

Beziehungen zwischen den Xanthophyllzyklen und der Biosynthese von Lichtsammelxanthophyllen in Chlorophyll a/c-haltigen Algen

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Martin Lohr
geb. in Darmstadt

Mainz, 2000

Dekan:

Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

24.01.2001

... ein Gott ist der Mensch, wenn er träumt,
ein Bettler, wenn er nachdenkt, ...

HÖLDERLIN, *Hyperion*

I	Einleitung	1
1.	Stellung der Chl a/c-haltigen Algen im Pflanzenreich	1
2.	Photosynthesepigmente der Chl a/c-haltigen Algen	3
3.	Xanthophyllzyklen	8
4.	Biogenese der Xanthophylle	17
5.	Übersicht über die vorliegende Arbeit	20
II	Material und Methoden	22
1.	Allgemeines	22
2.	Algen und deren Anzucht	22
2.1	Untersuchte Algenstämme	22
2.2	Flüssigkulturen	23
2.3	Homokontinuierliche Turbidostatkultur von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	23
3.	Starklichtexperimente	26
3.1	Starklichtexperimente mit größeren Probenvolumina im Anzuchtsthermostaten	26
3.2	Starklichtexperimente mit kleineren Probenvolumina in Zentrifugengläsern	26
4.	Verwendete Hemmstoffe	27
4.1	Dithiothreitol	27
4.2	Norflurazon	27
5.	Bestimmung der Wachstumsparameter der Turbidostatkulturen	27
5.1	Wachstumsraten	27
5.2	Zellzahl	28
5.3	<i>in-vivo</i> -Absorption	28
5.4	Chlorophyllgehalt	28
6.	Pigmentanalysen	29
6.1	Probennahme und Probenlagerung	29
6.2	HPLC-Analysen von Gesamtpigmentextrakten	29
6.2.1	Extraktion der Pigmente	29
6.2.2	HPLC-Trennsystem	29
6.2.3	Pigmentidentifizierung	30
6.2.4	Pigmentquantifizierung	36
6.3	Isolierung und Charakterisierung der Xanthophyllzykluspigmente	40
6.3.1	Extraktion und Aufarbeitung der Pigmente aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	40
6.3.2	Extraktion und Aufarbeitung der Referenzpigmente aus Spinat	42
6.3.3	Extraktion und Aufarbeitung der Referenzpigmente aus Papaya	44
6.3.4	Dünnschichtchromatographie	44
6.3.5	UV/VIS-Spektrometrie	44
6.3.6	MALDI/TOF-Massenspektrometrie	44

III Ergebnisse und Diskussion.....	46
1. Untersuchung der Pigmente und der Xanthophyllzyklen von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ..	46
1.1 Charakterisierung des Wachstums der Turbidostatkulturen von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> im kontinuierlichen Schwachlicht und unter Starklicht/Schwachlicht-Zyklen	46
1.2 Auftreten von bisher nicht in Diatomeen gefundenen Carotinoiden in einer Turbidostatkultur von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> nach 6 h Starklicht	49
1.3 Identifikation der neu beobachteten Carotinoide als Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violaxanthin	50
1.4 Akkumulation auch von β -Cryptoxanthin, β -Cryptoxanthin-Epoxid und einem β -Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll im Starklicht	53
1.5 Der Viola-/Anthera/Zeaxanthin-Zyklus und ein β -Cryptoxanthin-Epoxid/ β -Cryptoxanthin-Zyklus als zwei weitere Xanthophyllzyklen neben dem Diadino-/Diatoxanthin-Zyklus in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	56
1.6 Ursachen für die Akkumulation der neuen Xanthophyllzyklus-Pools im Starklicht.....	58
1.6.1 Einfluß der Lichtintensität auf die Akkumulation.....	58
1.6.2 Einfluß der Hemmung von Deepoxidase oder Carotinoidbiosynthese auf die Akkumulation	60
1.7 Umwandlung der im Starklicht akkumulierten Pigmente während der anschließenden Schwachlichtphase	62
1.8 Diskussion der Akkumulation der drei Xanthophyllzyklus-Pools in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	64
2. Bestimmung der Xanthophyllumwandlungskinetiken in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und Modellierung der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen	69
2.1 Kinetiken der Pigmentumwandlungen im Rahmen des Xanthophyllzyklus	69
2.1.1 Xanthophyllzykluskinetiken einer Schwachlichtkultur	69
2.1.2 Xanthophyllzykluskinetiken eine Kultur nach 6 h Starklicht	71
2.1.3 Lichtintensitätsabhängigkeit der Deepoxidierungskinetiken nach 6 h Starklicht	76
2.2 Diskussion der Kinetiken und des Deepoxidierungsgrades der Xanthophyllzyklen	78
2.3 Kinetiken der Umwandlungen von Violaxanthin in Diadinoxanthin und von Diadinoxanthin in Fucoxanthin	88
2.4 Ein kinetisches Modell der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen.....	92
2.5 Diskussion der Modellierung der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen.....	96
3. Untersuchung der Pigmente und der Xanthophyllzyklen weiterer Algenarten aus der Gruppe der Chromophyten	103
3.1 Vorkommen von Viola-/Anthera-/Zeaxanthin-Zyklus und Diadino-/Diatoxanthin-Zyklus in Chromophyten sowie der Chl a/b-haltigen Alge <i>Euglena gracilis</i>	103
3.1.1 Diadinoxanthinhaltige Algen: Bacillariophyceae, Xanthophyceae, Haptophyta, Dinophyta, Euglenophyta.....	103
3.1.2 Violaxanthinhaltige Algen: Raphidophyceae, Chrysophyceae, Eustigmatophyceae.....	109
3.2 Biosyntheseverknüpfung zwischen den Xanthophyllzykluspigmenten und den Lichtsammel-xanthophyllen in Chromophyten	112
3.2.1 Heterokontophyta, Bacillariophyceae: <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und <i>Cyclotella meneghiniana</i>	112
3.2.2 Heterokontophyta, Raphidophyceae: <i>Olisthodiscus luteus</i>	119
3.2.3 Heterokontophyta, Chrysophyceae: <i>Ochromonas danica</i>	122

3.2.4	Haptophyta: <i>Prymnesium parvum</i>	125
3.2.5	Heterokontophyta, Eustigmatophyceae: <i>Nannochloropsis salina</i>	128
3.2.6	Heterokontophyta, Xanthophyceae: <i>Mischococcus sphaerocephalus</i>	131
3.2.7	Dinophyta: <i>Amphidinium carterae</i> und <i>Prorocentrum cassubicum</i>	135
3.3	Diskussion der Xanthophyllbiosynthese und der Xanthophyllzyklen in Chromophyten	139
3.3.1	Übersicht der in den untersuchten Algen identifizierten Pigmente und der aus den Experimenten ableitbaren Xanthophyllbiosynthese-Verknüpfungen in Chromophyten	139
3.3.2	Mögliche Vorteile der Verknüpfung von Xanthophyllzyklen mit der Synthese der Lichtsammelxanthophylle in Chromophyten	146
3.3.3	Evolution der Xanthophyllzyklen und der Xanthophyllbiosynthese in Chromophyten	153
IV	Ausblick	158
V	Zusammenfassung	160
VI	Literatur	162
VII	Anhang	A-1

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ax	Antheraxanthin
Car	Carotin
Caroid	Carotinoid
CE	Cryptoxanthin/Cryptoxanthin-Epoxid
Chl	Chlorophyll
Cx	β -Cryptoxanthin
CxE	β -Cryptoxanthin-Epoxid
DC	Dünnschicht-Chromatographie
Ddx	Diadinoxanthin
DPS	Deepoxidierungsstatus
DT	Diadinoxanthin/Diatoxanthin
DTT	Dithiothreitol
Dtx	Diatoxanthin
Fx	Fucoxanthin
HL	Starklicht (engl. High Light)
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
LL	Schwachlicht (engl. Low Light)
MALDI/TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation/Time-Of-Flight
M _r	Molekularmasse
MS	Massenspektrometrie
PDA	Photodiodenarray
PFD	Photonenflußdichte
Std.abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
UV/VIS	UV-/Visible-Light
VAZ	Violaxanthin/Antheraxanthin/Zeaxanthin
Vx	Violaxanthin
Zx	Zeaxanthin

I Einleitung

Was die Höheren Pflanzen auf dem Land bei der photosynthetischen CO₂-Fixierung leisten, tun ihnen die Algen in den Weltmeeren gleich. So zeichnet sich in aktuellen Modellrechnungen ab, daß das ozeanische Phytoplankton für etwa 45% der jährlichen globalen Netto-Primärproduktion verantwortlich ist (Falkowski 1994, Falkowski und Behrenfeld 1997, Field et al. 1998). Während an Land die Chlorophyll (Chl) a/b-haltigen Gefäßpflanzen den größten Anteil der pflanzlichen Biomasse stellen, dominiert in den Ozeanen die Gruppe der Chl a/c-haltigen Algen (Parsons et al. 1984). Schätzungen gehen davon aus, daß alleine die Diatomeen (syn. Kieselalgen; Bacillariophyceae) für etwa die Hälfte der marinen Primärproduktion verantwortlich sind (Werner 1977), aber auch Dinoflagellaten (Dinophyta) sowie Haptophyta (syn. Prymnesiophyta) liefern regional und saisonal bedeutende Beiträge (Taylor und Pollinger 1987, Taylor 1990, Green et al. 1990). Zudem stellen die Kieselalgen mit bisher mindestens 10.000 beschriebenen Spezies neben den zu den Chlorophyta zählenden Jochalgen die größte Algengruppe dar (Norton et al. 1996). Round und Crawford (1990) sprechen sogar von mehr als 100.000 schon beschriebenen Diatomeenarten. Trotz ihrer Bedeutung für den globalen Ökohaushalt führen die Chl a/c-haltigen Algen in der pflanzenphysiologischen Forschung nur ein Nischendasein; der größte Teil der Pflanzenforschung konzentriert sich nach wie vor auf die Biologie der Höheren Pflanzen.

1. Stellung der Chl a/c-haltigen Algen im Pflanzenreich

Obwohl die meisten Algen mikroskopisch klein sind und damit den Anschein von „einfachen“ Organismen erwecken, findet sich dennoch auf ultrastruktureller Ebene eine große Heterogenität zwischen den einzelnen Algengruppen. Wie noch genauer ausgeführt wird, ist diese Heterogenität unter anderem darin begründet, daß die verschiedenen Algentaxa stammesgeschichtlich teils sehr weit voneinander entfernt stehen (Hoek et al. 1995). Bei der Klassifizierung der Algengruppen spielte zunächst neben lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Kriterien insbesondere ihre Farbe bzw. das der Färbung zugrunde liegende Muster der akzessorischen Photosynthesepigmente eine wichtige Rolle. Alle Algen besitzen Chl a und β -Carotin (Anderson und Barrett 1986). Nachdem die phycobilinhaltigen Rotalgen schon sehr früh als eigene Gruppe erkannt worden waren (Lamouroux 1813, zitiert aus Christensen 1989; Kylin 1910 und darin zitierte Arbeiten), ergab sich unter den übrigen Algengruppen eine weitere Trennungslinie durch das Vorhandensein bzw. Fehlen von Chl b. In die Gruppe der Chl a/b-haltigen Organismen, die in der Regel grün gefärbt sind, wurden die Chlorophyta und Euglenophyta sowie später auch die Chlorarachniophyta (Hibberd und Norris 1984) eingeordnet. Die übrigen Algengruppen, deren meiste Vertreter eine gelbliche oder bräunliche Färbung aufweisen, wurden als Chromophyta zusammengefaßt (Christensen 1962, zitiert aus Christensen 1989). Mit Ausnahme der Eustigmatophyceae besitzen alle zu den Chromophyta gerechneten Algengruppen eine oder mehrere Chl c-Spezies als akzessorische Chlorophylle (Jeffrey 1989,

Jeffrey und Vesk 1997), deshalb werden sie in der Literatur auch oft als Chl a/c-haltige Algen bezeichnet.

Bei der systematischen Einordnung kommt inzwischen molekularen Markern wie den im gesamten Organismenreich verbreiteten rRNA-Sequenzen eine immer wichtigere Rolle zu (Woese 1987, Bhattacharya et al. 1992). Mit Hilfe dieser Marker sowie komplexer morphologischer Kriterien ist die Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse, also der Phylogenie der Algen, in den letzten Jahren erheblich verbessert worden. Hierbei zeigte sich, daß die ursprünglich unter dem Begriff Chromophyta zusammengefaßten Algengruppen höchst wahrscheinlich als polyphyletisch angesehen werden müssen (Bhattacharya et al. 1992, Bhattacharya und Medlin 1995, 1998, Melkonian 1996a).

Die Vorgänge der Photosynthese und damit auch die daran beteiligten Pigmente sind in allen eukaryotischen Algen in speziellen Organellen lokalisiert, den sog. Plastiden. Entwicklungsgeschichtlich stammen die Plastiden von einst freilebenden, photosynthetisch aktiven Bakterien ab, den Vorläufern der heutigen Cyanobakterien. Nach der inzwischen als gesichert anzusehenden Endosymbiontentheorie (Mereschkowsky 1905, Margulis 1981) wurden diese Bakterien von einer eukaryotischen Wirtszelle phagozytiert und anschließend „domestiziert“, anstatt verdaut zu werden (Übersicht in McFadden und Gilson 1997, Bhattacharya und Medlin 1998). Nach aktuellem Erkenntnisstand scheint es wahrscheinlich, daß diese primäre Endosymbiose zwischen einem Eukaryoten und einem Prokaryoten im Verlauf der Evolution nur einmal stattgefunden hat, die Plastiden hätten demnach einen monophyletischen Ursprung (Reith 1996, Delwiche und Palmer 1997, Kowallik 1997, Leitsch et al. 1999, Moreira et al. 2000; siehe aber auch alternative Hypothesen z.B. in Valentin 1997, Stiller und Hall 1997).

In der weiteren Entwicklung der Algen muß demnach aber schon früh eine Aufspaltung in drei Linien stattgefunden haben, aus denen die rezenten Algengruppen der Grünalgen (Chlorophyta), Rotalgen (Rhodophyta) und der Glaucocystophyta hervorgingen (Melkonian 1996a). Alle weiteren Algengruppen sind wahrscheinlich durch sekundäre Endosymbiosen entstanden, bei denen eine Grün- oder Rotalge durch eine weitere eukaryotische Zelle phagozytiert wurde. Soweit bisher untersucht, haben die Chromophyten ihre Plastiden durch sekundäre Endosymbiose mit Vorläufern der heutigen Rotalgen erworben. Dabei kam es vermutlich zu mehreren unabhängigen Endosymbioseereignissen, bei denen heterotrophe Wirtszellen verschiedener Verwandtschaftskreise jeweils eine Rotalge aufnahmen (Bhattacharya und Medlin 1998). Über die tatsächliche Anzahl der sekundären Endosymbioseereignisse, aus denen die rezenten Gruppen der Chromophyta hervorgegangen sind, besteht noch Uneinigkeit. So gehen eine Reihe von Autoren (Melkonian 1996b, Delwiche und Palmer 1997, Bhattacharya und Medlin 1998, Oliveira und Bhattacharya 2000) davon aus, daß den drei Linien der Heterokontophyta, Cryptophyta und Haptophyta getrennte Endosymbioseereignisse zugrunde liegen (innerhalb der Gruppe der Dinophyta zeichnet sich sogar das Vorkommen mehrfacher Endosymbiosen ab), während z.B. Cavalier-Smith (1999, 2000) eine einzige sekundäre Symbiose als Ausgangspunkt aller Chromophyta diskutiert. Entsprechend ist auch die Systematik der Chl a/c-

haltigen Algen noch im Fluß. Die in Tab. 1.1 wiedergegebene Systematik folgt Hoek et al. (1995), alternative Klassifikationen finden sich z.B. in Margulis et al. (1990) und in Cavalier-Smith und Chao (1996).

