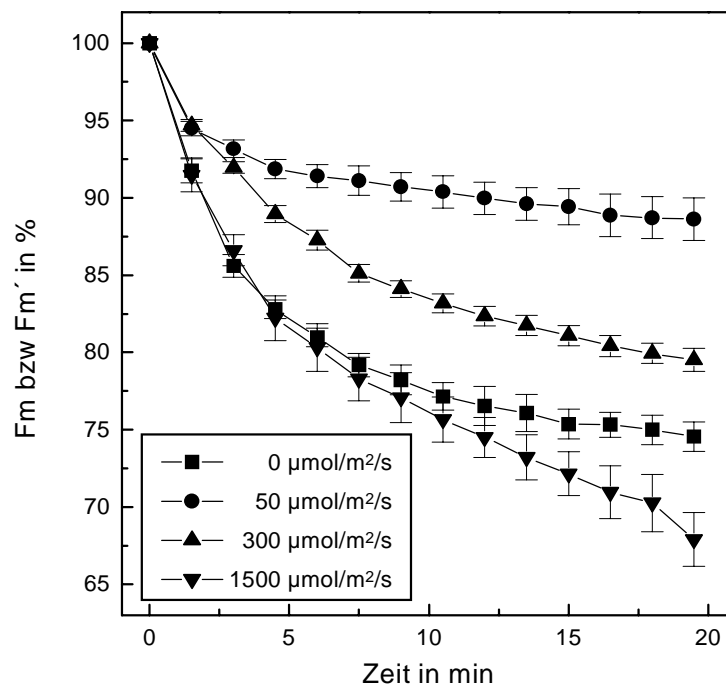


Abb.25 Zusammenfassende Darstellung der Löschung der maximalen Fluoreszenz durch Licht unterschiedlicher Intensitäten oder Dunkelinkubation carotinoidverarmter Zellen; Bedingungen wie in der Abb. 21; $n = 3-5$

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 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; O_2 -Ent. = Sauerstoffproduktion in %; KO: Kontrolle; NF: carotinoidverarmte Zelle (5 μM Norflurazon in der Anzucht); * ohne FR-Vorinkubation

100% der 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 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'	O_2 -Ent.*
KO / 0	0,315	0,204	0,278	5,02	-	-	0,609	100,0
NF / 0	0,342	0,098	0,386	2,80	-	-	0,408	100,0
KO / 50	0,165	0,100	0,170	7,50	0,799	0,492	0,620	107,1
NF / 50	0,128	0,035	0,191	1,81	0,923	0,425	0,460	102,3
KO / 300	0,355	0,124	0,346	9,51	0,337	0,203	0,568	106,5
NF / 300	0,262	0,080	0,334	4,10	0,547	0,232	0,424	97,8
KO/1500	0,758	0,079	0,640	6,52	0,073	0,027	0,409	91,2
NF/ 1500	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
0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$74,45 \pm 0,948$	$99,59 \pm 0,99$	-	-	2,93
50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$88,64 \pm 1,370$	$100,00 \pm 0,9$	0,000	0,01	2,83
300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$79,28 \pm 0,744$	$97,25 \pm 2,3$	0,028	10,62	3,04
1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	$67,00 \pm 1,730$	$72,85 \pm 1,3$	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.

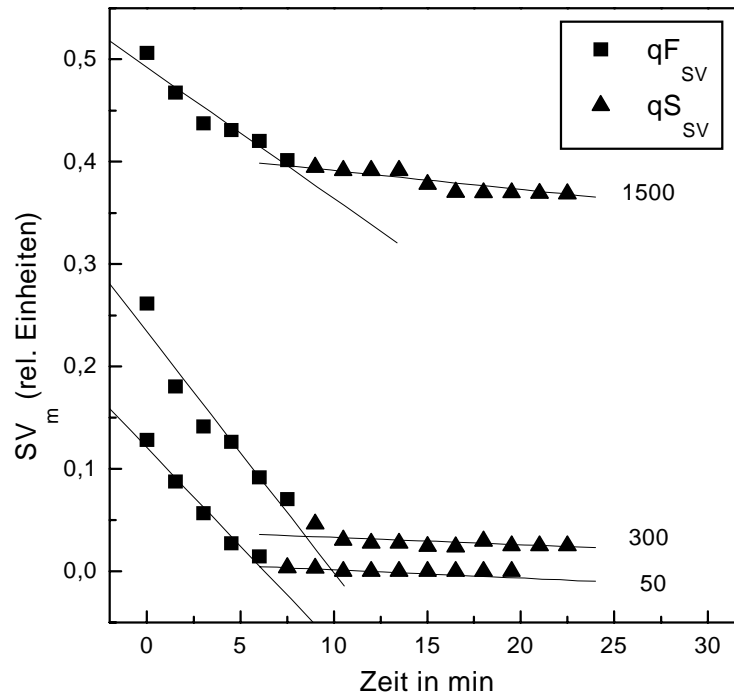


Abb.26 Lineare Anpassung der SV_m „recovery“-Daten nach 21minütiger Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ und $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) von carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*;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

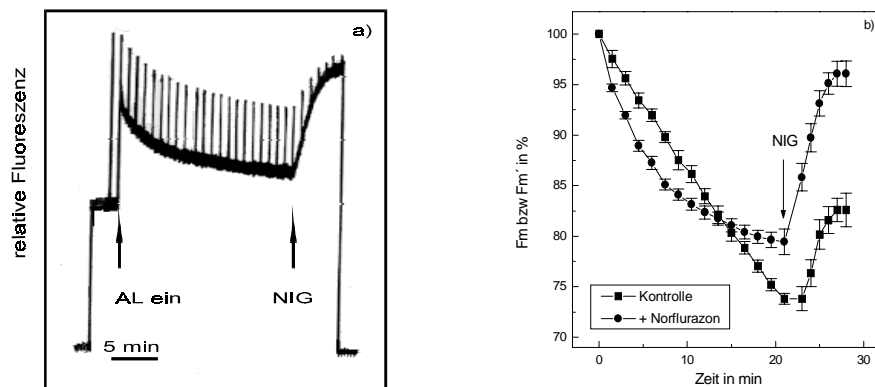


Abb.27 Einfluß von Nigericin auf die Fluoreszenz von *Euglena gracilis*; a) Fluoreszenzprotokoll der Nigericinwirkung ($60 \mu\text{M}$) auf carotinoidverarmter Zellen nach 21 min Belichtung mit $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; b) Vergleich der Nigericinwirkung ($60 \mu\text{M}$) auf carotinoidverarmte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

