

4. DISKUSSION

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

Pigmentstatus von *Euglena gracilis*

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

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

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

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

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

Photoadaptation der Alge *Euglena gracilis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aktivität eines Xanthophyllzyklus in *Euglena gracilis* ?

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

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

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

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

Zur Rolle der Carotinoide hinsichtlich der Empfindlichkeit der Alge gegenüber Licht

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Der lichtinduzierte Quench der Chlorophyll a-Fluoreszenz

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GENTY et al. (1989) erörtern den linearen Zusammenhang zwischen dem Ertrag der CO₂-Fixierung und dem Fluoreszenzparameter Φ_P (aktuelle Quantenausbeute des PS II), HEINZE et al. (1995) konnte diesen Zusammenhang zwischen der atemungskorrigierten Sauerstoffentwicklung bezogen auf die Lichtintensität (Φ_{OX} : effektiver photochemische Ertrag) und Φ_P in der Grünalge *Scenedesmus* darstellen. Auch für die unbehandelten Zellen von *Euglena gracilis* war dieser Zusammenhang gegeben. Im Gegensatz dazu konnte bei den carotinoidverarmten Zellen keine lineare Beziehung dieser Größen ermittelt werden. Abweichungen von der linearen Beziehung zwischen Φ_P und Φ_{OX} können durch einen zyklischen Elektronentransport um das PS II (FALKOWSKI et al., 1986 a,b; PRASIL et al. 1996), wie auch durch das Vorhandensein von Q_B-nichtreduzierenden RC II (GOVINDJEE, 1990; KARUKSTIS, 1992) verursacht sein. HORMANN et al. (1994) beobachten den Verlust der Linearität zwischen Φ_P und Φ_{OX} in Thylakoiden von Spinat, was er auf eine Involvierung inaktiver PS II, welche sich durch einen ineffizienten Elektronentransport zwischen Q_A und Q_B auszeichnen, zurückführte. Ein zyklischer Elektronentransport um das PS II oder eine Beeinflussung von Redoxprozessen an der Akzeptorseite des PS II werden als Ursachen eines Δ pH-abhängigen Quench der Fluoreszenz durch das Reaktionszentrum angesehen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, daß die bei *Euglena gracilis* auftretende Δ pH-abhängige Löschung der Fluoreszenz einen Quench durch das RC II darstellt. Durch die Carotinoidverarmung wird in *Euglena gracilis* eine nahezu vollständige Reduzierung des oligomeren LHC II ausgelöst, was notwendigerweise dann auch zu einem Verlust der an diesen Komplex gebundenen photoprotektiven Mechanismen führt. Im Unterschied zu unbehandelten Zellen ist in carotinoidverarmten daher der Δ pH-abhängige Quench der Chlorophyllfluoreszenz im RC II dominierend. Untermuert wird dieses Ergebnis durch den beinahe vollständigen Verlust des Quench der Grundfluoreszenz (Fo) als Folge der Carotinoidverarmung. Somit kann angenommen werden, daß qE in *Euglena gracilis* offenbar nicht zu einem Quench der Grundfluoreszenz führt. DELPHIN et al. (1996) untersuchten den Δ pH-abhängigen Quench in *Rhodella violacea* (Rotalge) und ordneten aufgrund des fehlenden Quench von Fo diesen dem Reaktionszentrum zu. Die lichtinduzierte Zunahme der Rate der strahlungslosen Energieabgabe kann durch Ansäuerung des Chloroplastenlumens während der Photosynthese (KRIEGER et al., 1992), aber auch durch die Modifizierung von Reaktionszentren (WEIS UND BERRY, 1987) zu einem Quench von

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

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

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

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

Fluoreszenzemissionsspektrum, daß der ΔpH -unabhängige Quench der Chlorophyllfluoreszenz nicht durch „state transitions“ im herkömmlichen Sinne zu erklären ist.

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

Analyse des „recovery“

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Der dunkelinduzierte Quench der Chlorophyll a-Fluoreszenz

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

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

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

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

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

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

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

Die Fluoreszenzemission der Zelle und der isolierten Pigment-Proteinkomplexe

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Besonderheiten des Photosyntheseapparates von *Euglena gracilis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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