Tab. 1.1 *Systematik der wichtigsten zu den Chromophyta gezählten Algengruppen (nach Hoek et al. 1995).*

Abteilung	Klasse	Abteilung	Klasse
I. Heterokontophyta	1. Chrysophyceae	II. Haptophyta	Haptophyceae
	2. Raphidophyceae	III. Dinophyta	Dinophyceae
	3. Phaeophyceae	IV. Cryptophyta	Cryptophyceae
	4. Bacillariophyceae		
	5. Xanthophyceae		
	6. Eustigmatophyceae		

2. Photosynthesepigmente der Chl a/c-haltigen Algen

Obwohl die Plastiden unterschiedlicher Algengruppen ultrastrukturell z.T. erheblich voneinander abweichen (Übersicht in Wilhelm et al. 1987, weitere Details z.B. in Larkum und Barrett 1983, Staehelin 1986, Hoek et al. 1995), zeigt ihr Photosyntheseapparat, soweit untersucht, einen sehr einheitlichen Aufbau. So sind die meisten Komponenten der Elektronentransportkette in allen Plastidentypen konserviert worden (Reith 1996), ebenso wie die Ribulosebisphosphat-Carboxylase als primäres Enzym der CO₂-Fixierung (Raven et al. 1989, Raven 1997). Deutlich größer ist die Diversität allerdings hinsichtlich der akzessorischen Photosynthesepigmente. Während die photosynthetisch aktiven Organe der Höheren Pflanzen ein sehr einheitliches Muster an Pigmenten aufweisen, sind bei den überwiegend im wässrigen Milieu beheimateten Algen vielfältige Varianten zu finden. Diese Vielfalt betrifft in erster Linie die in den Algen anzutreffenden Carotinoide, genauer die Gruppe der Xanthophylle, also der sauerstoffhaltigen Carotinoide (für eine Einführung in die Struktur und Nomenklatur der Carotinoide siehe Britton 1993). Die beiden wichtigsten Funktionen dieser Pigmente im Rahmen der Photosynthese sind die Lichtsammlung sowie der Schutz des Photosyntheseapparates vor potentieller Schädigung infolge der Lichtanregung (Larkum und Barrett 1983, Siefermann-Harms 1987, Demmig-Adams et al. 1996, Niyogi 1999).

Die Vielfalt der in aquatischen Algen anzutreffenden Lichtsammelpigmente liegt unter anderem in der Notwendigkeit begründet, mit dem Medium Wasser und allen darin enthaltenen Stoffen und Partikeln um die Absorption von Licht konkurrieren zu müssen. Selbst klares Wasser zeigt im für die Photosynthese wichtigen blauen Lichtbereich von 400 bis 500 nm schon eine merkliche Absorption, eine zehn Meter dicke Schicht reinen Wassers absorbiert bereits 30% des durch sie hindurch tretenden

blauen Lichtes. Da der Extinktionskoeffizient von Wasser im Rotbereich von 550 nm an stark ansteigt, wird Licht einer Wellenlänge um 670 nm (Rotmaximum der Chl a-Absorption) schon nach 1 m Wasserdurchgang zu 30% absorbiert. Durch die in jedem natürlichen Wasserkörper anzutreffenden, gelösten organischen Huminverbindungen (Gilvin) sowie suspendierte anorganische Schwebstoffe (Tripton) wird zusätzlich ein variabler Anteil an blauem Licht absorbiert. Und schließlich absorbieren auch die Algen selbst einen nicht unerheblichen Teil des einfallenden Lichtes, so daß in vielen natürlichen Gewässern mit zunehmender Tiefe eine starke Veränderung der spektralen Zusammensetzung des Unterwasserlichtfeldes zu beobachten ist (ausführliche Darstellung in Kirk 1994). Entsprechend hoch sind die Anforderungen an die Anpassungsfähigkeit des Lichtsammelapparates der Algen hinsichtlich Intensität und spektraler Eigenschaften des zur Verfügung stehenden Lichtes (Jeffrey 1981, Larkum und Barrett 1983, Anderson und Barrett 1986).

In den Chromophyta tragen die Carotinoide wesentlich stärker zur Lichtsammlung bei als in Chl a/b-haltigen Organismen (Wilhelm 1990). Hier spielen (mit Ausnahme der Cryptophyta) Tetrapyrrole – also Chlorophylle oder Phycobiline – nicht mehr die wichtigste Rolle bei der Lichtsammlung (Anderson und Barrett 1986). Mit Fucoxanthin und Peridinin sind Pigmente entwickelt worden, die sehr effektiv die Absorption des in größeren Wassertiefen dominierenden grünen Lichtes ermöglichen. Interessanterweise sind die Proteine der Lichtsammelkomplexe (engl. Light-Harvesting-Complex = LHC), die die Antennenpigmente binden, verhältnismäßig konserviert geblieben. So deuten die Aminosäuresequenzen der in den Thylakoidmembranen von Algen inserierten (sog. intrinsischen) LHC-Proteine auf einen uniformen Aufbau dieser Proteine aus drei transmembranen α -Helices hin, und für die Struktur sowie die Bindung von Chlorophyllen wichtige Bereiche dieser Helices sind über alle Algenlinien hinweg konserviert (Green und Kühlbrandt 1995, Durnford et al. 1996). Dabei spiegeln die Verwandtschaftsverhältnisse der LHC-Proteine sehr gut die Evolution der Plastiden wider, wie ein Vergleich der phylogenetischen Stammbäume der Plastiden (Bhattacharya und Medlin 1998) mit denen der LHC-Superfamilie (Durnford et al. 1999) verdeutlicht. Allerdings unterscheiden sich die LHC-Proteine der Chl a/c-haltigen Algenklassen in ihren Pigmentbindungseigenschaften deutlich von denen der Grünalgen und Höheren Pflanzen. So binden die Chl a/b-(CAB) Proteine der Chlorophyta (Wilhelm und Lenarz-Weiler 1987, Knoetzel et al. 1988) und der Höheren Pflanzen (Peter und Thornber 1991, Bassi et al. 1993, Schmid et al. 1997, Jackowski und Jansson 1998, Ruban et al. 1999) drei bis fünf mal mehr Chlorophyll- als Carotinoidmoleküle, während in den Fucoxanthin-Chl a/c-Proteinen (FCP) der Braunalgen (De Martino et al. 1997, Pascal et al. 1998), der Diatomeen (Caron und Brown 1987, Brown 1988, Berkaloﬀ et al. 1990) oder der Goldalgen (Chrysophyceae; Lichtlé et al. 1995) sowie in den membranintrinsischen Peridinin-Chl c-Proteinen (iPCP, syn. ACP) der Dinoflagellaten (Knoetzel und Rensing 1990, Hiller et al. 1993, Jovine et al. 1995) die Chlorophylle und Carotinoide etwa im Verhältnis 1:1 vorliegen. Die LHC-Proteine der Xanthophyceen (Büchel und Wilhelm 1993) und Eustigmatophyceen (Brown 1987, Arsalane et al. 1992) nehmen mit einem Chlorophyll/Carotinoid-Verhältnis von 2 bis 2,5 eine Zwischenstellung ein. Eine Reihe von

Dinoflagellaten verfügen neben dem intrinsischen iPCP über weitere, wasserlösliche Peridinin-Chl a-Proteine (PCP), die pro Chl a sogar drei bis vier Peridinin-Moleküle binden (Hiller et al. 1999). Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine zeigen jedoch keinerlei Homologie zu denen der membran-intrinsischen Proteine der LHC-Superfamilie (Norris und Miller 1994) und auch ihre Raumstruktur unterscheidet sich deutlich von der des LHC II (Hofmann et al. 1996). Insgesamt verdeutlichen die genannten Stöchiometrien nochmals die wichtige Rolle der Carotinoide für die Lichtsammlung der Chromophyten. In Tab. 1.2 sind die wichtigsten Photosynthesepigmente der bereits in Tab. 1.1 aufgeführten Algentaxa zusammengestellt.

Tab. 1.2 *Schematische Übersicht über das Vorkommen von Chlorophyllen und Xanthophyllen in den in Tab. 1.1 aufgeführten Algenklassen. Neben den genannten Pigmenten ist in allen Klassen β -Carotin anzutreffen. Von den mit einem Fragezeichen versehenen Pigmenten ist die Lichtsammelfunktion noch nicht nachgewiesen.*

Klasse	Chl-Typen	Lichtsammelxanthophylle ^a	Xanthophyllzyklus
Chrysophyceae	Chl a, Chl c	Fucoxanthin ^{1, 2, 3}	VAZ ¹
Raphidophyceae	Chl a, Chl c	Fucoxanthin ³	VAZ ³
Phaeophyceae	Chl a, Chl c	Fucoxanthin ^{1, 3, 4}	VAZ ¹
Bacillariophyceae	Chl a, Chl c	Fucoxanthin ^{1, 3, 5, 6}	DT ¹
Xanthophyceae	Chl a, Chl c	Heteroxanthin (?), Vaucheriaxanthin-Ester (?) ^{3, 7}	DT ⁸
Eustigmatophyceae	Chl a	Violaxanthin, Vaucheriaxanthin-Ester (?) ^{3, 9}	VAZ ¹⁰
Haptophyceae	Chl a, Chl c	Fucoxanthin bzw. Fucoxanthin-Derivate ^{3, 11}	DT ¹²
Dinophyceae	Chl a, Chl c	Peridinin ^{3, 13, 14, 15}	DT ^{16, 17}
Cryptophyceae	Chl a, Chl c	Alloxanthin (?) ³	- ¹

^a kursiv gedruckte Zahlen geben Arbeiten an, in denen der Energietransfer der entsprechenden Lichtsammelxanthophylle auf Chlorophylle nachgewiesen wurde: ¹⁾ Hager und Stransky 1970b, ²⁾ Withers et al. 1981, ³⁾ Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989, ⁴⁾ Mimuro et al. 1990a, ⁵⁾ Stauber und Jeffrey 1988, ⁶⁾ Shreve et al. 1991, ⁷⁾ Büchel und Garab 1995, ⁸⁾ Stransky und Hager 1970a, ⁹⁾ Owens et al. 1987, ¹⁰⁾ Lubian und Montero 1998, ¹¹⁾ Hiller et al. 1988, ¹²⁾ Moisan et al. 1998, ¹³⁾ Mimuro et al. 1990b, ¹⁴⁾ Jovine et al. 1995, ¹⁵⁾ Bautista et al. 1999, ¹⁶⁾ Hager 1975, ¹⁷⁾ Demers et al. 1991.

Neben der Notwendigkeit der effizienten Absorption des zur Verfügung stehenden Lichtes stellt sich allen Photosynthese betreibenden Organismen aber auch das Problem, daß ihre Antennenpigmente zeitweise mehr Licht absorbieren, als in den anschließenden Prozeßketten verarbeitet werden kann. Unter Schwachlichtbedingungen ist die photochemische Quantenausbeute aus dem ersten Singulett-Anregungszustand (¹Chl*) von Chl a heraus sehr hoch: Bis zu 80% der von den Pigmenten absorbierten Lichtquanten werden für photochemische Arbeit genutzt (Übersicht in Krause und Weis

1991), der Rest geht in Form von Wärme und Fluoreszenz verloren (Abb. 1.1). Steigende Lichtintensitäten führen zur schrittweisen Herabsetzung der photochemischen Ausbeute, da immer mehr Lichtquanten auf temporär „geschlossene“ Photosysteme treffen, sobald die Absorptionsrate von Lichtquanten die Turnover-Rate des zwischen den beiden Photosystemen vermittelnden Plastochinon-Pools übersteigt (Kolber und Falkowski 1993). Dies betrifft in erster Linie das vor dem Plastochinon-Pool liegende Photosystem II (PS II).

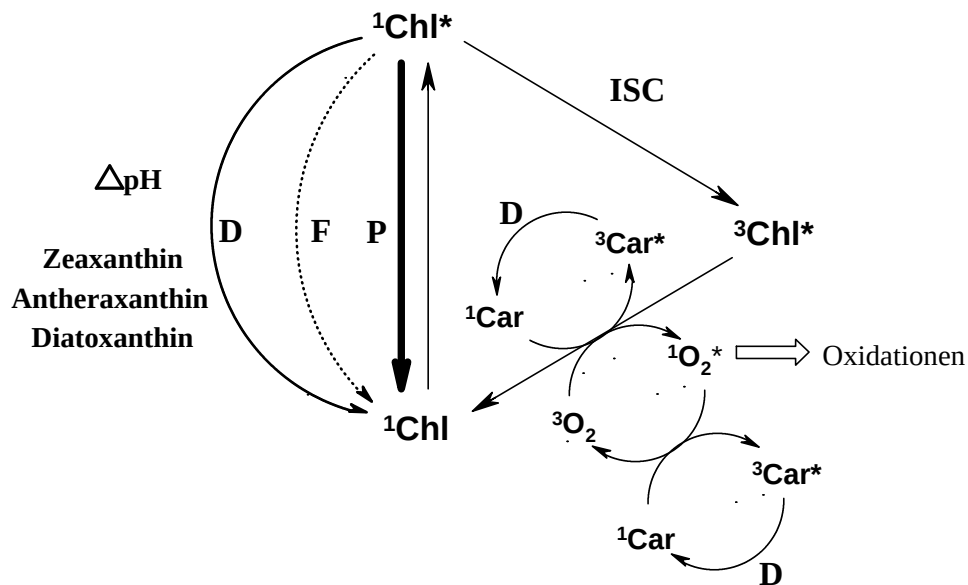


Abb. 1.1 Schema der Deaktivierungswege von Chlorophyll nach Lichtanregung (aus Demmig-Adams und Adams III 1993, leicht verändert). Car = Carotinoid, D = Dissipation (Wärmeabgabe), F = Fluoreszenz, ISC = Intersystem Crossing, P = Photochemie, 1 = Singulett-Zustand, 3 = Triplett-Zustand, * = angeregtes Molekül.