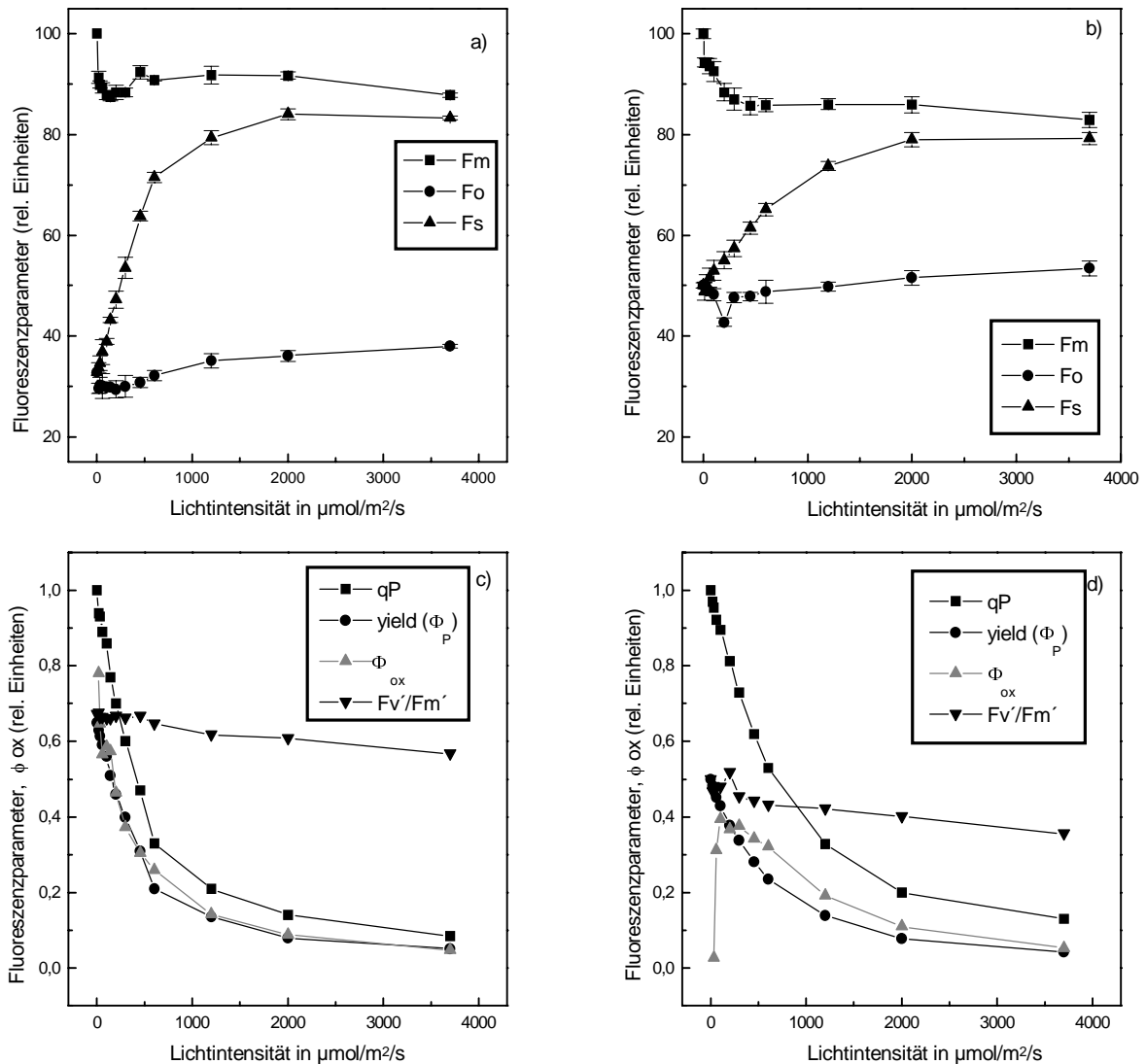


Abb.28 Abhängigkeit des Quotienten: Sauerstoffentwicklungsrate/Lichtintensität (Φ_{ox}) und verschiedener Fluoreszenzparameter von der Belichtungsintensität von unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; Belichtungsdauer: 5min; n = 4-5; unbehandelte Zellen: Chl-Konzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; OD = 1,1 \pm 0,02; carotinoidverarmte Zellen (5 μM NF in Anzucht): Chl-Konzentration: 3,32 \pm 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 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 (Φ_{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 eingestrahlten 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 (Φ_P : yield) wird durch den nichtphotochemischen (qN) und den photochemischen Quench (qP) beeinflusst. Die Lichtabhängigkeit von Φ_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 Φ_{ox} deutlich unterhalb der Quantenausbeute (Φ_P). Aber auch bei höheren Belichtungsbedingungen konnte keine Übereinstimmung dieser Parameter bei den carotinoidverarmten Zellen beobachtet werden.

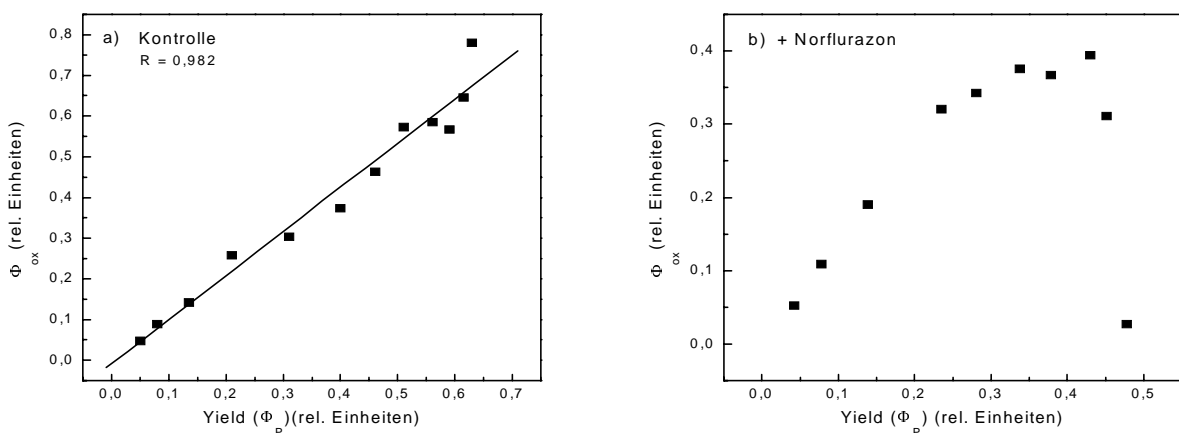


Abb.29 Zusammenhang zwischen Φ_{ox} und Φ_P von unbehandelten a) Kontrolle und b) carotinoidverarmten Zellen (+ Norflurazon) von *Euglena gracilis*; Versuchsbedingungen siehe Abb. 28

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 Φ_{ox} und Φ_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 Φ_{ox} und Φ_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 ΔpH -abhängigen Quench im RC II angesehen.

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

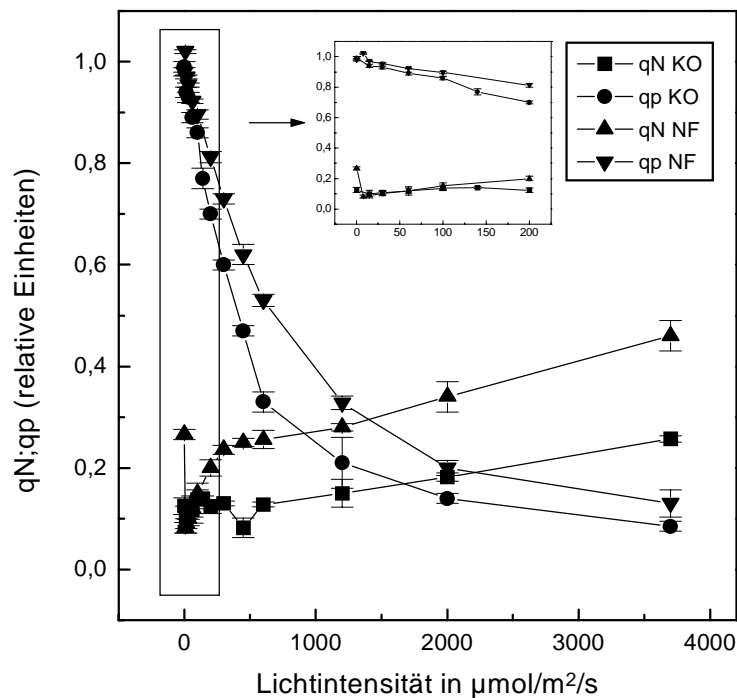


Abb.30 Der photochemische und nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; KO = unbehandelte Zellen; NF = carotinoidverarmte Zellen; Versuchsbedingungen wie in Abb.28

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 $450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

