

2. MATERIAL UND METHODEN

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

2.1 Anzucht des Algenmaterials

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

2.1.1 Nährlösungen

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

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

Die Fe-EDTA-Lösung bestand aus 0,695 g FeSO₄ · 7 H₂O und 0,930 g Na₂EDTA, gelöst in 100 ml Auqa dest., die Spurenelementlösung wurde in Anlehnung an die Vorschrift von PRINGSHEIM UND WIESNER (1961) hergestellt.

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

ad 1 l Auqa dest.

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

NaCl	0,1	g
MgSO ₄	0,4	g
CaCl ₂	0,05	g

ad 1 l 0,03 M KH₂PO₄/K₂HPO₄; pH = 7,8

2.1.2 Anzuchtbedingungen

a) mixotrophe Anzucht

Für die Kultivierung der Algenzellen unter mixotrophen Bedingungen wurden 100 ml Erlenmeyer, gefüllt mit 50 ml autoklavierter Nährlösung mit 1 Million Zellen steril beimpft. Die Anzucht erfolgte in einem RUMED-Licht-Thermostaten (RUBARTH Apparate GmbH) bei 25°C. Die Lichtintensität während des Wachstums war abhängig von den Versuchsbedingungen. Die Kontrolle bzw. die Erhaltungskulturen wurden bei 25 µmol Photonen/m²/s angezogen und nach 6 d gerntet.

Für die Schwachlichtanzuchten bei 0,3 µmol/m²/s, 5 µmol/m²/s und 10 µmol/m²/s wurden Bereiche im Anzuchtschrank abgedunkelt. Starklichtintensitäten wurden durch Einbau zusätzlicher Beleuchtungsquellen erreicht.

Die Anzucht der Zellen für die Chloroplastenisolierung erfolgte in 1 l Kulturgefäßen, die mit 500 ml Nährlösung gefüllt waren, bei einer Photonenflußdichte (PFD) von 25 µmol/m²/s und einer Anzuchtstemperatur von 25°C. Die Zellen wurden nach 72h ± 3h geerntet.

b) Inhibierung der Carotinoidbiosynthese während der Anzucht

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

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

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

2.2.2 Lichtmessung

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

2.2.3 Chloroplastenisolierung aus *Euglena gracilis*

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

Zunächst erfolgte ein zweimaliges Waschen, bei dem das Sediment der Zellen, nach 1minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min in K-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0; 30 mM Sorbitol) resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde. Das Sediment (5-7g) konnte nun im gleichen Puffer aufgenommen und mit 0,5% Trypsin (w/w) versetzt werden. Eine ca. 35minütige Inkubation unter langsamen Rühren (etwa 250 U/min) führte zum Andauen der proteinreichen Pelli-kula, welche der Plasmamembran von *Euglena gracilis* aufgelagert ist. Die Fortschritte des Andauungsprozesses (Sphäroblastenbildung) wurden unter dem Mikroskop verfolgt. Nach der Ausbildung typischer Sphäroblasten erfolgte eine Zentrifugation (1 min) bei 5200 U/min und ein zweimaliger Waschschrift im K-Phosphat-Puffer. Anschließend wurde das Sediment in 1-2 ml TRICIN-Puffer (50 mM, pH 7,8; 330 mM Sorbitol, 2 mM MgCl_2 , 2 mM Na_2EDTA) resuspendiert und 30 min bei einer Drehzahl von ca. 50 U/min mit 1,0 g Glaskugeln ($d = 0,5$ mm) magnetisch gerührt, woraus der Aufschluß der Zellen resultierte. Die somit erreichte Suspension ganzer Zellen, Chloroplasten und Zelltrümmer konnte nun bei 900 U/min 5 min zentrifugiert werden. Die im Sediment enthaltenden ganzen Zellen und größeren Zellstrukturen wurden nach zweimaligen Waschen mit TRICIN-Puffer und nochmaliger Zentrifugation verworfen. Es folgte darauf die Vereinigung der Überstände beider Zentrifugationsschritte und deren erneute einminütige Zentrifugation bei 5200 U/min. Nach Resuspension des paramylonfreien Sediments in 1-2 ml HEPES-Puffer (5 mM, pH 6,8; 300 mM Sorbitol, 5 mM Mercaptoethanol, 15 mM NaCl) folgte die Unterschichtung mit etwa 3 ml 20%igem Percoll (v/v) in TRICIN-Puffer [25 mM TRICIN, pH 8,0; 330 mM Sorbitol, 2 mM Na_2EDTA , 2 mM MgCl_2 , 0,1% BSA (w/v)]. Diese zwei Phasen wurden einer 3minütigen Dichtegradientenzentrifugation bei 5000 U/min in Polysulfon-Reagenzgläsern (NALGENE, USA) unterzogen, wodurch die aufgebrochenen Chloroplasten von den intakten getrennt wurden. Letztere sedimentierten und wurden abschließend vorsichtig in TRICIN-Puffer (25 mM TRICIN, pH 8,0; 330 mM Sorbitol, 2 mM Na_2EDTA , 2 mM MgCl_2 , 0,1% BSA) resuspendiert und einem nochmaligen Waschschrift unterworfen, bevor endgültig die Aufnahme in TRICIN-Puffer erfolgte.