Da in geschlossenen Photosystemen die Möglichkeit zur photochemischen Nutzung der Anregungsenergie wegfällt, kommt es zur verstärkten Deaktivierung durch Wärmeabgabe und Fluoreszenz sowie zur vermehrten Bildung von Triplett-Chl ($^3\text{Chl}^*$) durch *Intersystem Crossing* von $^1\text{Chl}^*$ in den Antennen (Peterman et al. 1995) oder durch Ladungsrekombination des primären Radikalpaars im PS II-Reaktionszentrum zu $^3\text{P680}^*$ (Takahashi et al. 1987, Durrant et al. 1990, Macpherson et al. 1993). Bei der Umwandlung von $^1\text{Chl}^*$ in $^3\text{Chl}^*$ erfährt das angeregte π -Elektron des Chlorophylls eine Spinumkehrung. Da die Rückkehr des $^3\text{Chl}^*$ in den Grundzustand durch Abgabe der Anregungsenergie als Strahlung (Phosphoreszenz) oder Wärme nur nach erneuter Spinumkehrung des angeregten Elektrons erfolgen kann, ist die $^3\text{Chl}^*$ -Spezies deutlich langlebiger als $^1\text{Chl}^*$. Bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O_2) überträgt sie ihre Anregungsenergie auf diesen, wodurch er vom Triplett- in den hochreaktiven Singulett-Zustand ($^1\text{O}_2^*$) übergeht. $^1\text{O}_2^*$ wiederum reagiert leicht mit den π -Elektronensystemen von Photosynthesepigmenten, ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide, aromatischen Aminosäuren und Purinen und kann durch deren Oxidation zu schweren Zellschädigungen führen

(Krinsky 1979, Knox und Dodge 1985, Siefermann-Harms 1987). Entsprechend sind im Photosyntheseapparat sowohl Mechanismen zur Minimierung der Bildung von $^1\text{O}_2^*$ als auch solche zu seiner schnellen und effektiven Beseitigung vorhanden (Übersicht in Siefermann-Harms 1987, Demmig-Adams et al. 1996). Auch bei diesen Prozessen spielen Carotinoide eine entscheidende Rolle, wie bereits früh Experimente an photosynthetisch aktiven Organismen verdeutlichten, deren Carotinoidbiosynthese aufgrund einer Mutation defekt war oder durch Zugabe von Hemmstoffen unterbunden wurde (Sistrom et al. 1956, Vaisberg und Schiff 1976, Frosch et al. 1979).

Wie Abb. 1.1 illustriert, sind Carotinoide zunächst daran beteiligt, bereits die Entstehung von $^1\text{O}_2^*$ zu verhindern, indem sie die Anregungsenergie von $^3\text{Chl}^*$ übernehmen und in Wärme umwandeln (Dissipation). Kommt es dennoch zur Bildung von $^1\text{O}_2^*$, so können sie auch diesen über Wärmeabgabe deaktivieren. Diese photoprotektiven Funktionen können von den gleichen Carotinoiden wahrgenommen werden, die auch an der Lichtsammmlung beteiligt sind. So wurde z.B. für das Peridinin im wasserlöslichen Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) der Dinoflagellaten (Bautista et al. 1999) und für Lutein und Violaxanthin im LHC II Höherer Pflanzen (Peterman et al. 1997) gezeigt, daß die genannten Carotinoidspezies sowohl zum Energietransfer auf Chl a als auch zur Löschung von $^3\text{Chl}^*$ fähig sind. Einen speziellen Fall stellen die beiden im Reaktionszentrumskomplex von PS II gebundenen β -Carotin-Moleküle dar. Da das bei der primären Ladungstrennung entstehende P680^+ -Radikal ein sehr hohes Redoxpotential aufweist, welches erst die Wasserspaltung ermöglicht, darf β -Carotin nicht in van-der-Waals-Kontakt zu den P680-Chlorophyllen stehen, da es sonst durch P680^+ oxidiert würde (Thompson und Brudvig 1988). Folglich ist es aber auch nicht nahe genug an den P680-Chlorophyllen lokalisiert, um eine effektive $^3\text{P680}^*$ -Löschung zu ermöglichen. Statt dessen ist es für die Beseitigung von $^1\text{O}_2^*$ verantwortlich, der durch Reaktion von $^3\text{O}_2$ mit $^3\text{P680}^*$ entstehen kann (Telfer et al. 1994). Für Neoxanthin wird die gleiche Funktion bei der Löschung von im LHC II entstehendem $^1\text{O}_2^*$ diskutiert (Peterman et al. 1997, Croce et al. 1999b).

Pflanzen verfügen aber auch über Mechanismen, die bereits die Bildungswahrscheinlichkeit von $^3\text{Chl}^*$ aus $^1\text{Chl}^*$ in den Antennenkomplexen herabsetzen. Hierbei wird die dissipative Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$ auf Kosten der anderen Deaktivierungsprozesse beschleunigt. Das verringert die Wahrscheinlichkeit der $^3\text{Chl}^*$ -Bildung, jedoch wird zugleich auch die photochemische Quantenausbeute herabgesetzt (vgl. Abb. 1.1). Dieser Mechanismus würde unter Schwachlichtbedingungen einer effektiven Lichtnutzung entgegenstehen und muß deshalb regulierbar sein. Ein wichtiges Stellglied ist der durch den photochemischen Elektronentransport induzierte pH-Gradient über die Thylakoidmembran, der ein direktes Maß der Auslastung des Photosyntheseapparates darstellt. Mit zunehmender Protonenkonzentration im Thylakoidlumen wird ein wachsender Anteil der Anregungsenergie in den Lichtsammelantennen in Wärme umgewandelt (Dau und Hansen 1990, Mullineaux et al. 1994, Yahyaoui et al. 1998). Die Zunahme dieses auch als *high-energy-state quenching* (qE) bezeichneten Deaktivierungsprozesses läßt sich am leichtesten durch Messung der damit linear korrelierten Fluoreszenzabnahme (Yahyaoui et al. 1998) in Form des *non-photochemical quenching*

(NPQ) verfolgen, das zugleich als Indikator für die parallele Abnahme der photochemischen Quantenausbeuten dienen kann (Weis und Berry 1987, Genty et al. 1989).

Darüber hinaus bewirkt die photosynthetische Ansäuerung des Thylakoidlumens in den Thylakoidmembranen die Bildung bestimmter Xanthophyllspezies, mit der Folge einer deutlichen Verstärkung der nicht-photochemischen Löschung von $^1\text{Chl}^*$. Dieser Prozeß ist eine Teilreaktion des sog. Xanthophyllzyklus, der im folgenden eingehender dargestellt werden soll.

3. Xanthophyllzyklen

Schon vor mehr als 40 Jahren beschrieben erstmals Sapozhnikov und Mitarbeiterinnen (1957) die lichtabhängigen Umwandlungen von Xanthophyllen in den Blättern von Veilchen, Bohnen und Löwenzahn. Bei Starklichtinkubation der Blätter stellten sie eine Abnahme von Violaxanthin (Vx) fest, während die Konzentration eines zunächst als Lutein identifizierten Pigmentes anstieg. Bei nachfolgender Dunkelinkubation unter Sauerstoff war eine Umkehrung dieser Prozesse zu beobachten. Yamamoto und Mitarbeiter (1962) wiesen dann nach, daß Vx nicht zu Lutein, sondern zu Zeaxanthin (Zx) deepoxidiert wird und daß das Monoepoxid Antheraxanthin (Ax) eine Zwischenstufe dieser Reaktion ist (Abb. 1.2). Die Bezeichnung „Xanthophyllzyklus“ soll ausdrücken, daß Deepoxidierung und Epoxidierung im Licht parallel ablaufen, unter diesen Bedingungen also eine zyklische Umwandlung zwischen Vx und Zx stattfindet.

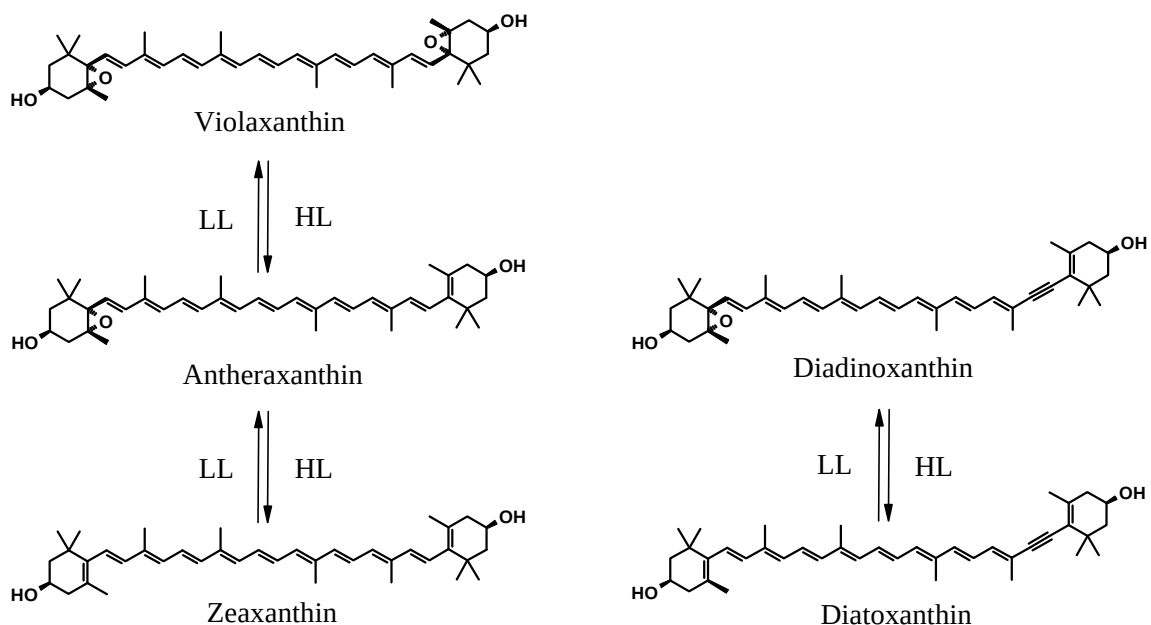


Abb. 1.2 Gegenüberstellung von Violaxanthin/Antheraxanthin/Zeaxanthin-(VAZ-)Zyklus und Diadinoxanthin/Diatoxanthin-(DT-)Zyklus. HL = Starklicht, LL = Schwachlicht.

Nachfolgende Untersuchungen ergaben, daß der Violaxanthin/Antheraxanthin/Zeaxanthin-(VAZ-) Zyklus nicht nur in Höheren Pflanzen, sondern auch in Grünalgen, Braunalgen und Goldalgen zu

finden ist (Hager und Stransky 1970a, 1970b). Bei einer Reihe weiterer Algengruppen zeigte sich, daß sie anstelle des VAZ-Zyklus über einen anderen Xanthophyllzyklus verfügen, bei dem die Pigmente Diadinoxanthin (Ddx) und Diatoxanthin (Dtx) ineinander umgewandelt werden (DT-Zyklus), während in den phycobilinghaltigen Rotalgen, Cryptophyceen und Cyanobakterien keine Epoxy-Xanthophylle und entsprechend auch keine Xanthophyllzyklen nachweisbar waren (Hager und Stransky 1970b, Stransky und Hager 1970a, 1970b, 1970c). Wie Abb. 1.2 verdeutlicht, besitzt Ddx nur eine Epoxidgruppe und wird im Starklicht zu Dtx deepoxidiert, und auch hier erfolgt im Schwachlicht die Rückumwandlung. Charakteristisch für das Pigmentpaar Ddx/Dtx ist, daß in beiden Molekülen als letzte ungesättigte Bindung vor dem einen der beiden Jononringe eine Dreifachbindung vorliegt (acetylenische Bindung), wodurch dieser weiter von der Polyenkette absteht als bei den Xanthophyllen des VAZ-Zyklus. Dieser sterische Unterschied ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, daß der entsprechende Jononring nicht epoxidiert wird. Wie aus Tab. 1.2 ersichtlich wird, besitzen alle der eingangs als wichtigste marine Primärproduzenten genannten Algengruppen den DT-Zyklus. Kürzlich wurde in Höheren Pflanzen ein weiterer Xanthophyllzyklus entdeckt, der bisher allerdings nur in einer Spezies der auf anderen Pflanzen parasitierenden Gattung *Cuscuta* (Teufelszwirn) beobachtet wurde (Bungard et al. 1999). Er beinhaltet das dort anstelle von Neoxanthin vorkommende Lutein-5,6-Epoxid und Lutein. Dieser Lutein-Epoxid/Lutein-Zyklus läuft im Teufelszwirn parallel zum VAZ-Zyklus ab. Aufgrund seines bisher einzigartigen Vorkommens soll auf diesen Zyklus hier jedoch nicht näher eingegangen werden.

Die meisten der bisherigen Untersuchungen zur Funktion der Xanthophyllzyklen wurden am VAZ-Zyklus der Höheren Pflanzen und Grünalgen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Deepoxidierung von Vx durch ein im Lumen der Thylakoide lokalisiertes Enzym katalysiert wird, das durch die im Rahmen des photosynthetischen Elektronentransportes bewirkte Ansäuerung des Lumens aktiviert wird (Abb. 1.3; Hager 1969, Hager und Holocher 1994). Als Kosubstrat benötigt diese Deepoxidase Ascorbat, welches als Elektronenlieferant für die Reduktion des Epoxidsauerstoffes zu Wasser dient. Dehydroascorbat wird durch Glutathion wieder zu Ascorbat reduziert, die Elektronen hierfür stammen letztlich aus der photosynthetischen Elektronentransportkette (Hager 1969, 1975). Die Rückreaktion der Epoxidierung von Zx zu Vx über Ax wird von einem Enzym katalysiert, das sich auf der Stroma-seite der Thylakoidmembran befindet (Hager 1975, Siefermann und Yamamoto 1975a) und mit molekularem Sauerstoff als Kosubstrat (Yamamoto und Chichester 1965, Hager 1967) sowie NADPH als Elektronendonator (Hager 1975) arbeitet. Inzwischen sind die Gensequenzen der Deepoxidase (Bugos und Yamamoto 1996, Bugos et al. 1998) und der Epoxidase (Marin et al. 1996, Bouvier et al. 1996, Burbridge et al. 1997) aus einer Reihe von Höheren Pflanzen entschlüsselt worden. Beide Enzyme sind kerncodiert.

Die physiologische Rolle des Xanthophyllzyklus blieb lange Zeit unklar. So vertrat Sapozhnikov (1973) die Ansicht, daß er in die Wasserspaltung am Photosystem II eingeschaltet sein könnte. Diese Hypothese wurde auch in jüngster Zeit noch von russischen Forschergruppen favorisiert (Maslova et

al. 1996). Doch schon 1965 zeigten Yamamoto und Chichester, daß sämtliche Sauerstoffatome im Violaxanthinmolekül nicht aus H_2O , sondern aus molekularem O_2 stammen, und Hager stellte fest, daß einerseits die Epoxidierung auch im Dunkeln abläuft (Hager 1967) und andererseits isolierte Chloroplasten auch bei gehemmtem Xanthophyllzyklus zur Sauerstoffentwicklung fähig sind (Hager 1975). Diese Ergebnisse waren bereits schwer mit der Hypothese der direkten Beteiligung des Xanthophyllzyklus an der Wasserspaltung vereinbar. Nachdem in jüngster Zeit Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (Rock und Zeevaart 1991, Niyogi et al. 1998) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi et al. 1997a) isoliert wurden, die aufgrund eines defekten Deepoxidase- oder Epoxidase-Gens keine Xanthophyllzyklusaktivität mehr zeigen, aber dennoch unter nicht-sättigenden Lichtbedingungen normales autotrophes Wachstum und photosynthetische Sauerstoffentwicklung aufweisen (Tardy und Havaux 1996, Niyogi et al. 1997a, 1997b, 1998), ist diese Hypothese als nicht mehr haltbar anzusehen.