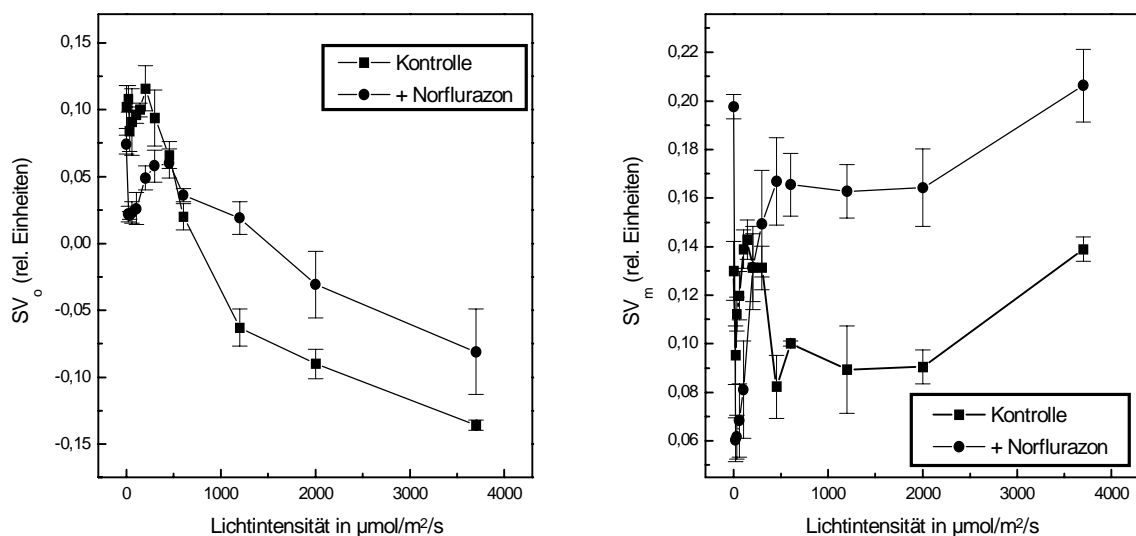


Abb.31 Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten auf SV_0 und SV_m bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen; Versuchsbedingungen wie in Abb.28; $n = 4-5$

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.

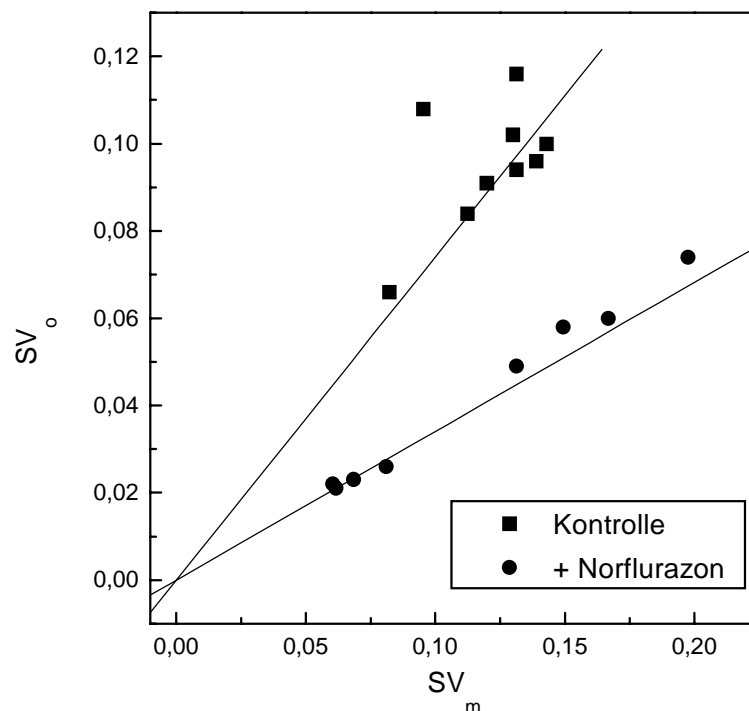


Abb.32 Zusammenhang zwischen SV_o und SV_m bei unbehandelten ($R = 0,532$) und carotinoidverarmten Zellen ($R = 0,909$) von *Euglena gracilis*; Versuchsbedingungen wie in Abb. 28

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.

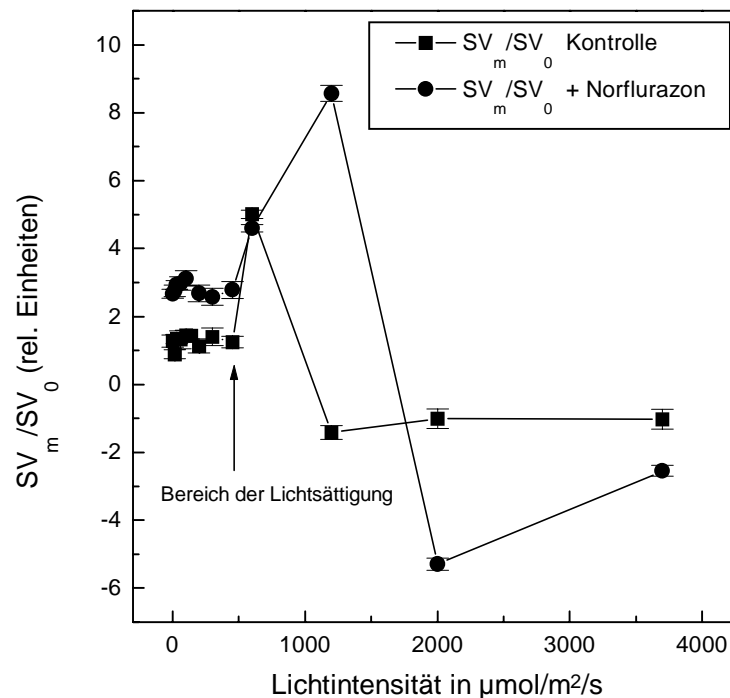


Abb.33 Vergleich des Quotienten SV_m/SV_0 von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und carotinoidverarmten Zellen (+ Norflurazon) von *Euglena gracilis* in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität; Versuchsbedingungen wie in Abb.28

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.

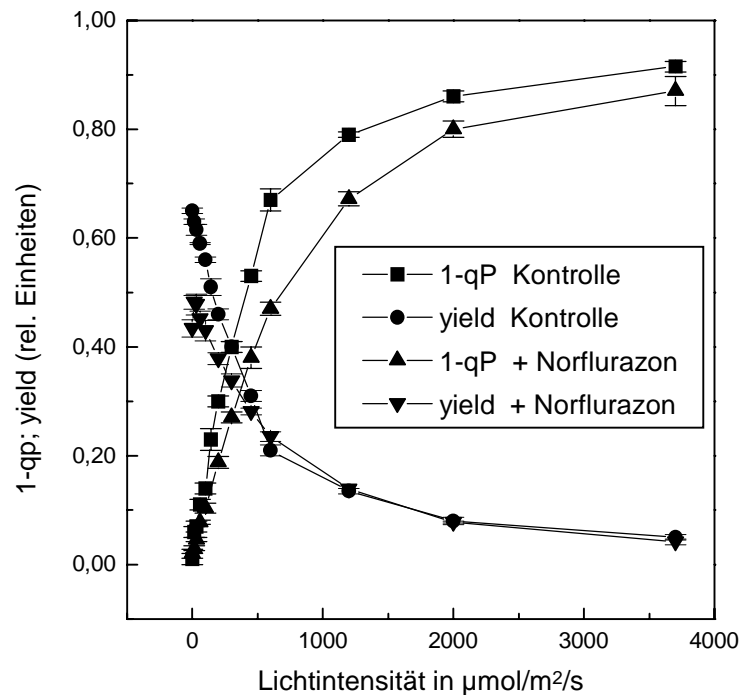


Abb.34 Einfluß unterschiedlicher Belichtungsintensitäten auf den Reduktionsgrad des PQ-Pools und die Quantenausbeute des PS II bei unbehandelten (Kontrolle) und carotinoidverarmten (+ Norflurazon) Zellen von *Euglena gracilis*, Versuchsbedingungen wie in Abb.28

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 ΔpH -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.