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

2.2.4 Belichtung von Zellen und Chloroplasten

Das Versuchsmaterial wurde je nach Umfang des Versuchsansatzes in einer 3 ml oder 30 ml fassenden Plexiglasküvette mit magnetischem Rührer (BIOLYTIK GmbH, BRD) belichtet. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtquelle (Kaltlicht-Fiberleuchte FL-400 und Spezialoptik 400-F, HEINZ WALZ GmbH, BRD), welche in ihrer Intensität variierbar war. Das Testmaterial wurde bei 25°C (Kryostat F30, JULABO, BRD) während der Belichtung gleichmäßig, langsam gerührt. Eine CO₂-Verarmung wurde durch die Zugabe von NaHCO₃ (Endkonzentration 10 mM) verhindert.

Für die Belichtung von Zellen wurden mixotrophe Zellen abzentrifugiert (20°C, 3000 U/min; SIGMA 3K 12) und mit einer Zelldichte von 1 Million Zellen /ml in Ruhemedium überführt. Nach 2 stündiger Inkubation bei 25 µmol/m²/s und Überführen in die Küvette wurden die Zellsuspensionen belichtet. Die Belichtungsdauer und -intensität ist bei den jeweiligen Versuchen beschrieben.

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

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

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

0,5 mM KH₂PO₄
 5,0 mM Na₄P₂O₇
 1,0 mM ATP (BOEHRINGER, BRD)
 10,0 mM NaHCO₃
 4,0 mM Glycerat-3-phosphat (SIGMA, USA).

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

2.2.5 Bestimmung der optischen Dichte von Algensuspensionen

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

2.2.6 Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.7 Pigmentanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

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

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

Als mobile Phase diente ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Methanol 75/25 (v/v) und Reinstwasser. Die polaren Eigenschaften dieser Phase wurden durch den Wassergradienten im Laufe der Trennung verändert. Begonnen wurde mit einem 7%igem Anteil von H₂O, welcher linear innerhalb von 8,6 min auf 4%, nach 16 min auf 2% gesenkt wurde. Nach 17 min war die mobile Phase wasserfrei. Eine anfängliche Flußrate von 1,5 ml/min wurde nach 17,5 min auf 3 ml/min erhöht. Innerhalb von 25 min waren alle Pigmente eluiert. Anschließend wurde die Säule langsam auf ihre Ausgangsbedingungen regeneriert. Zur Entgasung der Lösungsmittel diente ein integrierter Degaser DG 1210 (UNIFLOWS, Co., Japan).