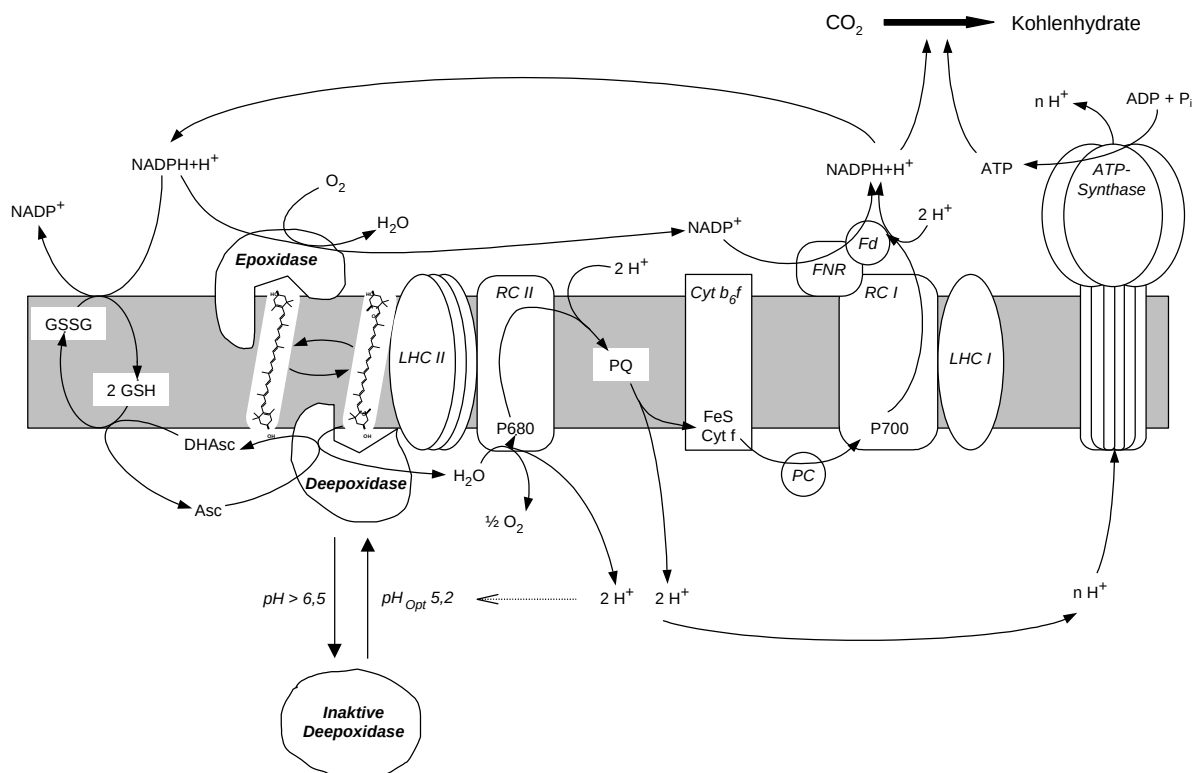


Abb. 1.3 Beziehungen zwischen dem Xanthophyllzyklus und dem photosynthetischen Elektronentransport in der Thylakoidmembran (nach Hager und Holocher 1994). Asc = Ascorbat, DHAsc = Dehydroascorbat, Fd = Ferredoxin, FNR = Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, GSH = Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion, PC = Plastocyanin, PQ = Plastochinon-Pool, RC I bzw. RC II = Reaktionszentrumskomplex von PS I bzw. PS II.

Krinsky dagegen schlug bereits 1966 vor, daß der Zyklus eine Schutzfunktion gegen photooxidative Schäden ausüben könnte. Er postulierte, daß es im Starklicht zur vermehrten Bildung von $^1\text{O}_2^*$

kommt, welcher von Zx „eingefangen“ wird, bevor er andere Verbindungen oxidieren kann. Die Epoxidierung von Zx zu Vx wäre demnach ein nicht-enzymatischer Vorgang, Krinsky betrachtete allein die Rückbildung des „Schutzpigmentes“ Zx aus Vx als enzymatisch katalysiert. Nachdem allerdings Hager (1975) klar zeigen konnte, daß auch die Epoxidierung ein enzymatischer Vorgang ist, wurde diese Hypothese ebenfalls verworfen.

Hager (1975) diskutierte als eine mögliche Funktion des Zyklus die Vernichtung von Reduktionsäquivalenten ($\text{NADPH} + \text{H}^+$), um das NADPH/ATP -Verhältnis zugunsten von ATP zu verschieben und zugleich den linearen Elektronentransport durch Regeneration des Endakzeptors NADP^+ aufrechtzuerhalten. Diese Überlegung läßt sich an Abb. 1.3 nochmals verdeutlichen: Sowohl die Deepoxidase als auch die Epoxidase reduzieren bei der Katalyse Sauerstoff mittels Elektronen, die letztlich aus der photosynthetischen Wasserspaltung stammen. Die Deepoxidierung eines Moleküls Vx zu Zx und die anschließende Rückreaktion würden zusammen vier $\text{NADPH} + \text{H}^+$ verbrauchen, während die ATP-Bilanz unverändert bliebe. Bei unter Belichtung gleichzeitig ablaufender Deepoxidierung und Epoxidierung hängt der Verbrauch an Reduktionsäquivalenten direkt von der Umsatzgeschwindigkeit des Zyklus ab. Nach Abschätzungen von Hager (1975) und Yamamoto (1979) liegt der maximale Verbrauch von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ durch den Xanthophyllzyklus jedoch etwa zwei Zehnerpotenzen unter der photosynthetischen Produktion von $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Yamamoto (1979) favorisierte deshalb eine Rolle des Xanthophyllzyklus bei der Regulation der Thylakoidmembran-Eigenschaften. Auf diese Hypothese wird an späterer Stelle im Zusammenhang mit neueren Arbeiten nochmals kurz eingegangen.

Erst 1987 entdeckten Demmig und Mitarbeiter durch parallele Messungen von Pigmentgehalten und Fluoreszenzänderungen, daß die starklichtabhängige Entstehung von Zeaxanthin eng mit der Ausbildung des NPQ korreliert ist. Diese Beobachtung war der Auslöser für zahlreiche weitere Untersuchungen, die die von Demmig et al. (1987) zunächst nur an drei Pflanzenarten gemachten Befunde anhand vieler weiterer Pflanzenspezies bestätigten (Übersicht z.B. in Demmig-Adams 1990, Demmig-Adams und Adams III 1996). Zudem zeigte sich, daß auch im Zuge der Bildung von Ax (Gilmore und Yamamoto 1993, Goss et al. 1998) und Dtx (Demers et al. 1991, Arsalane et al. 1994, Olaizola et al. 1994, Olaizola und Yamamoto 1994) eine Verstärkung des NPQ zu beobachten ist.

Unter Starklichtstreß ist sowohl im LHC II als auch im LHC I der Höheren Pflanzen eine Umwandlung von Vx zu Zx feststellbar (Thayer und Björkman 1992, Lee und Thornber 1995). Die Untersuchungen zum Mechanismus der mit der Zx-Bildung einhergehenden Fluoreszenzlöschung konzentrierten sich bisher jedoch ausschließlich auf den LHC II, da die als qE-Indikator verwendete Fluoreszenz zum größten Teil aus PS II stammt und sich Änderungen der Dissipation im LHC I auf diese Weise nicht detektieren lassen. Zudem ist PS II empfindlicher gegen Starklicht als PS I. Der Hauptteil der PS II-Antenne wird durch den majoren LHC II-Komplex (LHC IIb) gestellt, der etwa 50% des gesamten Chlorophylls und über 60% des in PS II lokalisierten Chlorophylls bindet (Yamamoto und Bassi 1996). Neben LHC IIb sind am Aufbau der PS II-Antennen noch drei weitere

Pigment-Protein-Komplexe beteiligt: LHC IIa (CP29), LHC IIc (CP26) und LHC IId (CP24). Sie binden zusammen allerdings nur etwa 15% des Gesamtchlorophylls von PS II und werden deshalb auch als minore LHC II-Komplexe bezeichnet (Yamamoto und Bassi 1996). Nachdem Untersuchungen von Bassi et al. (1993) und Ruban et al. (1994) dafür sprachen, daß die minoren LHC II-Komplexe bezogen auf ihren Chlorophyllanteil mehr Pigmente des VAZ-Zyklus binden als LHC IIb, wurden diese Komplexe als die Orte der verstärkten Dissipation von Anregungsenergie im Rahmen des qE diskutiert. Jüngste Ergebnisse an LHC II-Komplexen, die mit schonenderen Methoden isoliert wurden, lassen jedoch keine bevorzugte Bindung von Vx, Ax und Zx an die minoren LHC II-Komplexe erkennen, was die Hypothese einer besonderen Rolle der minoren Komplexe bei der Ausbildung von qE wieder in Frage stellt (Ruban et al. 1999).

Für Chl a/c-haltige Algen haben inzwischen Untersuchungen auf mRNA-Ebene (Grossman et al. 1990, Bhaya und Grossman 1993, Apt et al. 1995, Durnford et al. 1996, Smith et al. 1997, Eppard und Rhiel 1998, Hiller et al. 1999, Eppard et al. 2000) sowie verbesserte Proteinisolierungstechniken (Büchel und Wilhelm 1993, Durnford und Green 1994, Jovine et al. 1995, De Martino et al. 1997, Rhiel et al. 1997) gezeigt, daß sie ebenfalls eine Reihe von LHC-Isoformen exprimieren. Allerdings steht eine genaue Charakterisierung der einzelnen Genprodukte hinsichtlich unterschiedlicher Pigmentbindungseigenschaften sowie ihres Anteils am Gesamt-LHC noch aus. Bisherige Daten über die Verteilung der Xanthophyllzykluspigmente auf verschiedene LHC-Komplexe ergeben ein heterogenes Bild, in einigen Algenarten konnten Komplexe mit deutlich abweichenden Xanthophyllstöchiometrien aufgetrennt werden (Jovine et al. 1995, Caron et al. 1995, De Martino et al. 1997), in anderen Arten war der Unterschied zwischen den verschiedenen LHC-Fraktionen gering (Caron und Brown 1987, Berkaloﬀ et al. 1990, Büchel und Wilhelm 1993). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit die in den verschiedenen Arbeiten untersuchten LHC-Fraktionen noch heterogen waren und ob möglicherweise peripher gebundene Pigmente bei der Isolation verloren gingen. Zu klären ist weiterhin die Frage, ob in Chromophyta ebenfalls eine Unterscheidung in minore und majore LHC-Komplexe vorgenommen werden kann (De Martino et al. 1997, Rhiel et al. 1997).

Der genaue Mechanismus des qE ist immer noch unklar. Ein Modell der direkten Beteiligung von Zx an der erhöhten Dissipation in den LHC-Komplexen wurde von Owens und Mitarbeitern (Owens et al. 1992, Owens 1994) vorgeschlagen. Danach soll der erste Singulett-(S₁-)Anregungszustand von Zx, das mit 11 konjugierten Doppelbindungen ein ausgedehntes π -Elektronensystem aufweist, unterhalb des Energieniveaus von ¹Chl* liegen. Dadurch wäre Zx in der Lage, die Anregungsenergie von ¹Chl* direkt zu übernehmen und anschließend in Wärme umzuwandeln. Das Energieniveau des S₁-Zustandes von Vx mit nur neun konjugierten Doppelbindungen soll sich dagegen über dem von ¹Chl* befinden, wodurch der Energietransfer zwischen Vx und Chl bevorzugt in Richtung Chl ablaufen würde (Abb. 1.4). Der Xanthophyllzyklus wird hier als „molekulare Gangschaltung“ interpretiert, die es ermöglicht, nach Bedarf zwischen Lichtsammlung durch Vx und Photoschutz durch Zx hin- und

herzuschalten (Frank et al. 1994). Die größte Schwierigkeit bei der Überprüfung dieser Hypothese bestand bisher darin, daß die Energieniveaus der S_1 -Zustände von Carotinoiden mit mehr als acht konjugierten Doppelbindungen nicht direkt experimentell meßbar waren. Da bei Polyenen der Übergang vom Grundzustand (S_0 bzw. 1^1A_g) in den S_1 -Zustand (2^1A_g) symmetrieverboten ist und deshalb bei Lichtabsorption die direkte Anregung auf das S_2 -Niveau (1^1B_u) erfolgt, können hier die S_1 -Energien nicht einfach durch Absorptionsmessungen bestimmt werden. Eine Alternative stellt die Messung des Emissionsspektrums der Fluoreszenz aus dem S_1 -Zustand dar, Polyene mit mehr als acht konjugierten Doppelbindungen zeigen jedoch fast nur noch Fluoreszenz, die aus dem S_2 - S_0 -Übergang resultiert. Daher konnten die S_1 -Niveaus dieser Pigmente zunächst nur durch Extrapolation der an einer Serie von Polyenen mit kleineren Doppelbindungssystemen gemessenen S_2 - S_1 -Energiedifferenzen abgeschätzt werden (für eine ausführliche Erläuterung siehe Frank und Cogdell 1993). Die auf diese Weise für die Pigmente des VAZ-Zyklus (Frank et al. 1994) und des DT-Zyklus (Frank et al. 1996) gewonnenen Ergebnisse schienen im Einklang mit der Hypothese eines direkten Energielöschungsmechanismus.

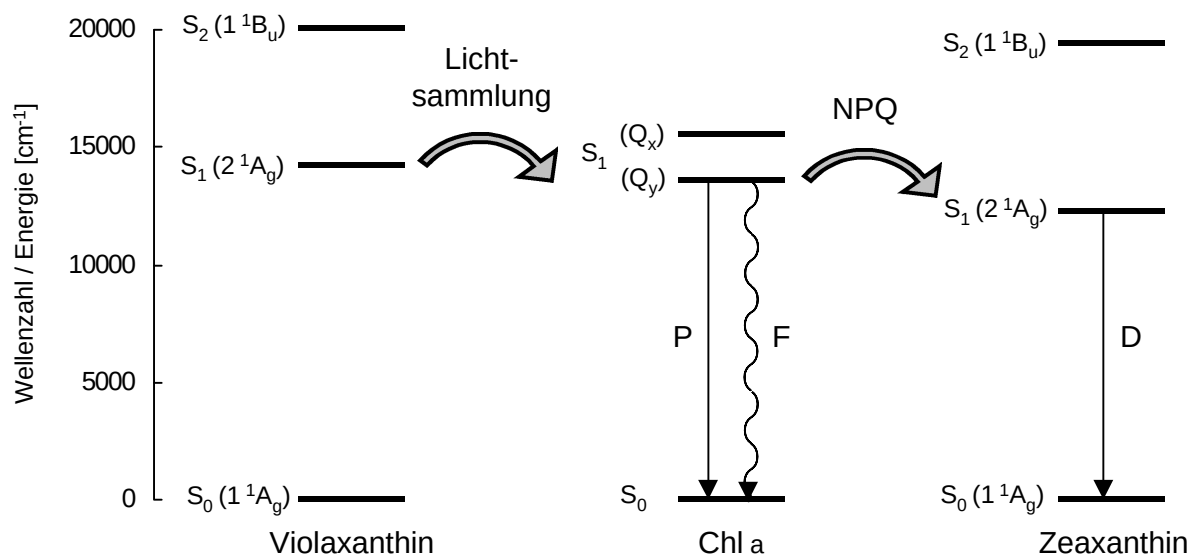


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Hypothese des "molekularen Gangschaltungs"-Mechanismus des Xanthophyllzyklus (nach Frank et al. 1994). Der Energietransfer zwischen Violaxanthin und Chl a läuft bevorzugt in Richtung Chl a ab (Lichtsammung), der Transfer zwischen Zeaxanthin und Chl a dagegen in Richtung Zeaxanthin (Energie-löschung, meßbar als NPQ). D = Dissipation, F = Fluoreszenz, NPQ = Non-Photochemical Quenching, P = Photochemie, S_0 = Grundzustand, S_1 = 1. Singulett-Niveau, S_2 = 2. Singulett-Niveau.