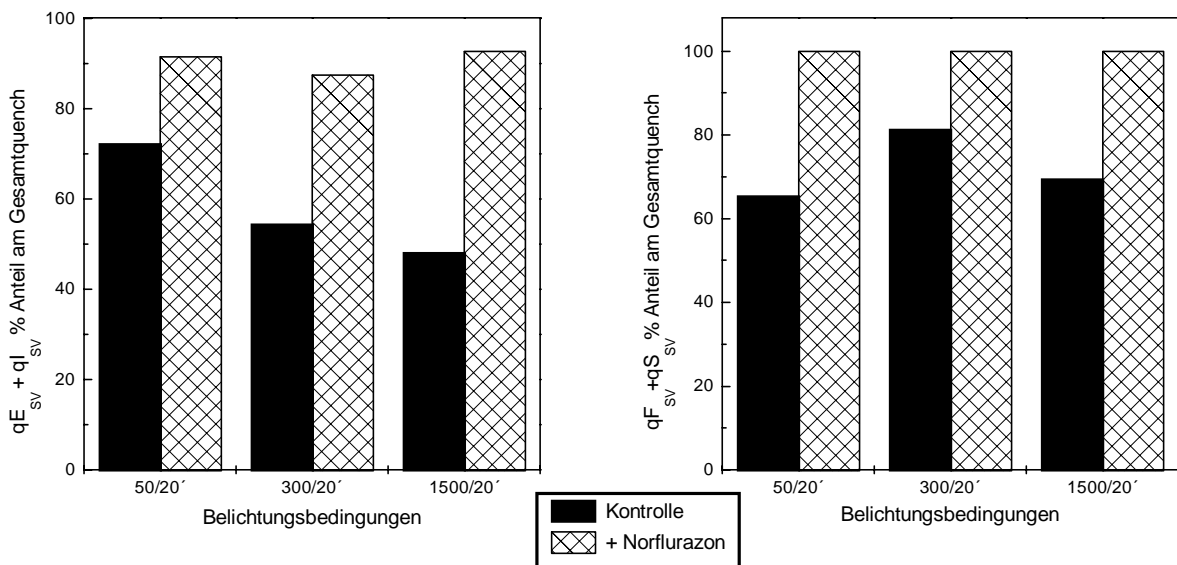


Abb.35 Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Summe der Komponenten $qE_{SV} + qI_{SV}$ (a) bzw. $qF_{SV} + qS_{SV}$ (b) des nichtphotochemischen Quench bezogen auf den Gesamtquench nach 21minütiger Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten (in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) der jeweiligen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

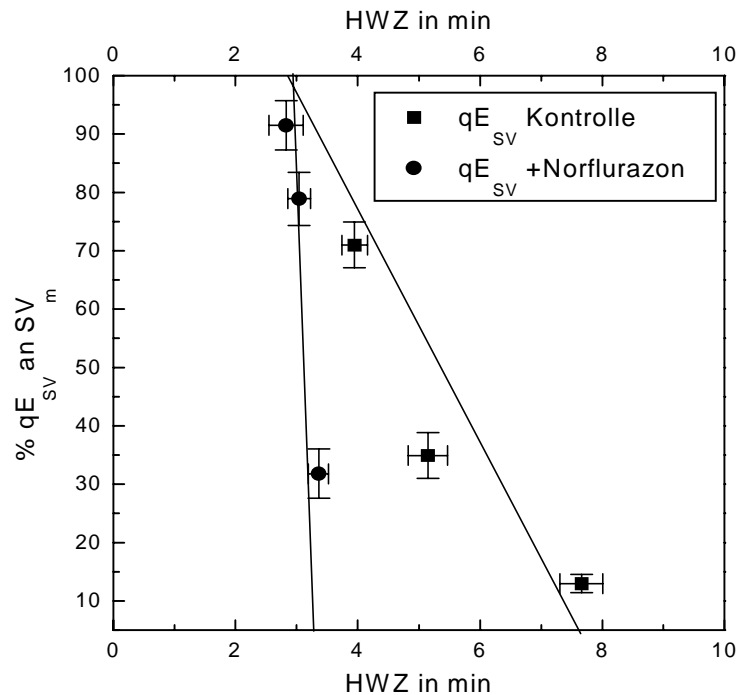


Abb.36 Zusammenhang zwischen dem Anteil von qE am Gesamtquenche und der Halbwertszeit des „recovery“ der Chlorophyllfluoreszenz bei unbehandelten und carotinoidverarmten Zellen von *Euglena gracilis*; n = 3-5

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 μM) 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 SV_m/SV_o erhöhte sich bei diesen Zellen.

Drittens: Der durch Belichtung hervorgerufene nichtphotochemische Quench der Chlorophyllfluoreszenz war bei den carotinoidverarmten Zellen hauptsächlich ein ΔpH -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; CAMPBELL UND ÖQUIST, 1996).

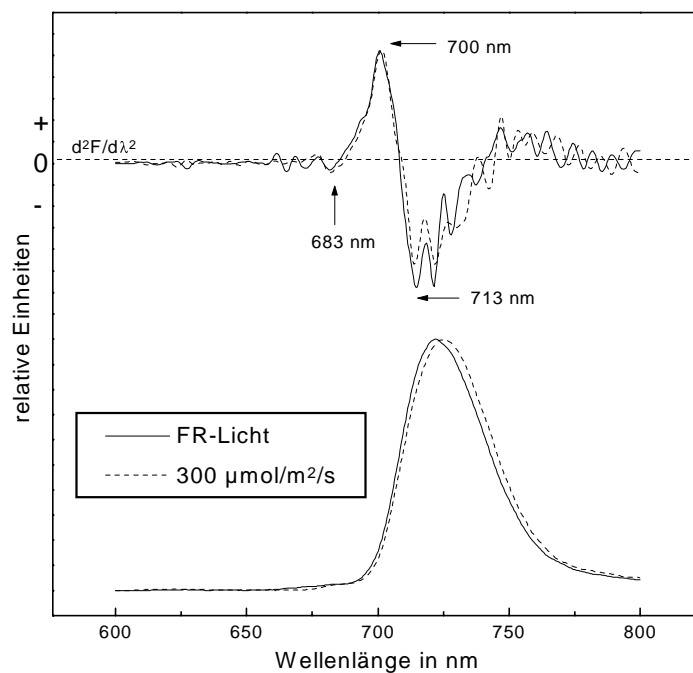


Abb.37 Einfluß der Belichtung ($300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 20 min) im Vergleich zur FR bestrahlten Probe auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (77 K; 435 nm) der Alge *Euglena gracilis* und die zweite Ableitung der Fluoreszenzemissionsspektren; Chl-Konzentration $2,0 \mu\text{g}/\text{ml}$

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.

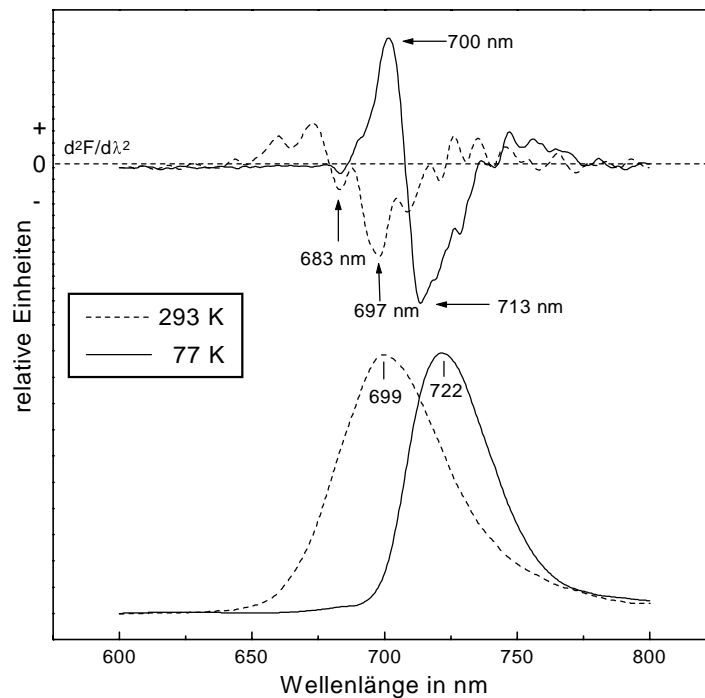


Abb.38 Raum (293K)- und Tieftemperaturfluoreszenzemissionsspektren (77K) der Alge *Euglena gracilis* und deren 2. Ableitung; Chl-Konzentration 2,0 $\mu\text{g/ml}$; (435 nm)

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.