Die Separation der Carotinoide und Chlorophylle erfolgte mit einer Umkehrsäule des Typs ET 250/ 1/4“/ 4.6 Nucleosil[®] 120-5C₁₈ (MACHEREY-NAGEL GmbH), die in einem Säulenofen bei konstanter Temperatur (22°C) plaziert war. Detektiert wurden die getrennten Pigmente mit dem Diodenarray-Detektor (DAD 440, KONTRON Instruments, Italien), welcher neben der quantitativen Bestimmung auch eine qualitative Analyse der spektralen Eigenschaften der getrennten Substanzen ermöglichte. Die Steuerung der Anlage sowie die Datenerfassung und Auswertung wurde über das Computerprogramm DS 450-MT1-EMS (KONTRON Instruments, Italien) realisiert.

Die zur quantitativen Bestimmung nötigen Pigmentstandards (vgl. Tab.1) wurden zum Teil (Diadinoxanthin, Diatoxanthin) aus der Alge *Phaeodactylum tricornutum* nach der für dieses Objekt beschriebenen Methode nach MANTAURA UND LEWELLYN (1983) isoliert. Hierzu wurde eine semipräparative Säule genutzt (SS 250/1/2“/10 Nucleosil[®]7 C₁₈; MACHEREY-NAGEL GmbH, BRD).

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

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

2.2.8 Polarographische Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung und Atmungsaktivität intakter Zellen

Für die Messung der photosynthetischen O₂-Entwicklung bzw. des respiratorischen O₂-Verbrauches intakter Zellen nutzten wir eine Platin-Silber-Elektrode (nach Clark). Das allgemeine Funktionsprinzip beruht auf der Fähigkeit bestimmter Metalle, Sauerstoff elektrochemisch zu reduzieren (FORK, 1972).

Die Experimente wurden mit der Sauerstoffelektrodeneinheit CB 1-D2 durchgeführt. Als Stromversorgungs- und Meßgerät diente die Einheit AI KM 2 (beide HANSATECH, UK), die Aufzeichnung der Signale erfolgte mit dem Kompensationsschreiber L-250 der Firma LINSEIS (BRD). Die Elektrodeneinheit wurde auf 25°C temperiert. Das Meßvolumen betrug 1ml. Der Chlorophyllgehalt variierte in einzelnen Experimenten überstieg jedoch nie 20 µg/ml. Die Suspension wurde während des Versuches magnetisch gerührt. Die Sauerstoffentwicklung wurde bei PFD von 1000 µmol/m²/s registriert. Für die Messung der O₂-Entwicklung wurden die Proben 1 min mit Stickstoff begast, danach erfolgte die Zugabe von NaHCO₃ (Endkonzentration: 10 mM). Vor Bestimmung des O₂-Verbrauches wurden die Proben 1 min mit Luft begast und im Dunkeln gemessen. Sämtliche Proben befanden sich im Ruhemedium.

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

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

Die Aktivität der Photosysteme I und II wurden mit künstlichen Elektronendonatoren und -akzeptoren ermittelt (IZAWA, 1980) und anhand ihrer O₂-Produktion (PS II) bzw. -Aufnahme (PS I) mit Hilfe einer Platin-Silber Elektrode (nach Clark) polarographisch (siehe auch 2.2.8) verfolgt. Das Reaktionsvolumen in der Meßküvette betrug 1 ml mit einer Chlorophyllkonzentration von 20 µg/ml. Belichtet wurden die Proben mit einer Intensität von 1000 µmol/m²/s. Die Chloroplasten befanden sich in dem unter 2.2.4 beschriebenen Reaktionsmedium. Im einzelnen hatten die Versuchsmedien folgende Zusammensetzung:

Aktivitätsbestimmung des PS I

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

Aktivitätsbestimmung des PS II

Elektronendonator:	H ₂ O
--------------------	------------------

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

2.2.10 Fluoreszenzuntersuchungen

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

2.2.10.1 Pulse-Amplituden-Modulations-Meßprinzip (PAM)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SV₀	Stern-Volmer Quotient des nichtphotochemischen Quenches von Fo	$F_0/F_0' - 1$	OLAIZOLA UND YAMAMOTO (1994), THIELE et al.(1997) GILMORE UND YAMAMOTO (1991); OLAIZOLA UND YAMAMOTO (1994), THIELE et al. (1997)
qE_{SV}	Energie-abhängiger Quench, verbunden mit einem transthylakoiden pH-Gradient	$F_{m'(de)}/F_{m'} - 1$ $F_{m'(de)} = F_{m'}$ deenergetisiert; erreicht durch Entkopplerzugabe	WEIS UND BERRY (1987);GILMORE UND YAMAMOTO (1991), KRAUSE UND WEIS (1991); THIELE et al. (1997)
qI_{SV}	Quench der Fluoreszenz durch Photoinhibierung	$F_m/F_{m'(rec)} - 1$ $F_{m'(rec)} = F_{m'}$ am Ende des „recovery“ (25 min FR)	KRAUSE UND WEIS (1991); THIELE et al. (1997)
qT	Quench der Fluoreszenz durch „state transitions“ *	$SV_m - (qI_{SV} + qE_{SV})$	QUICK UND STITT (1989); WALTERS UND HORTON (1991)

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

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

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

Proben, die extern in Belichtungsküvetten unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt waren, wurden für die Fluoreszenzmessungen in die Küvette des PAM-Fluorometer pipettiert und nach Zugabe von NaHCO₃ sofort vermessen.

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

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

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

Die Wirkung des PS II-Hemmstoffes DCMU (Endkonzentration: 50 μM) nach unterschiedlicher Behandlung der Algensuspension wurde nach 5minütiger Inkubation der Probe mit dem Hemmstoff gemessen.

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

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

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

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

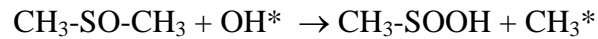
Um die Fluoreszenz der einzelnen Pigment-Proteinkomplexe zu analysieren, wurden diese nach gelelektrophoretischer Trennung in gleich großen Streifen aus dem Gel geschnitten und in die Quarzküvetten apliziert.

2.2.11 Absorptionsspektren bei Raumtemperatur

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

2.2.12 Kolorimetrische Bestimmung der Methylsulfinsäurekonzentration (Nachweis der Hydroxylradikalbildung)

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



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

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

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

2.2.13 Proteinbestimmung

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

2.2.14 Elektrophorese der Pigment-Proteinkomplexe

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

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

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

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

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

Solubilisierung der Proben:

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

Elektrophorese:

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

Sammelgel:

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

Elektrodenpuffer:

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

Bedingungen:

75 V, 1,5 h, 2-4°C, Dunkel

Geräte:

temperierbares Midget-Elektrophoresesystem (PHARMACIA, Schweden)

2.2.15 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

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

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

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

2.2.16 Selektiver Proteinnachweis durch Western-Blot-Analyse

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

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

Die verwendeten Antikörper sind nachfolgend zusammengestellt und beschrieben:

Tab.3 Verwendete Antikörper für selektive Proteinnachweise

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

Transfer der Proteine auf Nitrozellulose NC 45

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

Immunodetektion

TBT-Lösung:	50 mM TRIS/HCL pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,2% TWEEN 20 (v/v)
Blockierungspuffer:	20 ml TBT (TRIS-Puffer-TWEEN)-Lösung, 5% Magermilchpulver FREMA-Reform (w/v), 0,02% NaN ₃ (w/v)
Inkubationsschritte:	<ul style="list-style-type: none"> -dreimaliges Waschen mit TBT-Lösung -Abblocken freier Bindungsstellen mit Blockierungspuffer, 2h -Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper in Blockierungspuffer 0,04% (v/v) -dreimaliges Waschen mit TBT-Lösung, 20 min -Inkubation mit sekundärem Antikörper (CALBIOCHEM, USA), 90min -dreimaliges Waschen mit TBT-Lösung, je 15 min -Farbreaktion mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Nitro-blue Tetrazolium (CALBIOCHEM) in 100 mM TRIS/HCL pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ -Abstoppen des Färbvorgang mit 20 mM Na₂EDTA in TBT-Lösung

2.2.17 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

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