In jüngster Zeit ermöglichten Fortschritte in spektroskopischen Meßtechnologien erstmals eine direkte Bestimmung der Energie der S_1 -Zustände von Vx und Zx. Die von Polívka et al. (1999) mittels

Femtosekunden-Absorptionsspektroskopie bestimmten S_1 -Energieniveaus von Vx und Zx lagen beide unterhalb des S_1 -Niveaus von Chl a, besonders das Niveau von Vx befand sich deutlich unter den zuvor durch Extrapolation ermittelten Werten. Bei den zur Zeit vermutlich genauesten Messungen von Frank et al. (2000) wurden die Energieniveaus anhand von Fluoreszenzspektren ermittelt, die aufgrund der extrem geringen Quantenausbeute der S_1 -Fluoreszenzemission zuvor meßtechnisch nicht erfaßbar waren. Die Werte liegen deutlich höher als die von Polívka et al. (1999), ihren Messungen nach läge das S_1 -Niveau von Chl a doch zwischen den Niveaus von Vx und Zx. Allerdings ist der Unterschied zwischen den Energieniveaus von Vx und Zx nur halb so groß wie zuvor von Frank et al. (1994) abgeschätzt, und die S_1 -Niveaus von Zx und Chl a zeigen eine so breite spektrale Überlappung, daß ein Energietransfer in beide Richtungen gleich wahrscheinlich erscheint (Frank et al. 2000). Daraus schließen die Autoren, daß wahrscheinlich nicht die unterschiedlichen S_1 -Energieniveaus von Vx und Zx, sondern andere Prozesse für die Regulation der dissipativen Energielöschung verantwortlich sind.

Ein alternatives Modell, das durch die eben geschilderten Befunde zusätzlich an Attraktivität gewinnt, wurde fast zeitgleich zur Hypothese von Owens und Mitarbeiter (1992) durch Horton et al. (1991) vorgeschlagen. Sie postulieren einen „indirekten“ Mechanismus der Verstärkung des NPQ durch Zx. Als eigentliche Ursache der verstärkten Dissipation in den Lichtsammelantennen wird hier die Aggregation der LHC-Komplexe angesehen, die über damit einher gehende Konformationsänderungen zur Entstehung von Chlorophyllspezies mit erhöhter Dissipationsfähigkeit führen sollen. Als primärer Auslöser der LHC-Aggregation wird die photosynthetische Ansäuerung des Thylakoidlumens betrachtet (siehe Abb. 1.5). Sie bewirkt zum einen die Protonierung der Carboxylgruppen bestimmter Aminosäurereste in den lumenal exponierten Bereichen der LHC-Proteine, was eine Aggregation dieser Komplexe zu Folge hat. Zum anderen führt die erhöhte Protonenkonzentration im Lumen zur Aktivierung der Violaxanthin-Deepoxidase und damit zur Umwandlung von Vx zu Zx. Zx wird in diesem Modell nicht als direkt verantwortlich für die erhöhte Dissipation angesehen. Vielmehr soll Vx die Aggregation von LHC-Komplexen aufgrund seiner gewinkelten Molekülstruktur (die beiden Jononringe sind von der sie verbindenden Polyenkette abgewinkelt) behindern, während das planare Molekül Zx diese Aggregation fördert.

Der experimentelle Nachweis des Einflusses der verschiedenen Xanthophylle auf die LHC-Aggregation erfolgte bisher vor allem an isolierten LHC-Komplexen. Hier zeigte sich, daß die Zugabe von Zx zu solubilisiertem LHC II dessen Aggregation und die damit verbundene Fluoreszenzabnahme stimuliert, während umgekehrt Vx zuvor induzierte LHC-Aggregate destabilisiert und zum Anstieg der Fluoreszenz führt (Ruban et al. 1994, 1997). Zudem bewirkte die Zugabe des Xanthophylls Auroxanthin, das wie Zx eine planare Molekülstruktur aufweist, aber nur sieben konjugierte Doppelbindungen besitzt und daher nicht zur direkten Energieübernahme von Chl a fähig ist, eine vergleichbare Fluoreszenzlöschung wie die Zugabe von Zx (Ruban et al. 1998). Bei niedrigen Detergenskonzentrationen führte auch die Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,5 zu einer deutlichen

Fluoreszenzabnahme der Komplexe (Ruban et al. 1994). In weiteren Untersuchungen konnten in den luminal exponierten Bereichen von LHC IIc (CP26) zwei Glutamatreste identifiziert werden, die möglicherweise für die pH-Sensitivität der Fluoreszenzlöschung in diesem Komplex verantwortlich sind (Walters et al. 1996). Allerdings sind diese Aminosäurereste nicht in allen LHC-Proteinen konserviert, die als pH-Sensoren diskutiert werden.

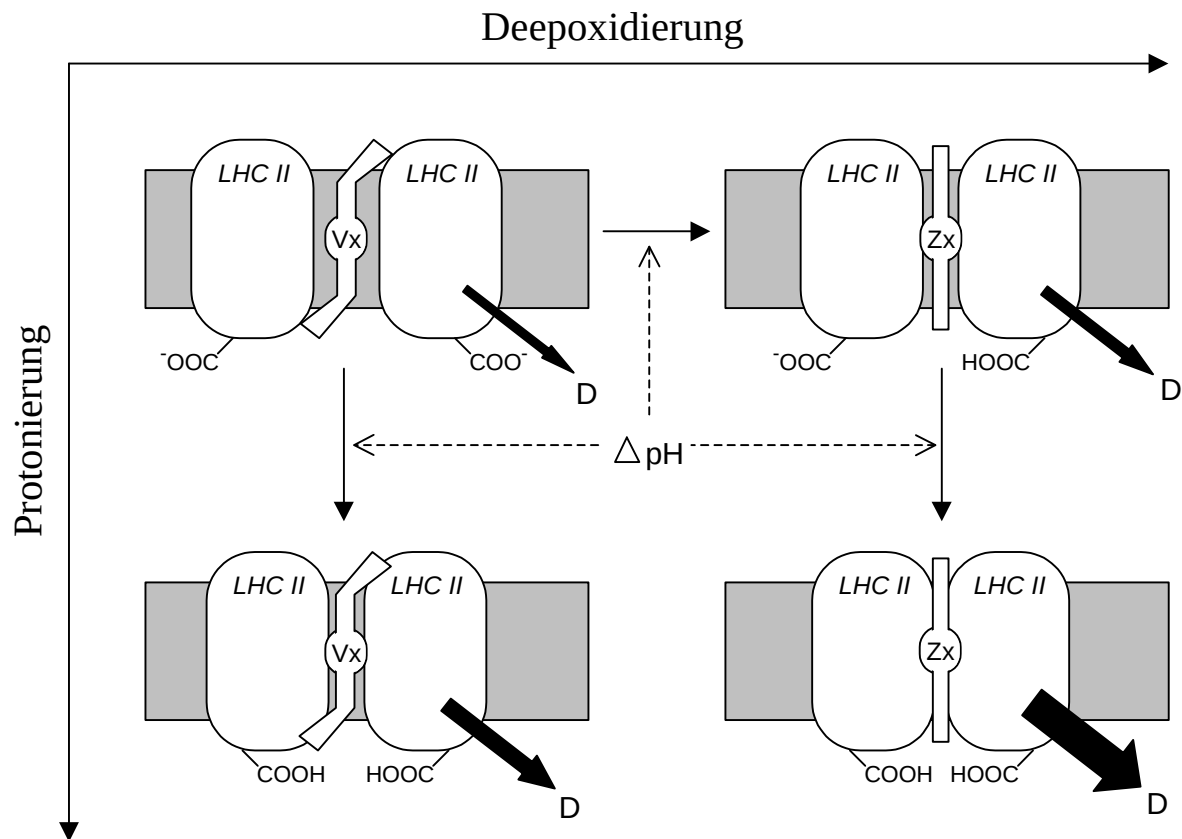


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Hypothese der allosterischen Regulation des qE. In diesem Modell wird die Dissipation von Energie im LHC II durch Änderungen seiner Struktur kontrolliert, wobei Protonen und Zeaxanthin als allosterische Effektoren fungieren. (nach Horton et al. 1991, 1996). Die photosynthetische Ansäuerung des Lumens (ΔpH) bewirkt zum einen die Protonierung der Carboxygruppen bestimmter Aminosäurereste in LHC II-Proteinen, zum anderen stimuliert sie die Deepoxidase und führt so zur Bildung von Zx aus Vx. Beide Prozesse fördern in synergistischer Weise die Dissipation (D).

Neue Impulse zur Lösung der Frage nach dem Mechanismus von qE sind durch die kürzliche Isolierung einer Mutante von *A. thaliana* zu erwarten, die zwar im Starklicht die gleiche Xanthophyllzyklusaktivität wie der Wildtyp aufweist, jedoch trotzdem nahezu kein NPQ ausbildet (Björkman und Niyogi 1998). Inzwischen konnte gezeigt werden, daß dieser Mutanten ein bestimmtes LHC-Protein fehlt, und zwar das PsbS-Protein (syn. CP22; Li et al. 2000). Seine Sequenz weist es als zur CAB-Proteinfamilie zugehörig aus. Allerdings besitzt PsbS eine vierte transmembrane α -Helix,

und aufgrund molekulinterner Sequenzhomologien wird es als Vorläufer bei der Evolution der anderen CAB-Proteine diskutiert (Green und Pichersky 1994, Green und Kühlbrandt 1995). PsbS ist in höheren Pflanzen mit einer Stöchiometrie von etwa zwei Komplexen pro PS II nachgewiesen worden und soll etwa fünf Chlorophylle und ein Xanthophyllmolekül pro Apoprotein binden (Funk et al. 1995). Über das Vorhandensein eines homologen Proteins in Chl a/c-haltigen Algen ist bisher nichts bekannt. Eine eingehende Charakterisierung des PsbS-Proteins hinsichtlich potentieller Bindungsstellen für Protonen bzw. Zeaxanthin sowie deren Einfluß auf sein Fluoreszenz- und Aggregationsverhalten verspricht die Aufklärung des molekularen Mechanismus von qE zu ermöglichen. Ebenfalls interessant wird es sein, in den verschiedenen Algengruppen mit Xanthophyllzyklus nach PsbS-homologen Proteinen zu suchen.

In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, daß für die Xanthophyllzykluspigmente neben der Verstärkung der Dissipation von Anregungsenergie weitere photoprotektive Funktionen diskutiert werden. So liegen experimentelle Belege dafür vor, daß Zx und Ax am Schutz der Thylakoidmembranlipide gegen Peroxidation durch Sauerstoffradikale beteiligt sind (Sarry et al. 1994, Havaux und Niyogi 1999). Darüber hinaus könnte der Xanthophyllzyklus auch die Thermostabilität der Photosynthesekomplexe in der Thylakoidmembran regulieren, indem das bei erhöhter Temperatur gebildete planare Molekül Zx die Fluidität der Thylakoidmembran durch Wechselwirkung mit den Membranlipiden herabsetzt (Havaux und Gruszecki 1993, Havaux und Tardy 1996).

Schließlich ist darauf hinzuweisen, daß für die Xanthophyllzykluspigmente noch weitere Funktionen diskutiert werden, die nicht mit der Photoprotektion in Verbindung stehen. So sprechen eine Reihe von Untersuchungen für eine Rolle von Zx als Blaulichtrezeptor in den Nebenzellen von Stomata (Srivastava und Zeiger 1995, Quinones et al. 1996, Frechilla et al. 1999). Ob Zx diese Funktion auch in den Koleoptilen von Mais ausübt, ist jedoch umstritten (Quinones und Zeiger 1994, Quinones et al. 1996, Palmer et al. 1996). Wie Untersuchungen an Pigmentmangelmutanten bestätigten (Rock und Zeevaart 1991, Marin et al. 1996, Niyogi et al. 1998), stellt Vx neben seiner Funktion in den Lichtsammelantennen auch die Synthesevorstufe von Neoxanthin dar, welches seinerseits der Precursor für die Biosynthese von Abscisinsäure ist (Schwartz et al. 1997). Abscisinsäure ist an vielen pflanzlichen Regulationsprozessen beteiligt, so z.B. an der Aufrechterhaltung der Samenruhe, der Regulation der Spaltöffnungen sowie generell bei der Streßantwort von Pflanzen (Zeevaart 1999).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß Xanthophyllzyklen an der Regulation der Energieumwandlung in den Photosystemen beteiligt sind, indem die deepoxidierten Xanthophyllspezies die Dissipation von Anregungsenergie verstärken. Auf welche Weise sie dies bewirken, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, ebenso wie die Frage nach der Wichtigkeit dieses Regulationsmechanismus im Zusammenspiel mit anderen photoprotektiven Mechanismen.

4. Biogenese der Xanthophylle

Die meisten Schritte der Xanthophyllbiosynthese in den photosynthetisch aktiven Organen der Höheren Pflanzen sind inzwischen aufgeklärt (für eine aktuelle Übersicht siehe Cunningham und Gantt 1998). Die Xanthophylle werden aus den Carotinen durch die enzymatische Einführung von Sauerstoffatomen synthetisiert. In Höheren Pflanzen und Grünalgen können zwei Äste der Xanthophyllbiosynthese unterschieden werden. Die eine Gruppe von Xanthophyllen leitet sich vom α -Carotin (β , ϵ -Carotin) ab. Hierzu zählen neben dem ubiquitär verbreiteten Lutein die in einer Reihe von Grünalgen vorkommenden Pigmente Loroaxanthin (Goodwin 1980, Donohue und Fawley 1995, Schagerl und Angeler 1998) sowie Siphonaxanthin und Siphonein (Goodwin 1980, Fawley et al. 1990). Die andere Xanthophyllgruppe wird aus β -Carotin gebildet und beinhaltet die Pigmente des VAZ-Zyklus sowie Neoxanthin. Auch das wirtschaftlich interessante Astaxanthin, das von einigen Grünalgen gebildet wird (Goodwin 1980), gehört in diese Gruppe.