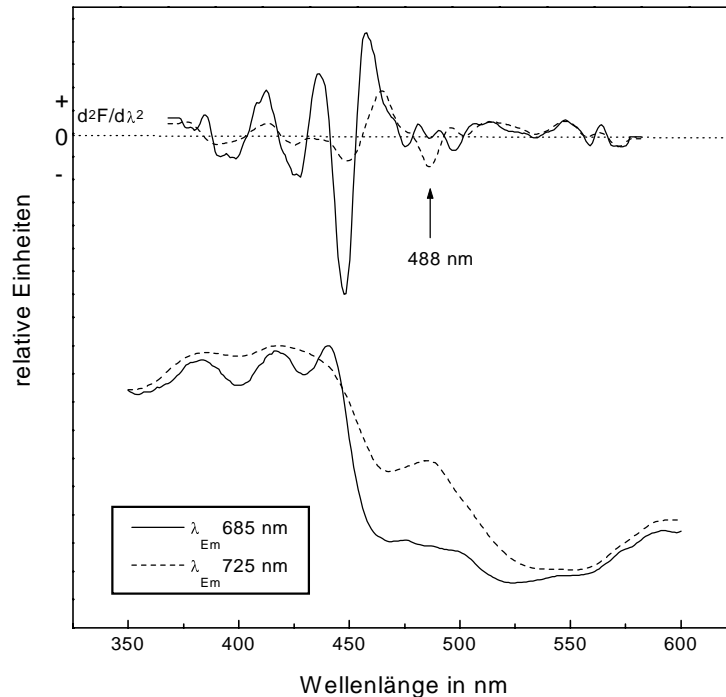


Abb.39 Fluoreszenzexcitationspektren und deren 2. Ableitung von *Euglena gracilis* bei 77 K, Fluoreszenzemission bei 685 nm und 725 nm gemessen;

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

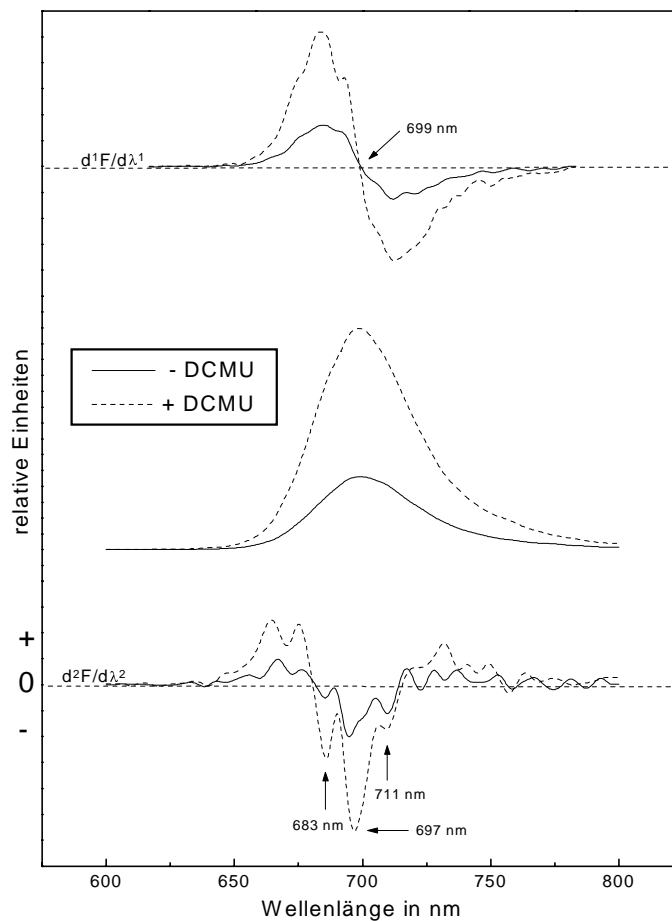


Abb.40 Einfluß von DCMU (50 μM) auf das Emissionsspektrum der Chlorophyll a-Fluoreszenz (435 nm) bei Raumtemperatur und die erste und zweite Ableitung der Spektren; Chl-Konzentration 2,0 $\mu\text{g/ml}$

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
Bande 1	+++			
Bande 1a	++			
Bande 2		+++	+++	
Bande 3	++			++
Bande 4				+++
Bande 5				+++

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.

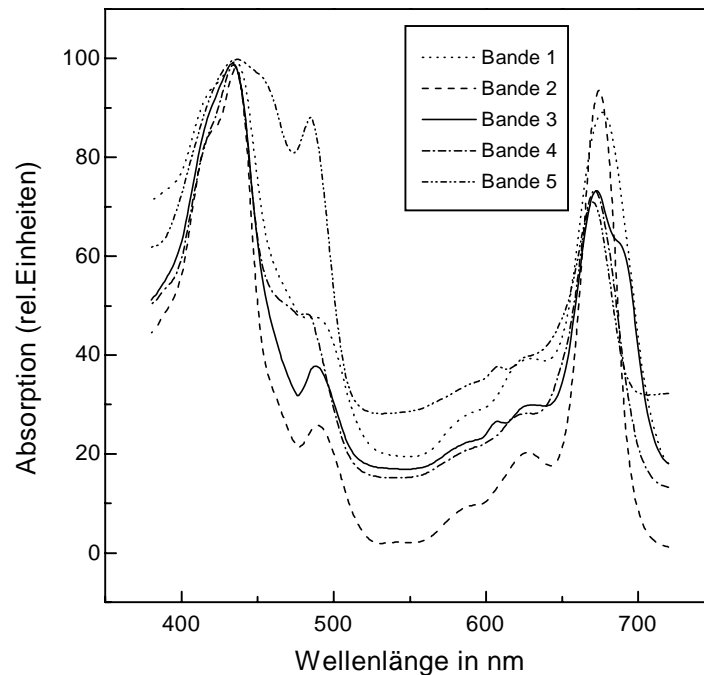


Abb.42 Absorptionsspektren (RT) der isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen von *Euglena gracilis*; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

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 β -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.

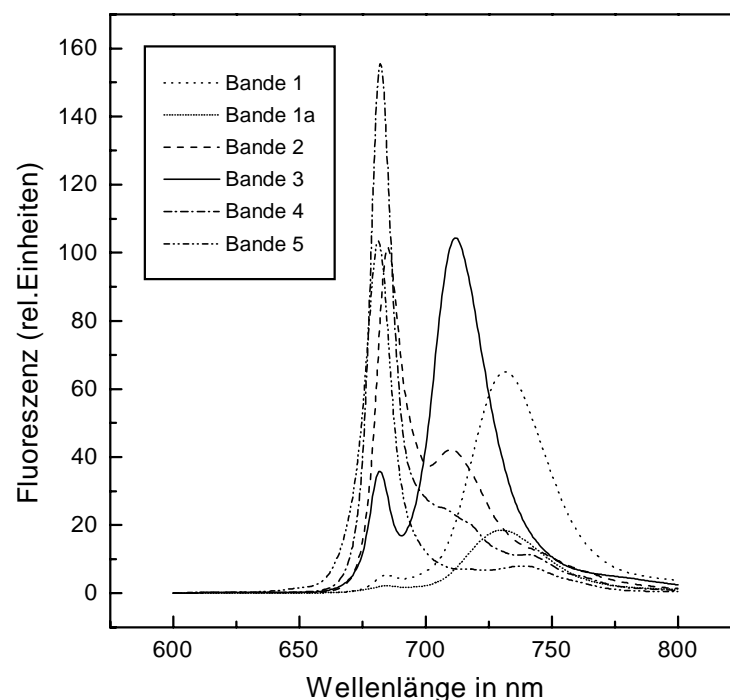


Abb.43 Fluoreszenzemissionsspektren (77 K; 435 nm) der isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen von *Euglena gracilis*; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

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).