Abb. 1.6 gibt einen Überblick über die Biosynthese der wichtigsten in Höheren Pflanzen und Grünalgen vorkommenden Xanthophylle. Ausgangsverbindung für die Synthese aller Carotinoide ist das aktive Isopren, die C₅-Verbindung Isopentenylpyrophosphat (IPP). Sie wird in den Plastiden über den 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Weg aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat synthetisiert (Lichtenthaler 1999). Die Genese der Xanthophylle aus IPP kann in vier Abschnitte gegliedert werden, sämtliche Reaktionen sind in den Plastiden lokalisiert. Zunächst wird durch mehrere Kondensierungsreaktionen aus acht Molekülen IPP die C₄₀-Verbindung Phytoen als erstes Carotinoid gebildet. Dann folgen vier Dehydrogenierungsschritte, die in Pflanzen durch die beiden in Serie arbeitenden Enzyme Phytoen-Desaturase und ζ -Carotin-Desaturase katalysiert werden. Das resultierende Lycopin weist ein π -Elektronensystem von 11 konjugierten Doppelbindungen auf, es ist die letzte gemeinsame Vorstufe aller weiteren Carotinoide (vgl. Abb. 1.6). Im dritten Abschnitt erfolgt die Bildung der Jononringe durch Zyklisierung der beiden Moleküle. Hierbei konkurrieren zwei verschiedene Enzyme um das Substrat Lycopin. Die Lycopin- ϵ -Cyclase zyklisiert Moleküle zu ϵ -Jononringen, die Lycopin- β -Cyclase bildet entsprechend β -Jononringe. Allerdings kann die ϵ -Cyclase nur an einem der beiden Moleküle einen Jononring synthetisieren, während die β -Cyclase dazu in der Lage ist, beide Enden zu zyklisieren (Cunningham et al. 1996). Zur Synthese von β -Carotin ist folglich nur die β -Cyclase erforderlich, während α -Carotin durch das Zusammenwirken von ϵ - und β -Cyclase gebildet wird. Abschließend erfolgen die Oxygenierungsreaktionen, die zur Bildung der verschiedenen Xanthophylle führen.

Von den meisten der an der Carotinoidbiosynthese in Höheren Pflanzen beteiligten Enzyme liegen inzwischen Gensequenzen vor (Bartley et al. 1994, Bartley und Skolnik 1995, Cunningham und Gantt 1998). Alle bisher untersuchten Enzyme sind kerncodiert, und die primären Expressionsprodukte weisen N-terminal Domänen auf, die wahrscheinlich als Zielsteuerungssequenzen zum Import der Enzyme in die Plastiden dienen (Cunningham und Gantt 1998). Die an der Synthese von 9'-*cis*-Neoxanthin

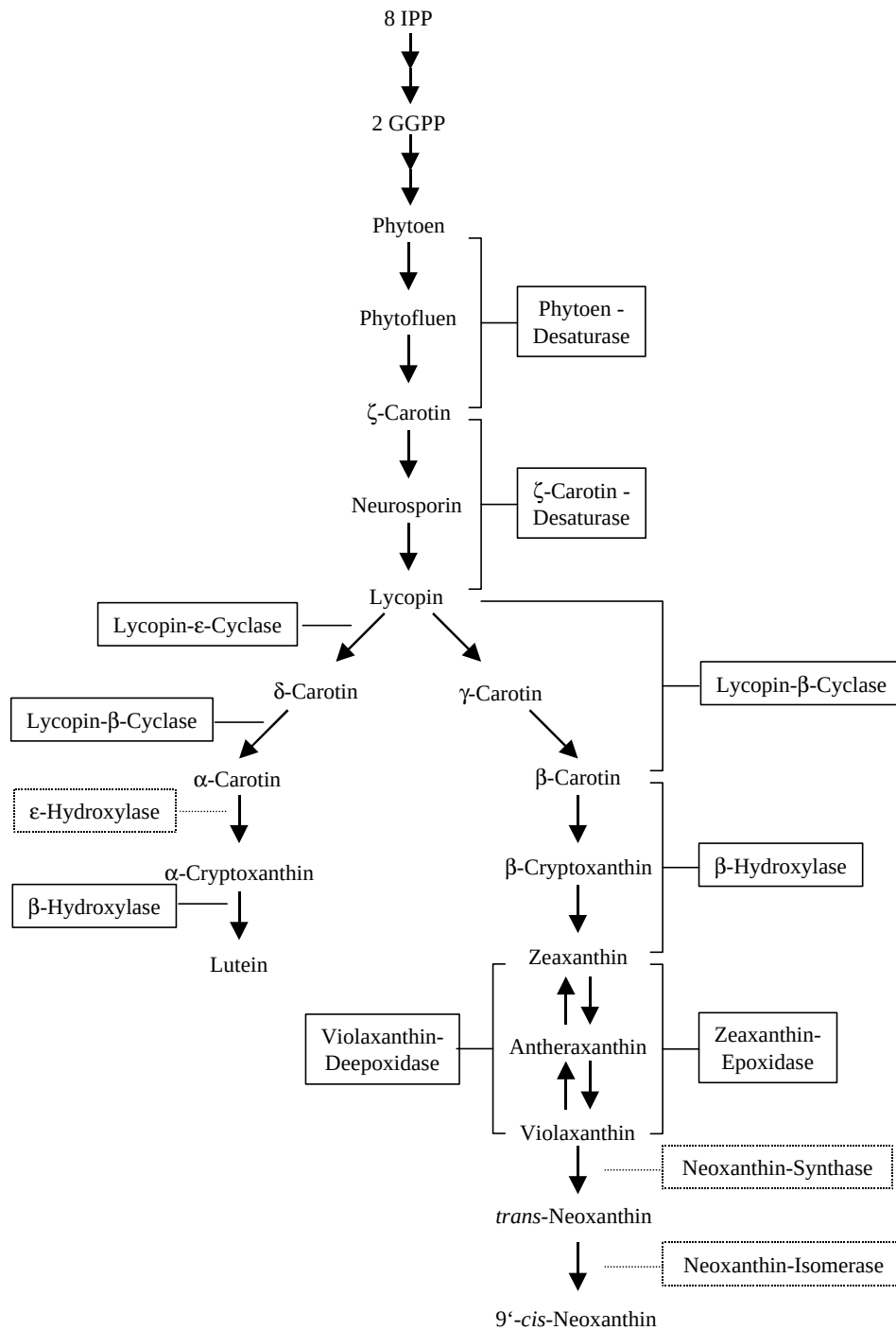


Abb. 1.6 Biosynthesewege der Carotinoide in Höheren Pflanzen und Grünalgen (nach Cunningham und Gantt 1998). Über die beiden hypothetischen Enzyme Neoxanthin-Synthase und Neoxanthin-Isomerase ist bisher noch nichts bekannt. GGPP = Geranylgeranylpyrophosphat, IPP = Isopentenylpyrophosphat.

aus Vx beteiligten Enzyme sind jedoch bisher nicht identifiziert, und für die ϵ -Hydroxylase ist auch noch keine Gensequenz bekannt, obwohl inzwischen zwei Mutanten von *A. thaliana* isoliert werden konnten, in denen die Hydroxylierung des ϵ -Jononringes nicht mehr erfolgt (Pogson et al. 1996). Die Biosynthese von Vx aus Zx wird durch die gleiche Epoxidase katalysiert, die auch am Xanthophyll-

zyklus beteiligt ist, wie die Mutanten von *A. thaliana* und *C. reinhardtii* mit defektem Epoxidase-Gen belegen.

Die Xanthophyllbiosynthese in Chl *a/c*-haltigen Algen ist bisher noch wenig untersucht. Von wenigen Ausnahmen (Cryptophyta) abgesehen finden sich hier praktisch nur von β -Carotin abgeleitete Xanthophylle. Die aktuellen Vorstellungen zu ihrer Synthese beruhen vorwiegend auf Untersuchungen auf Pigmentebene, bei denen *Pulse-Chase*-Experimente durchgeführt (Swift und Milborrow 1981, Swift et al. 1982, Goericke und Welschmeyer 1992b) oder die Auswirkung von Hemmstoffen auf die Xanthophyllakkumulation studiert wurden (Olaizola et al. 1994). An der Carotinoidbiosynthese beteiligte Enzyme oder deren Gensequenzen sind bisher nicht isoliert worden, auch wenn davon auszugehen ist, daß die frühen Schritte der Carotinoidbiosynthese in Höheren Pflanzen, Chlorophyta und Chromophyta durch homologe Enzyme katalysiert werden. Doch liegen z.B. die Schritte, die zur Bildung von Fucoxanthin führen, noch weitgehend im Dunkeln, obwohl dieses Xanthophyll das Haupt-Lichtsammelpigment der wichtigsten marinen Primärproduzenten darstellt und vermutlich das häufigste Carotinoid auf der Erde ist (Bonnnett et al. 1969).

Im Falle der Braunalgen wurde – basierend auf dem *in-vitro*-Reaktionsverhalten von Epoxy-Xanthophyllen – schon früh Violaxanthin als Ausgangsverbindung für die Synthese von Fucoxanthin vorgeschlagen (Bonnnett et al. 1969), doch steht der experimentelle Nachweis hierfür noch aus. Pigmentmarkierungsstudien deuten darauf hin, daß in Kieselalgen Diadinoxanthin einen Fucoxanthin-Precursor darstellt (Goericke und Welschmeyer 1992b), und Olaizola et al. (1994) vermuteten aufgrund der Beobachtung, daß in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* nach Hemmung der Xanthophyllzyklus-Deepoxidase im Starklicht dennoch ein Anstieg an Dtx zu beobachten ist, daß Dtx die Biosynthesevorstufe von Ddx darstellt. Allein für den Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* liegt ein etwas genaueres Bild der Reaktionssequenz vor, die dort zur Bildung von Ddx und des Lichtsammelxanthophylls Peridinin führt. Pigmentmarkierungsversuche lieferten überzeugende experimentelle Belege dafür, daß sowohl Peridinin als auch Ddx aus Zx über *trans*-Neoxanthin als Zwischenstufe gebildet werden (Swift und Milborrow 1981, Swift et al. 1982), eine Beteiligung von Vx wurde allerdings auch hier noch nicht nachgewiesen (Milborrow 1982).

5. Übersicht über die vorliegende Arbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Akklimatisierung der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* an periodische Starklichtzyklen. In einem Teil der Experimente wurden die Algen für mehrere Tage unter natürlichen Lichtbedingungen in verschiedenen Tiefenstufen eines Sees exponiert und anschließend hinsichtlich ihrer Starklichttoleranz charakterisiert (Müller 1995, Müller und Wilhelm 1997; Lohr, Müller und Wilhelm, unveröffentlicht). Ein anderer Teil der Untersuchungen verfolgte anhand von Algen, die unter definierten Bedingungen im Labor kultiviert wurden, die Fragestellung, welche Anpassungsmechanismen es den Algen erlauben, auch bei überoptimalem Lichtangebot eine hohe Produktivität aufrechtzuerhalten (Bida 1994, Domin 1995, Wilhelm et al. 1995, 1996).

Da sich im Rahmen der Freilanduntersuchungen gezeigt hatte, daß besonders die oberflächennah exponierten Algen einen relativ zum Gehalt an Chl *a* deutlich größeren Xanthophyllzyklus-Pool aufwiesen, wurden auch an den Laborkulturen von *P. tricornutum* die Pigmentänderungen während periodischer Starklichtinkubationen gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß *P. tricornutum* während einer mehrstündigen Starklichtphase beträchtliche Mengen an zuvor für Kieselalgen noch nicht beschriebenen Carotinoiden akkumuliert und daß es sich dabei um die Pigmente des VAZ-Zyklus handelt. Dieser Befund führte zu einer völlig neuen Ausrichtung der weiteren Arbeit.

Die folgenden Untersuchungen haben zunächst zum Ziel, die Identität dieser Pigmente eindeutig zu belegen sowie die Ursache ihrer Akkumulation aufzuklären. Für die erstgenannte Aufgabe werden sowohl chromatographische als auch absorptions- und massenspektroskopische Methoden eingesetzt sowie einfache Derivatisierungsreaktionen durchgeführt. Die Faktoren, die für die Akkumulation der in *P. tricornutum* neu beobachteten Xanthophylle verantwortlich sind, werden durch Variation der Starklichtbedingungen und Hemmstoffversuche herausgearbeitet. Diese Untersuchungen ermöglichen auch Aussagen über die Biosynthesebeziehungen zwischen den Pigmenten des VAZ-Zyklus, des DT-Zyklus sowie den Lichtsammelxanthophyllen in *P. tricornutum*, auf deren Grundlage sich ein Biosyntheschema der Xanthophylle in Kieselalgen postulieren läßt.

Im zweiten Teil werden die Kinetiken der Xanthophyllzyklen sowie einer Reihe weiterer Pigmentumwandlungen in *P. tricornutum* bestimmt. Die hierbei ermittelten Ratenkonstanten ermöglichen die Evaluation der zuvor postulierten Xanthophyllbiosynthesewege. Hierzu wird ein kinetisches Modell zur Berechnung der Pigmentbiosynthese- und -umwandlungsraten in homokontinuierlich angezogenen *P. tricornutum*-Kulturen entwickelt. Durch den Vergleich der experimentell ermittelten Ratenkonstanten mit den Ergebnissen dieser Modellrechnung lassen sich die postulierten Biosyntheseverknüpfungen auf relativ einfache Art überprüfen. Für diejenigen Umwandlungsschritte,

bei denen größere Diskrepanzen zwischen den mit beiden Methoden ermittelten Ratenkonstanten auftreten, lässt sich der weitere Untersuchungsbedarf abschätzen.

Im dritten Teil schließlich werden die pigmentanalytischen Untersuchungen auf weitere Chl a/c-haltige Algen aus den Abteilungen Heterokontophyta, Haptophyta und Dinophyta ausgedehnt, um zu prüfen, ob in anderen Algen mit DT-Zyklus unter Starklicht ebenfalls die Pigmente des VAZ-Zyklus akkumulieren. Auch für diese Algen sowie eine Reihe weiterer Chromophyten mit VAZ-Zyklus wird die Beziehung zwischen Xanthophyllzyklen und der Biosynthese der Lichtsammelxanthophylle untersucht. Auf der Basis dieser Ergebnisse wird eine Hypothese vorgestellt, nach der die Xanthophyllzyklen in Chromophyten neben ihrer Funktion bei der Photoprotektion auch bei der Optimierung der Lichtsammelpigment-Biosynthese unter wechselnden Lichtbedingungen eine Rolle spielen. In diesem Rahmen wird auch kurz auf die Frage eingegangen, ob der in Algen mit DT-Zyklus zusätzlich akkumulierbare VAZ-Zyklus ebenfalls eine photoprotektive Funktion hat und ob sich in diesem Fall der Beitrag beider Pools zum NPQ quantifizieren lässt. Hierzu wurden zwar bereits erste Versuche an *P. tricornutum* durchgeführt, doch bedürfen diese einer weiteren Vertiefung und wurden deshalb nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Abschließend erfolgt eine kurze Diskussion der Evolution der Xanthophyllzyklen sowie der Xanthophyllbiosynthese in Chl a/c-haltigen Algen.

II Material und Methoden

1. Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien hatten, sofern nicht gesondert angegeben, Analysen-Reinheitsgrad und stammten von MERCK.

Der beim Arbeiten mit Pigmenten eingesetzte gasförmige Stickstoff (LINDE, Mainz-Kostheim) hatte den Reinheitsgrad 4.6 (99,996% rein; O₂ < 5 vpm, H₂O < 5 vpm, C_nH_m < 0,5 vpm).

Die Sterilisation aller für die Anzucht der Algen verwendeten Glasgeräte und Kulturmedien wurde in einem Autoklaven (Tecnoclav 120, TECNOMARA, Italien) bei 125 °C für 20 min durchgeführt.

Die Bestimmung der angegebenen Photonenflußdichten (PFD) erfolgte mittels des Quantenmeßgerätes LI-189 mit planarem Sensorkopf LI-190SA der Firma LI-COR (Nebraska, USA).

2. Algen und deren Anzucht

2.1 Untersuchte Algenstämme

Tab. 2.1 *Untersuchte Algenstämme, deren systematische Einordnung, Stammbezeichnungen und Anzuchtsmedien (Stammbezeichnung in Schlösser 1994).*

Algenart	Abteilung / Klasse (nach Hoek et al. 1995)	Stammbez. der SAG	Anzuchtsmedium
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Heterokontophyta / Bacillariophyceae	1020-1a	ASP/m+Si
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Heterokontophyta / Bacillariophyceae	1090-1a	ASP/m
<i>Ochromonas danica</i>	Heterokontophyta / Chrysophyceae	933-7	Ochromonas
<i>Olisthodiscus luteus</i> ^a	Heterokontophyta / Raphidophyceae	B 46.89	ASW
<i>Mischococcus sphaerocephalus</i>	Heterokontophyta / Xanthophyceae	847-1	ASP/m
<i>Pleurochloris meiringensis</i>	Heterokontophyta / Xanthophyceae	860-3	ASP/m
<i>Nannochloropsis salina</i>	Heterokontophyta / Eustigmatophyceae	38.85	ASP/m
<i>Pavlova lutheri</i>	Haptophyta	926.1	ASW
<i>Prymnesium parvum</i>	Haptophyta	127.79	ASW
<i>Amphidinium carterae</i>	Dinophyta	B 37.80	ASW
<i>Prorocentrum cassubicum</i>	Dinophyta	B 40.80	ASW
<i>Euglena gracilis</i>	Euglenophyta	1224-5/25	Euglena

^a Diese Art ist synonym mit *Heterosigma carterae* bzw. *Heterosigma akashiwo* (Thronsen 1996)

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Algenstämme sind in Tab. 2.1 zusammengestellt. Sämtliche Kulturen wurden zwei bis drei Monate vor Beginn der jeweiligen Versuche frisch von der Sammlung für Algenkulturen an der Universität Göttingen (SAG, Katalog bei Schlösser 1994) bezogen. Die Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien sowie die Anleitungen zu ihrer Herstellung finden sich im Anhang A.

2.2 Flüssigkulturen

Alle in Tab. 2.1 aufgeführten Algenarten wurden unter sterilen Bedingungen in mit Wattestopfen verschlossenen 500 mL-Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Anzucht erfolgte in einem Weißlichtfeld (Leuchtstoffröhren-Typ L58W/25, OSRAM) mit einer PFD von $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (gemessen auf Höhe der Kulturgefäße) im 16 h Tag-/8 h Nacht-Rhythmus bei 20 °C. Die unbegeißelten Algenarten (*C. meneghiniana*, *P. tricornutum*, *M. sphaerocephalus*, *P. meiringensis* und *N. salina*) wurden auf einem Schüttler (Typ SM 25 A digi, BÜHLER, Bodelshausen) bei $120 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ kultiviert, die anderen Arten als Standkulturen angezogen. Alle Kulturen wurden im Rhythmus von zwei Wochen überimpft, wobei ein Transfer von jeweils 2-5 mL Algensuspension in 200 mL frisches Nährmedium erfolgte. Im Rahmen der Überimpfung fanden regelmäßig mikroskopische Kontrollen der Algen auf Kontamination mit Fremdorganismen statt. Für eine Kontamination der Kulturen mit Fremdalgen konnten dabei zu keiner Zeit Anhaltspunkte gefunden werden. Lediglich in über mehrere Wochen gealterten Kulturen wurde teilweise die Entwicklung größerer Mengen an Bakterien beobachtet; dies betraf in erster Linie die Algenarten aus Tab. 2.1, deren Stammbezeichnung ein B (für "bakterienhaltig") vorangestellt ist. Die entsprechenden Stammkulturen der SAG sind nicht axenisch, sondern nur unialgal (Schlösser 1994).

2.3 Homokontinuierliche Turbidostatkultur von *Phaeodactylum tricornutum*

Die homokontinuierliche Kultivierung von Algen bietet die Möglichkeit, zu jedem gewünschten Zeitpunkt homogenes, physiologisch hochaktives Algenmaterial mit gut reproduzierbaren Eigenschaften zur Verfügung zu haben. Daneben lassen sich die Wachstumsparameter der Kulturen leicht erfassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Turbidostatverfahren verwendet. Prinzip dieses Verfahrens ist es, die optische Dichte der Algensuspension durch kontrollierte Verdünnung mit frischem Nährmedium konstant zu halten. Somit sind die Algen, sobald sie nach einer Anlaufphase das logarithmische Wachstum erreicht haben, während der gesamten Kultivierungsdauer gleichbleibenden Nährstoffkonzentrationen und Beleuchtungsintensitäten ausgesetzt. Nachteile des Kulturverfahrens sind ein hoher Bedarf an Nährmedium sowie je nach der zur Verfügung stehenden Apparatur ein großer Wartungsaufwand. Deshalb wurde nur die Diatomee *P. tricornutum* im homokontinuierlichen Verfahren ange-

zogen. Sie diente als Modellorganismus für die detaillierte Charakterisierung der in dieser Arbeit vorgestellten Phänomene.

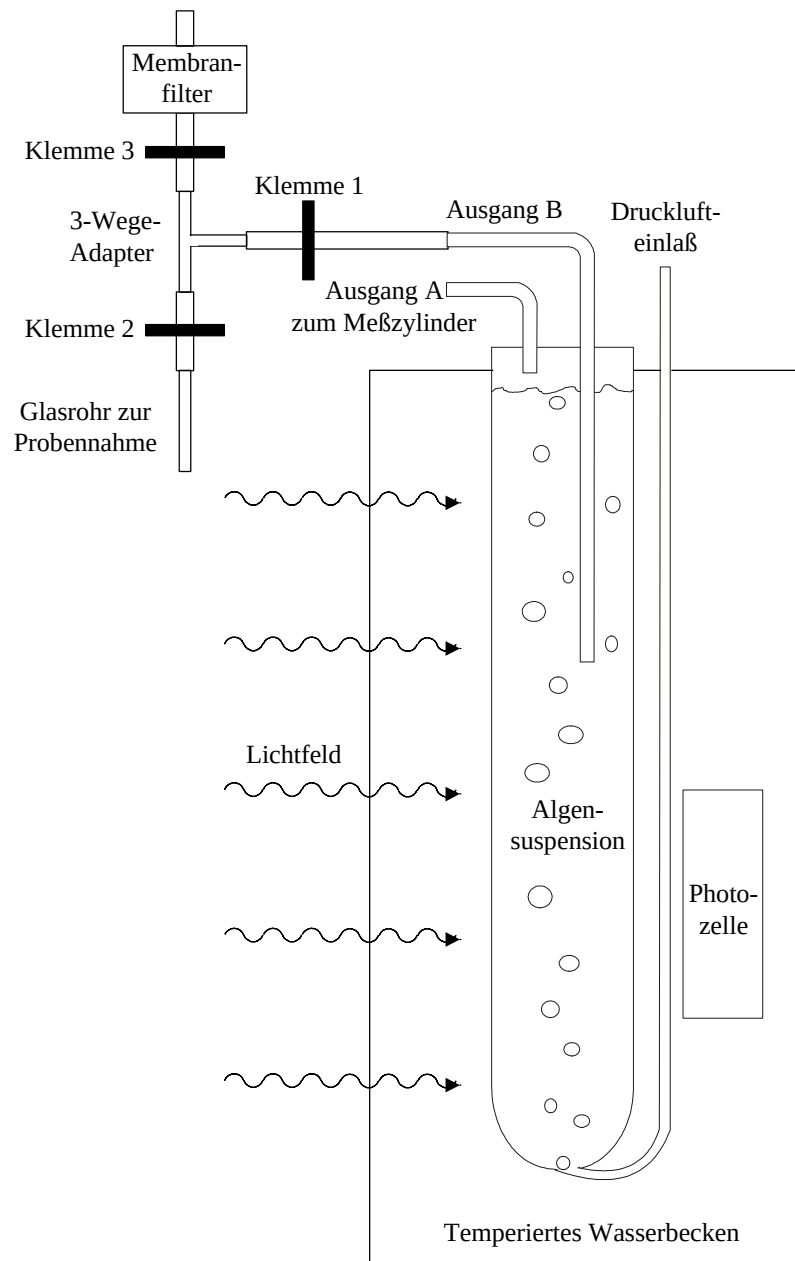


Abb. 2.1: Schema der für die homokontinuierliche Kultur von *P. tricornutum* verwendeten Apparatur (nach Wilhelm 1983, modifiziert).

Der Aufbau des verwendeten Anzuchtsthermostaten (KNIESE, Marburg) ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt. Die Kulturröhren mit einem Durchmesser von 3,5 cm befanden sich in einem auf 20 °C temperierten Wasserbecken. Ein Weißlichtfeld (Leuchtstoffröhren-Typ 36W/25-1, OSRAM) lieferte Dauerlicht mit einer mittleren PFD von $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (gemessen in der Mitte der leeren Kulturgefäße). Die Schwankung der PFD über die gesamte Röhrenlänge von 40 cm betrug $\pm 5\%$.

Um eine stetige Durchmischung und ausreichende CO₂-Versorgung der Algen zu erreichen, wurde jedes Kulturgefäß mit Druckluft bei einem Gasfluß von etwa 1 L·min⁻¹ durchsprudelt. Die über einen hauseigenen Kompressor bereitgestellte Druckluft wurde hierfür zunächst mittels Aktivkohle gereinigt und anschließend über einen Perlator als feiner Blasenschleier durch entionisiertes Wasser (Millipore Q) geleitet. Die auf diese Weise wassergesättigte Luft konnte nun auch mit hoher Flußrate durch die Kulturröhren strömen, ohne daß Verdunstungsverluste in den Gefäßen auftraten. Direkt vor dem Lufteinlaß in die Kulturröhren befand sich ein Membranfilter (Typ ME24, Cellulose-Mischester, 25 mm Durchmesser, 0,2 µm Porenweite; Filterhalter FP 025/1; beide von SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel), um eine Kontamination der Kulturen mit Bakterien über den Luftstrom zu vermeiden.

Hinter den Gefäßen platzierte Photozellen registrierten die optische Dichte der Algensuspensionen. Die Funktionsweise der Verdünnungseinheit ist bei Wilhelm (1983) näher beschrieben. Der eingestellte Sollwert entsprach der optischen Dichte einer Algensuspension mit einer Chl a-Konzentration von 1,8 mg·L⁻¹. Bei dieser Pigmentkonzentration ist der infolge von Selbstbeschattung der Algen hervorgerufene Lichtgradient in den Kulturgefäßen sehr gering. Das Wachstum der Algen wurde anhand des Überlaufvolumens ermittelt, das aus der Verdünnung der Algensuspension resultierte. Dieses Volumen wurde mit Hilfe von Meßzylindern bestimmt, die an die Kulturgefäße (Abb. 2.1, Ausgang A) angeschlossen waren (Bida 1994).

Die Entnahme von Proben aus den Kulturgefäßen erfolgte über ein etwa 15 cm in die Suspension hinein ragendes Glasröhrchen. Die äußere Öffnung dieses Röhrchens (Abb. 2.1, Ausgang B) mündete über einen kurzen Silikonschlauch in einen 3-Wege-Adapter. An diesen waren, ebenfalls mittels Silikonschläuchen, auf der einen Seite ein Membranfilter (Typ ME24, Filterhalter FP 025/1; s.o.) und auf der anderen Seite ein kurzes Glasröhrchen angeschlossen. Während des normalen Kulturbetriebes waren alle drei Wege des Adapters durch an den Silikonschläuchen angebrachte Klemmen verschlossen. Zur Entnahme von Suspension wurde zunächst das auf Klemme 2 folgende Glasröhrchen mit Ethanol benetzt und abgeflämmt. Das Öffnen der Klemmen 1 und 2 bei gleichzeitigem Verschuß des Überlaufweges (Ausgang A) führte dann zum Austritt der Suspension über Ausgang B. Zum Stopp der Entnahme wurde zunächst Klemme 1 verschlossen und dann Ausgang A geöffnet, um die Kontamination der Kulturgefäße durch über Ausgang B einströmende ungefilterte Luft zu vermeiden. Anschließend wurde Klemme 3 geöffnet und die im Bereich von Klemme 2 verbliebene Suspension mittels einer an den Membranfilter anschließbaren, luftgefüllten Spritze über das Probennahmeröhrchen herausgedrückt. Auf die gleiche Art ließ sich die in dem ins Kulturgefäß hinein ragenden Glasröhrchen verbliebene Algensuspension in das Gefäß zurück drücken, indem zuvor Klemme 2 geschlossen und Klemme 1 nochmals geöffnet wurde. Auf diese Weise konnten bei zuvor maximal gefüllten Kulturgefäßen bis zu 140 mL Algensuspension entnommen werden, ohne die Kultur zu kontaminieren.

3. Starklichtexperimente

In Abhängigkeit vom jeweils eingesetzten Probenvolumen kamen zwei unterschiedliche Starklichtsysteme zum Einsatz.

3.1 Starklichtexperimente mit größeren Probenvolumina im Anzuchtsthermostaten

Die Starklichtexposition größerer Probenvolumina erfolgte in Kulturgefäßen, wie sie auch für die Turbidostatanzucht verwendet wurden. Um während der Belichtung Temperaturkonstanz zu gewährleisten, wurden die Gefäße in den Anzuchtsthermostaten gestellt und mit Druckluft durchsprudelt, wie in Kap. 2.3 beschrieben. Zwei im Abstand von 30 cm vor den Thermostaten platzierte, übereinander angebrachte Quarz-Halogenlampen (500 W, PLUSline T3 Q/CL/P; PHILIPS) sorgten für eine über die gesamte Gefäßlänge homogene Belichtung. Die PFD – gemessen in den leeren Kulturgefäßen – konnte in Abhängigkeit von der Position der Lampen zwischen 500 und 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ variiert werden. Da die Halogenlampen eine hohe Abwärme produzieren, war während des Lampenbetriebs der Einsatz eines Ventilators zur Kühlung der bestrahlten Thermostatoberfläche erforderlich. Die Temperatur des Wasserbades konnte über ein elektrisches Thermometer auf einem Schreiber aufgezeichnet werden und lag während der gesamten Belichtungsdauer bei $20 \pm 0,5$ °C.