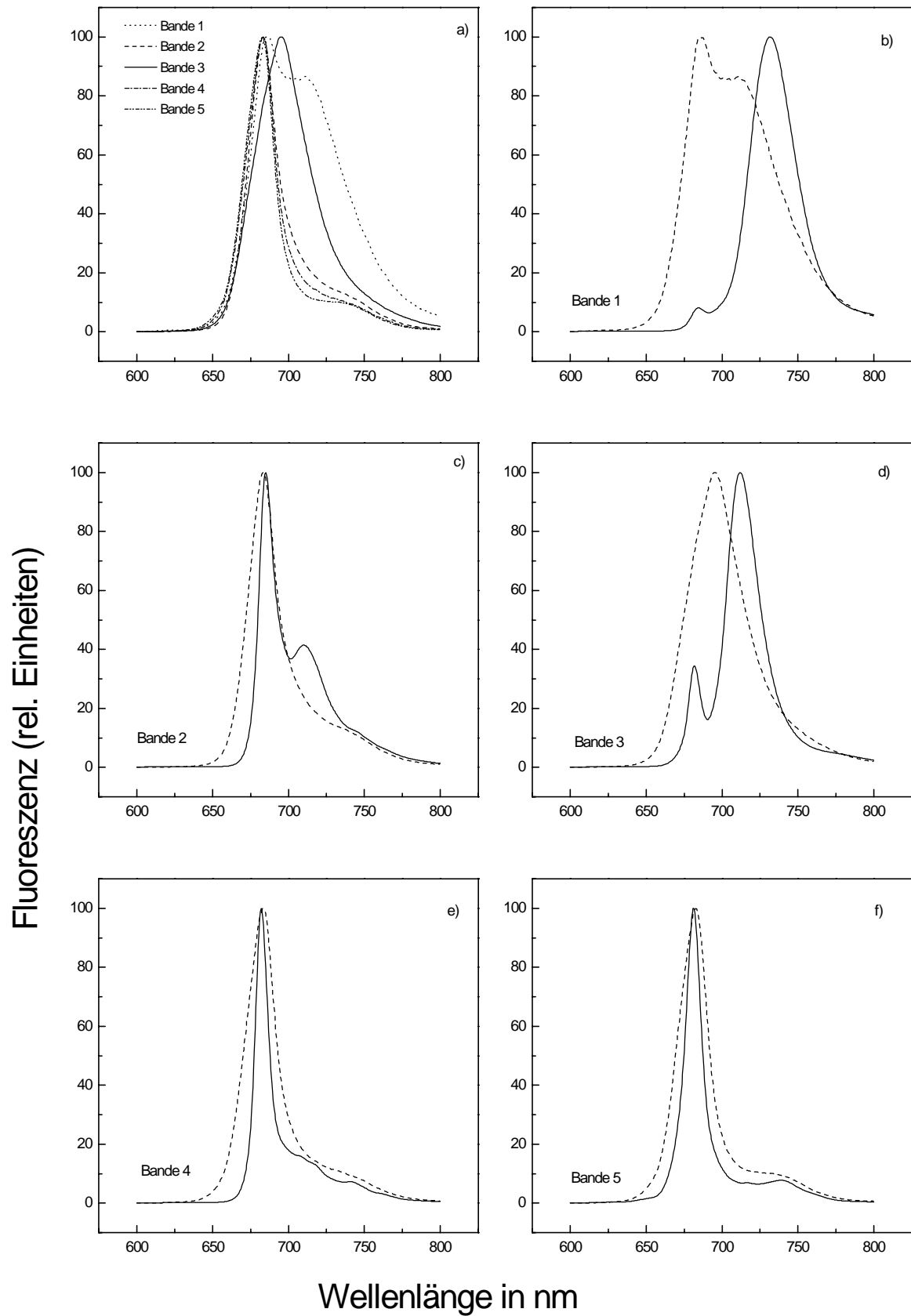


Abb.44 Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren (435 nm) der isolierten Pigment-Protein-komplexe von *Euglena gracilis* bei RT und 77 K; a) Emissionsspektren (RT) der isolierten Banden; b)-f) Vergleich der Fluoreszenzemission der einzelnen Banden bei RT (- - -) und 77 K (—); Spektren wurden auf das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

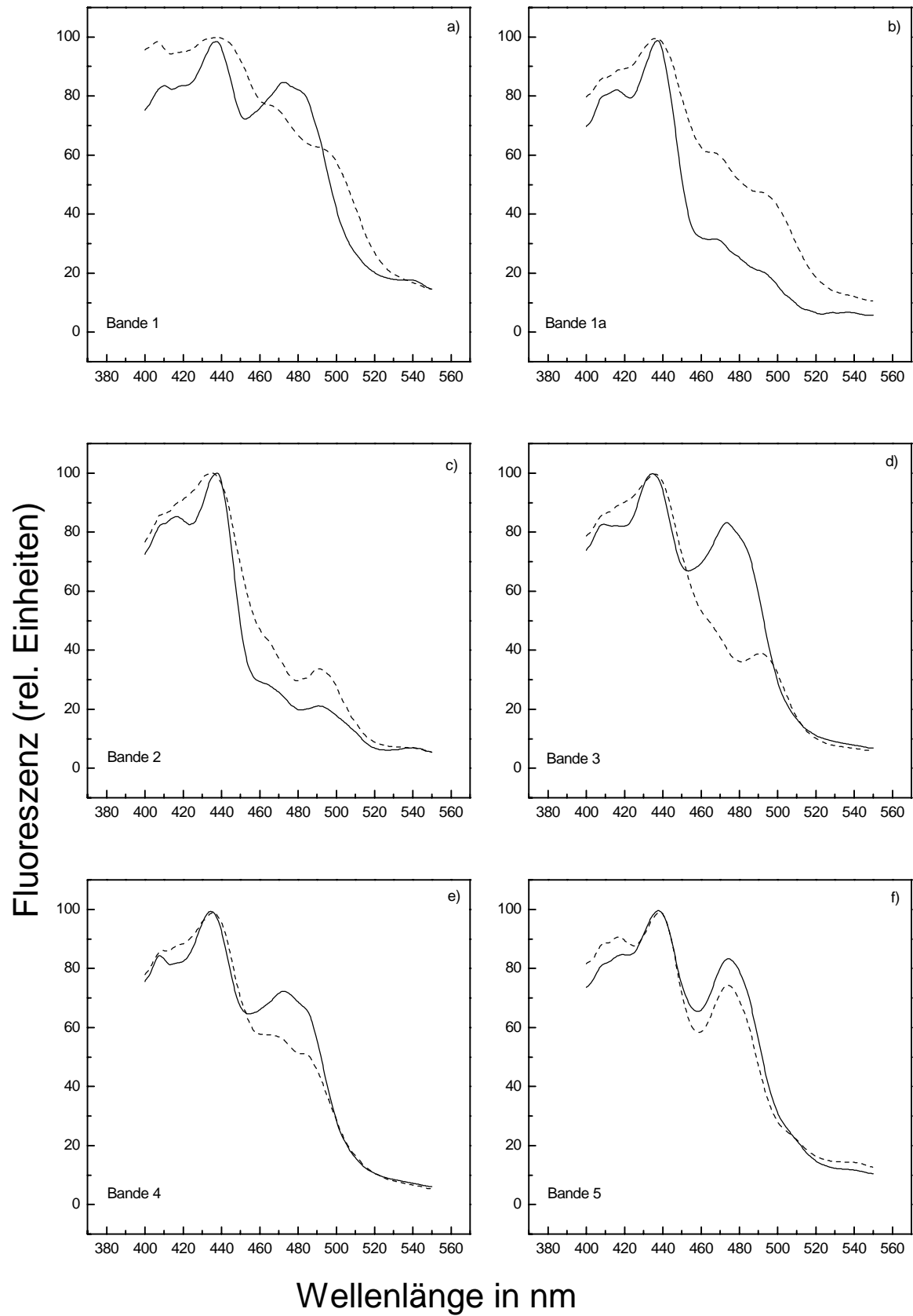


Abb.45 Fluoreszenzexcitationsspektren (77K) der Pigment-Proteinkomplexe von *Euglena gracilis*; gemessen bei 685 nm (—) und 725 nm (---) der Fluoreszenzemission; Spektren wurden auf das maximale Signal normalisiert

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

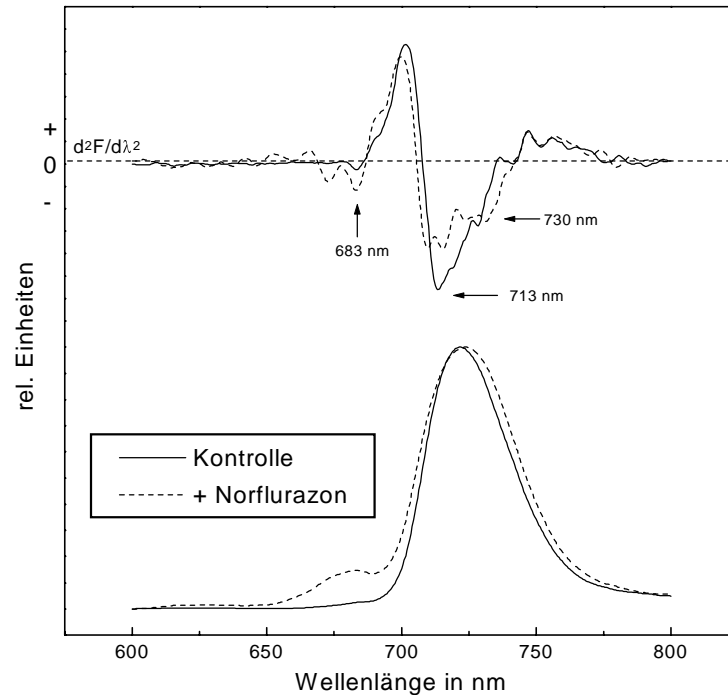


Abb.46 Einfluß der Carotinoidverarmung auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (435 nm; 77 K) und deren zweite Ableitung; Kontrolle: unbehandelter Zellen; + Norflurazon: carotinoidverarmte Zellen; Chl-Konzentration 2,0 $\mu\text{g/ml}$; Zellen wurden auf das maximale Signal normalisiert

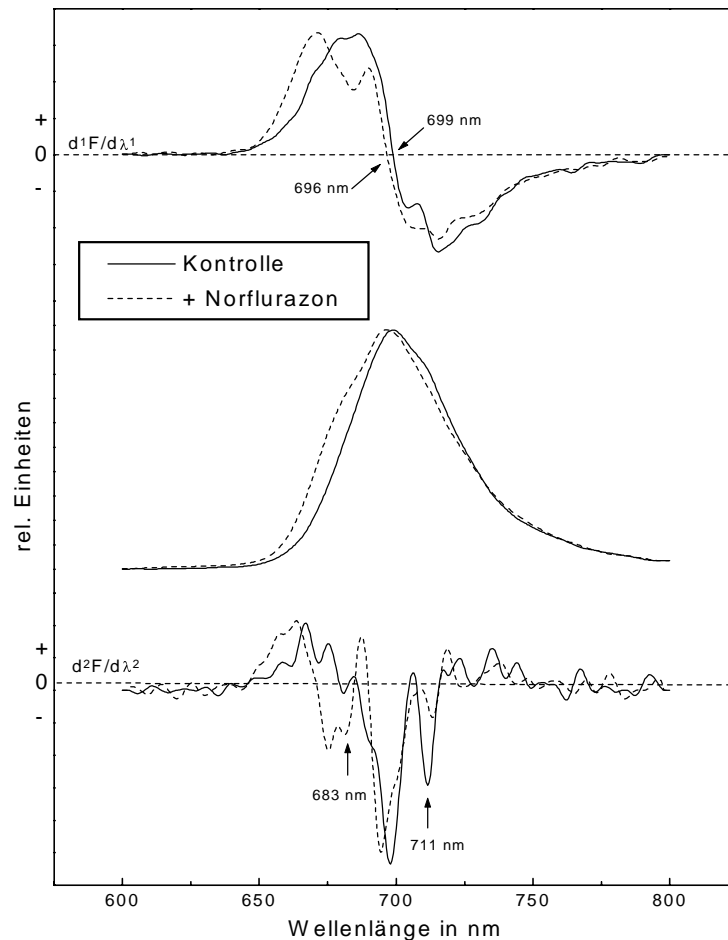


Abb.47 Einfluß der Carotinoidverarmung auf das Fluoreszenzemissionsspektrum (RT; 435 nm) und deren erste und zweite Ableitung; Kontrolle: unbehandelter Zellen; + Norflurazon: carotinoidverarmte Zellen; Chl-Konzentration 2,0 $\mu\text{g/ml}$; Zellen auf maximale Signal normalisiert

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.

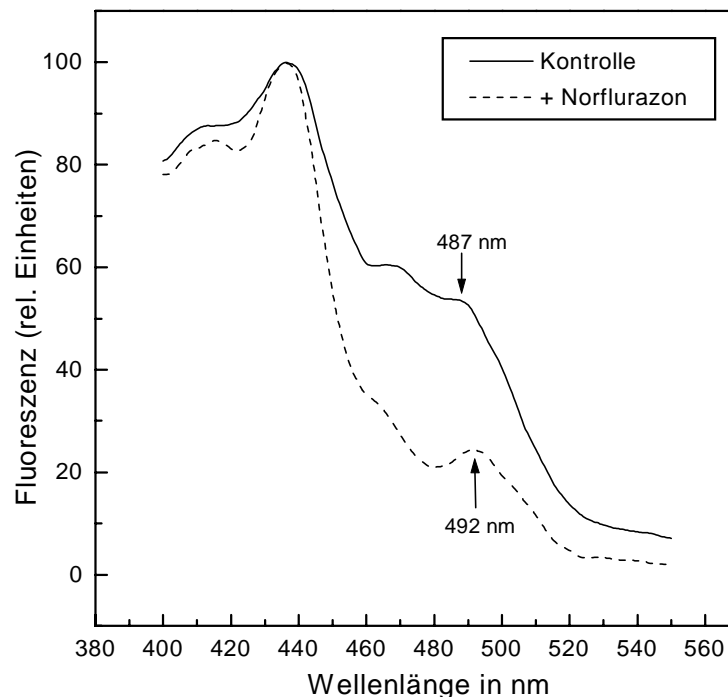


Abb.48 Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Excitationsspektren (77 K); Kontrolle: unbehandelter Zellen; + Norflurazon: carotinoidverarmte Zellen; Chlorophyllgehalt 2,0 µg/ml; Detektion der Fluoreszenzemission bei 725 nm; Zellen wurden auf das maximale Signal normalisiert

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 Carotinoidschulter von 487 nm auf 492 nm. Durch die Inhibierung der Carotinoidbiosynthese mit Norflurazon wurde der Gehalt an Diatoxanthin nicht negativ beeinflusst, ebenso besaßen diese Zellen noch 67% des β -Carotin im Vergleich zur Kontrolle. Die Schulter bei 492 nm ent-

spricht der Energieübertragung durch β -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 μ 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.

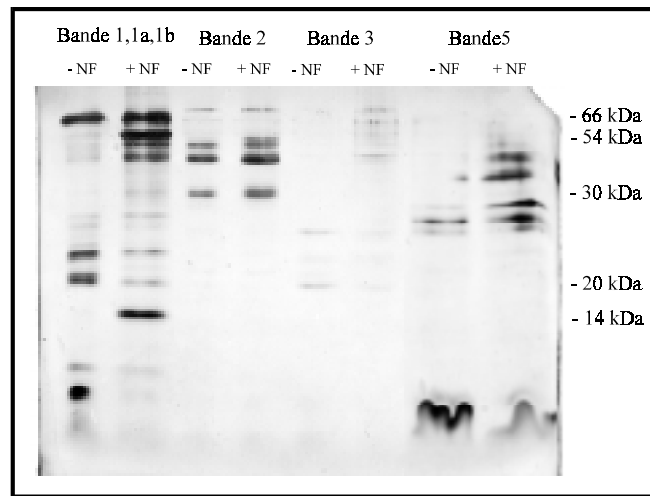


Abb.50 Einfluß der Carotinoidverarmung auf die Apo-Proteine der isolierten Pigment-Proteinkomplexe aus unbehandelten (-NF) und carotinoidverarmten (+NF) Zellen

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).

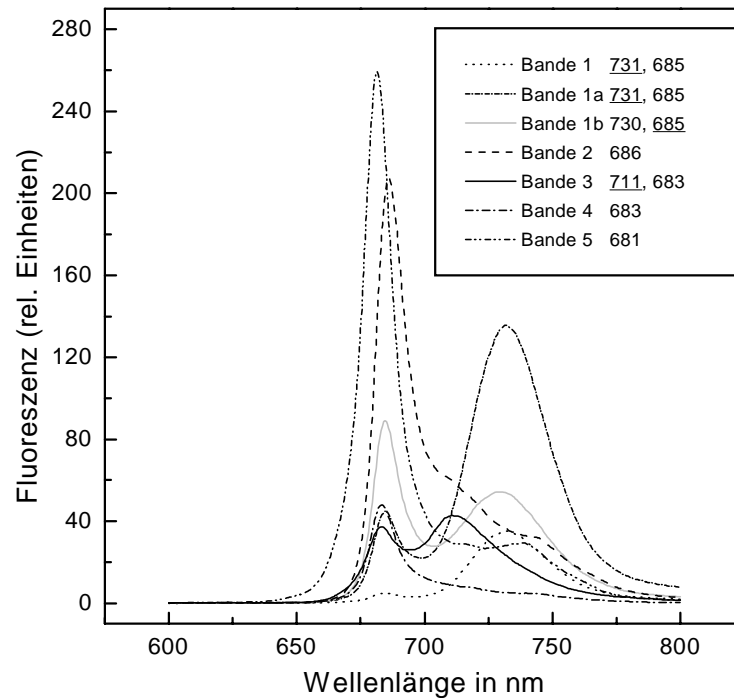


Abb.51 Fluoreszenzmissionsspektren (77 K; 435 nm) der isolierten Pigment-Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen carotinoidverarmerter Zellen von *Euglena gracilis*; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese geschnitten

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 carotinoidverarmerter 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

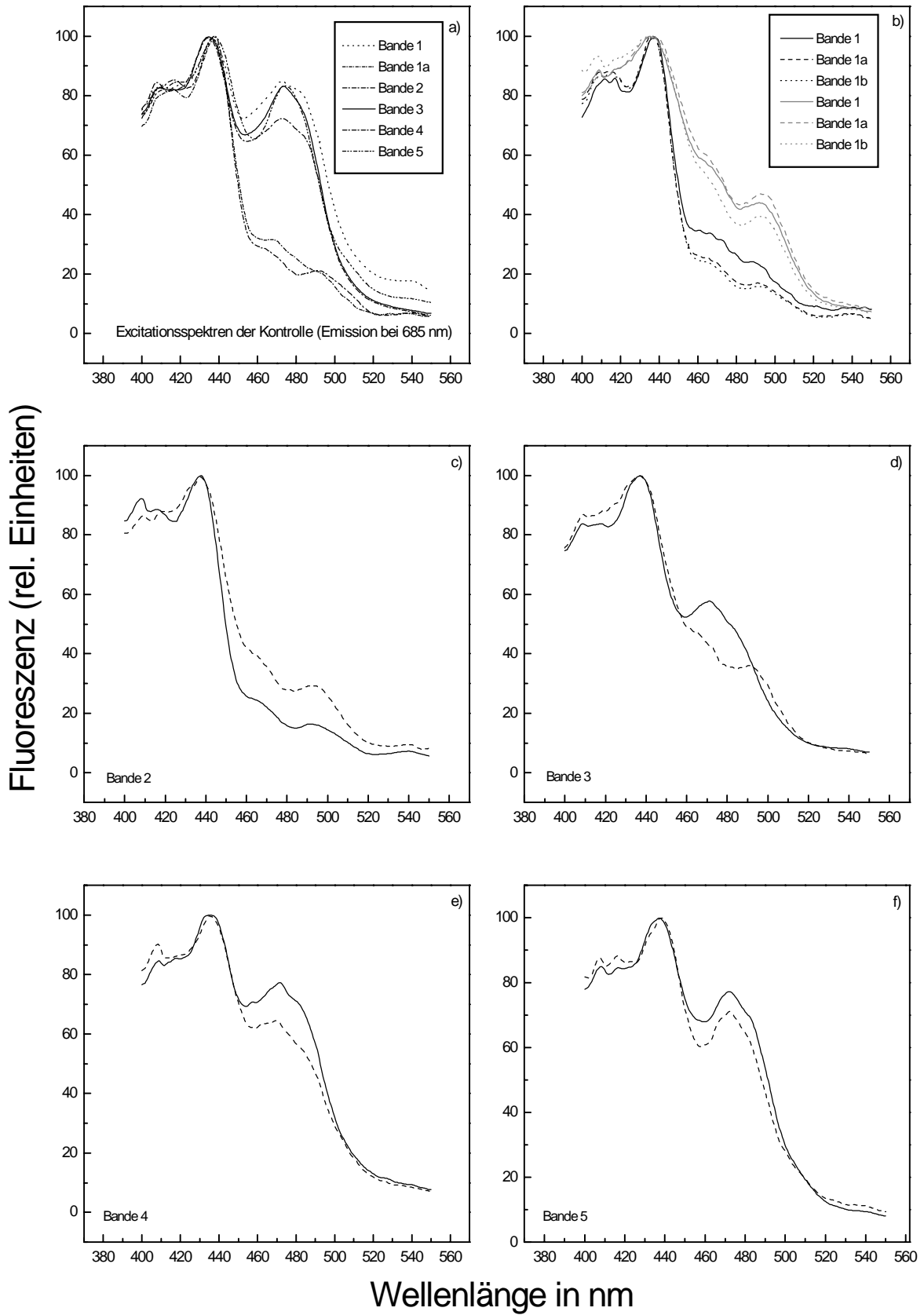


Abb.52 Fluorezenzexcitationsspektren der isolierten Pigment-Proteinkomplexe carotinoidverarmter Zellen von *Euglena gracilis*, 685 nm (—); 725 nm (- - -); zum Vergleich in Abb.52a) die Excitationsspektren bei 685 nm un behandelter Zellen; Pigment-Proteinkomplexe wurden aus dem Gel der grünen Elektrophorese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