3.2 Starklichtexperimente mit kleineren Probenvolumina in Zentrifugengläsern

Einige Starklichtexperimente wurden mit kleineren Probenvolumina durchgeführt. Als Starklichtquelle diente hierbei ein Diaprojektor (150 W-Halogenlampe, Typ 7158 FCS A1/216; PHILIPS), der mit einem Infrarotfilter (KG1, 2 mm; SCHOTT, Mainz) bestückt war. Die Lichtintensität wurde über den Abstand zwischen Projektor und Algenprobe variiert. Für Schwachlichtbedingungen mit einer PFD von 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ wurde bei Bedarf eine Montage-Stableuchte (8 W, 2D/M F33 Reinweiss; TUNGSRAM) verwendet. Die Proben mit einem Volumen von 15 mL wurden in Zentrifugengläsern mit 20 mL Fassungsvermögen inkubiert und mit Stopfen aus Latex verschlossen. Die Stopfen waren mit zwei Öffnungen versehen: Durch die eine führte eine Pasteurpipette bis an den Boden der Gläser, die zweite war von einem kurzen Glasröhrchen durchzogen und diente als Luftauslaß. Über die Pasteurpipette wurde gereinigte, wassergesättigte Druckluft (siehe Kap. 2.3) mit einer Rate von zwei bis fünf Blasen pro Sekunde durch die Algensuspension geleitet. Alle Versuche wurden in einem auf 20 °C temperierten Raum durchgeführt; die Temperatur in den Algensuspensionen stieg während der Starklichtexposition nicht über 21 °C. Die Wägung der Proben vor und nach der maximal sechsstündigen Inkubationszeit ergab, daß der Verdunstungsverlust unter 1% lag.

4. Verwendete Hemmstoffe

In einigen Versuchen wurden Hemmstoffe eingesetzt, um gezielt einzelne der an der Umwandlung von Carotinoiden beteiligten Enzyme zu inhibieren.

4.1 Dithiothreitol

Das wasserlösliche Dithiothreitol (DTT) bewirkt eine quantitative Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen (Cleland 1964). Zugabe von DTT zu isolierten Chloroplasten (Yamamoto und Kamite 1972) oder intakten Algenzellen (Olaizola et al. 1994) hemmt die Aktivität der Xanthophyllzyklus-Deepoxidase.

Als Stammlösung diente eine wässrige 500 mM Lösung. In den Versuchen wurden DTT-Endkonzentrationen von 500 μ M bzw. 5 mM verwendet, die aus der Zugabe von 0,1 bzw. 1 Vol% dieser Stammlösung zur jeweiligen Algensuspension resultierten.

4.2 Norflurazon

Norflurazon (4-Chloro-5-(methylamino)-2-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)-3-(2H)-pyridazinon; $M_r = 303,7$) inhibiert spezifisch über nicht-kompetitive Hemmung das Enzym Phytoen-Desaturase (Sandmann et al. 1989), welches die schrittweise Oxidation von Phytoen über Phytofluen zu Lycopon katalysiert (Cunningham und Gantt 1998).

Zugabe von 0,2 Vol% einer 2,5 mM methanolischen Stammlösung zur Algensuspension ergab eine Norflurazon-Endkonzentration von 5 μ M. Bei dieser Konzentration zeigte während des Meßzeitraumes von 6 bis 12 h keine der eingesetzten Algenarten mehr eine Zunahme des Carotinoidgehaltes. Wurde eine Algensuspension mit 0,2 Vol% reinem Methanol versetzt, so ergaben sich beim Vergleich mit einer Kontrollkultur ohne Zusätze keine Auswirkungen auf die Pigmentsynthese.

5. Bestimmung der Wachstumsparameter der Turbidostatkulturen

5.1 Wachstumsraten

Die Wachstumsraten μ [d^{-1}] der Turbidostatkulturen wurden aus dem täglichen Überlaufvolumen berechnet. Für kontinuierliche Kulturen im exponentiellen Wachstum läßt sich die Wachstumsrate einer mit dem Volumen V an Algensuspension gefüllten Röhre aus dem Überlaufvolumen ΔV pro Zeitraum Δt wie folgt berechnen (siehe z.B. Phillips und Myers 1953):

$$\mu [d^{-1}] = \Delta V / \Delta t \cdot 1/V \quad (2.1)$$

5.2 Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (Blaubrand, BRAND). Hierzu wurden in der Regel bei jeder Bestimmung sämtliche Zellen ausgezählt, die sich in den 16 Kleingruppenquadraten befanden. Für jede Probe wurden zwischen sechs und acht Bestimmungen durchgeführt und dann gemittelt.

Zellzahlen wurden nur von Kulturen der Diatomee *P. tricornutum* bestimmt. Unter den gewählten Kulturbedingungen lagen praktisch ausnahmslos Zellen des ovalen Morphotyps vor (Lewin et al. 1958). Diese haben die Eigenschaft, nach der Zellteilung oft noch paarweise zusammenzulagern. Vor der Zählung wurden die Zellen daher mittels einer 5 s dauernden Ultraschallbehandlung (Gerät LABSONIC L mit Nadelsonde 40TL bei 100 W, 20 kHz; BRAUN, Melsungen) vereinzelt.

5.3 *in-vivo*-Absorption

Von *P. tricornutum* wurden auch *in-vivo*-Absorptionsspektren aufgenommen. Die Messungen erfolgten an einem Spektralphotometer mit End-On-Multiplier (Modell MPS-2000; SHIMADZU), der die Aufzeichnung der Absorptionsspektren von lichtstreuenden Proben ermöglicht. Die Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 400 bis 750 nm bei einer Spaltbreite von 2 nm und einer Schrittweite von 2,5 nm aufgenommen. Wie schon bei der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen vor den Messungen durch eine fünfsekündige Ultraschallbehandlung vereinzelt.

5.4 Chlorophyllgehalt

Die routinemäßige Chlorophyllbestimmung in den kontinuierlichen Kulturen von *P. tricornutum* erfolgte an Gesamtpigmentextrakten in 90%igem Aceton mittels Spektralphotometer (Modell U 2000, Zweistrahlphotometer, Spaltbreite 2 nm; HITACHI) nach einer empirischen Formel von Jeffrey und Humphrey (1975):

Leerwert $E_{750} := 0$

$$\text{Chl a [mg} \cdot \text{L}^{-1}] = 11,47 \cdot E_{664} - 0,40 \cdot E_{630} \quad (2.2)$$

$$\text{Chl c [mg} \cdot \text{L}^{-1}] = 24,36 \cdot E_{630} - 3,73 \cdot E_{664} \quad (2.3)$$

Für die Pigmentextraktion wurden zunächst mittels einer Pipette 5 mL Algensuspension entnommen und unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe auf einen Glasfaserfilter abgesaugt (Typ GF6, 2,5 cm Durchmesser, Tiefenfilter mit praktisch quantitativer Retention von Partikeln ab 0,5 μm Durchmesser; SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel). Der Filter wurde sofort in eine zu $\frac{1}{4}$ mit einem Glasperlengemisch (Durchmesser von 1,0-1,05 mm und 0,25-0,3 mm im Gewichtsverhältnis 1:1) gefüllte 50 mL-Duranflasche überführt und mit 5 mL 90%igem Aceton versetzt. Um Phaeophytinbildung beim Zellaufschluß zu vermeiden, erfolgte außerdem die Zugabe einer Spatelspitze

Magnesiumhydroxidcarbonat-Pentahydrat. In einem Zellhomogenisator (Typ MSK; BRAUN, Melsungen) wurden die Algen dann unter Trockeneiskühlung innerhalb von 30 s aufgebrochen. Anschließend wurden 2 mL des resultierenden Pigmentextraktes mittels einer Pasteurpipette entnommen, für 2 min bei $15600\times g$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Biofuge 13 R mit Rotor # 3754; HERAEUS SEPATECH, Hanau), der klare Überstand in eine Halbmikroküvette gefüllt und spektralphotometrisch gegen 90%iges Aceton als Referenz analysiert. Der unter Verwendung der Formeln (2.2) und (2.3) berechnete Chl-Gehalt des Extraktes entsprach direkt dem Chl-Gehalt der Algensuspension, da die abgesaugte Probe und der resultierende Acetonextrakt das gleiche Volumen aufwiesen.

6. Pigmentanalysen

6.1 Probennahme und Probenlagerung

Alle Algenproben wurden mittels 5 mL- oder 10 mL-Pipetten entnommen, direkt auf Glasfaserfilter (GF6, Durchmesser 30 mm; SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) abgesaugt und in Kryoröhrchen überführt, welche sofort in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert wurden. Die Zeit zwischen Entnahme und Einfrieren der Proben betrug in der Regel nicht mehr als 30 s. Als Saugvorrichtung diente entweder eine Wasserstrahl- oder eine strombetriebene Öl-Pumpe. Die weitere Lagerung der Proben bis zur anschließenden Gefriertrocknung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und betrug maximal zwei Wochen. Nach der Gefriertrocknung wurden die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

6.2 HPLC-Analysen von Gesamtpigmentextrakten

6.2.1 Extraktion der Pigmente

Die Pigmentextraktion der gefriergetrockneten Filter erfolgte im Prinzip nach dem bereits in Kap. 5.3 beschriebenen Verfahren. Jeder Filter wurde nach grober Vorzerkleinerung in 3 bis 5 Teile in eine Duranflasche überführt, die mit einem halben Teelöffel des in Kap. 5.3 aufgeführten Glasperlengemisches und 1,5 mL Extraktionsmittel (Methanol/ H_2O /Ethylacetat im Verhältnis 90:10:11, gepuffert mit 0,18 M Ammoniumacetat; Lohmann 1996) versetzt wurde. Nach Extraktion für 30 s im Zellhomogenisator unter Trockeneiskühlung wurde mittels einer Pasteurpipette etwa 1 mL Extrakt entnommen und zentrifugiert (2 min, $15600\times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der klare Überstand konnte nun zur HPLC-Analyse verwendet werden.

6.2.2 HPLC-Trennsystem

Die HPLC-Analysen wurden auf einer Anlage der Firma WATERS (WATERS Chromatographie Service; MILLIPORE, Eschborn) durchgeführt, die sich aus den folgenden Komponenten zusammensetzte: Einer Pumpeneinheit mit Niederdruck-Mischkammer (WATERS 600-MS, System Controller und Solvent Delivery System), einem Autosampler (WATERS 717) und einem Photodiodenarray-

(PDA-)Detektor (WATERS 996 mit Deuteriumlampe und 512 Dioden). Die Steuerung der Komponenten sowie die Aufzeichnung und Prozessierung der Daten erfolgte über einen PC (NEC Power-Mate 486/66i) unter Verwendung der Software Millennium 2.0 (WATERS).

Die Ersteinrichtung der Anlage sowie die Wahl der Trennparameter wurden durch Frau Dr. C. Lohmann und Frau Dr. P. Volkmar im Rahmen ihrer Promotionsarbeiten vorgenommen (Lohmann 1996, Volkmar 1999) und konnten somit übernommen werden. Die Pigmenttrennung erfolgte auf *reversed phase*-Säulen des Typs ET 250/4 Nucleosil 300-5 C₁₈ von MACHEREY-NAGEL (Düren), die mittels eines Wasserbades (K20/Thermostat DC3; HAAKE, Karlsruhe) auf 20 °C temperiert wurden. Zur Elution der Pigmente wurde ein von Kraay et al. (1992) entwickelter, ternärer Gradient verwendet (Tab. 2.2).

Tab. 2.2 *Zur Pigmenttrennung eingesetzter HPLC-Gradient (Kraay et al. 1992). Als Eluent A diente ein Gemisch von 85% MeOH / 15% H₂O / 0,5 M Ammoniumacetat, als Eluent B ein Gemisch aus 90% Acetonitril / 10% H₂O und als Eluent C Ethylacetat (100%). Die Flußrate betrug konstant 0,8 mL·min⁻¹.*

Zeit [min]	Eluent A	Eluent B	Eluent C	Mischung
0	60	40	0	
2	0	100	0	linear
7	0	80	20	linear
17	0	50	50	linear
21	0	30	70	linear
28,5	0	30	70	linear
29,5	0	100	0	linear
30,5	60	40	0	linear

Die Aufzeichnung der Online-Spektren durch den PDA-Detektor erfolgte mit einer Rate von 0,25 Spektren pro Sekunde im Wellenlängenbereich von 350 bis 700 nm bei einer Auflösung von 1,2 nm. Bei der Analyse von Algenproben, die mit Norflurazon behandelt waren, wurden die Spektren zwischen 270 und 700 nm aufgezeichnet, um auch die nur im UV-Bereich absorbierenden Vorstufen Phytoen und Phytofluen detektieren zu können (Sandmann und Albrecht 1990, Barry und Pallett 1990).

6.2.3 Pigmentidentifizierung

Die Identifizierung der meisten Pigmente erfolgte auf Basis der bereits von Lohmann (1996) getroffenen Zuordnung mit Hilfe der Retentionszeiten und Online-Spektren. Die insgesamt identifizierten Pigmente sind, nach Zunahme der Retentionszeiten geordnet, in Tab. 2.3 aufgelistet. Eine sichere Identifizierung ist für die meisten Pigmente dadurch möglich, daß bei Lohmann (1996) wie auch in dieser Arbeit eine Reihe von pigmentanalytisch bereits intensiv untersuchten Organismen verwendet

Tab. 2.3 *Chromatographische und spektrale Charakteristika der im HPLC-Gradienten identifizierten Pigmente. Für die Referenzorganismen sind als Referenzliteratur Arbeiten angegeben, in denen die entsprechenden Pigmente eindeutig identifiziert wurden. Für die übrigen Pigmente sind Arbeiten zitiert, die Daten ihrer Absorptionscharakteristika enthalten. Für die Berechnung der III/II-Werte der Carotinoide siehe Kap. 6.3.5. Ref.Lit. = Referenzliteratur, t_R = Retentionszeit.*

Pigment	t_R [min] Säule 1	t_R [min] Säule 2	Absorptions- maxima [nm]			III/II- Wert	Referenz- organismus	Ref.- Lit.
Chlorophyll c_3	5,7	5,2	456	587	-		<i>P. parvum</i>	1
Chlorophyll c_1	6,4	6,0	442	580	631		<i>P. tricornutum</i>	2, 3, 4
Chlorophyll c_2	6,5	6,1	447	582	631		<i>A. carterae</i>	2, 3, 4
Peridinin	8,2	8,3	-	475	-	-	<i>A. carterae</i>	4, 5, 6
Heteroxanthin	10,2	9,6		449	479	0,74	<i>M. sphaerocephalus</i>	7
Fucoxanthin	10,0	9,9	-	449	-	-	<i>P. tricornutum</i>	8
Neoxanthin	10,6	10,0	418	444	473	0,93	<i>M. sphaerocephalus</i>	7
9'-cis-Neoxanthin	11,0	10,4	415	439	467	0,93	<i>S. oleracea</i>	9
cis-Fucoxanthin	11,7	11,5		442				10
Violaxanthin	12,9	12,0	418	443	472	0,98	<i>S. oleracea</i>	11, 12
Dinoxanthin	13,2	12,6	418	443	472	0,94	<i>A. carterae</i>	4, 5, 6
Diadinoxanthin	14,5	13,4	-	449	479	0,73	<i>P. tricornutum</i>	8
Antheraxanthin	15,4	14,2	-	449	476	0,64	<i>S. oleracea</i>	11
Vaucheriaxan.-Ester 1	15,6	14,8	422	446	474	0,80	<i>M. sphaerocephalus</i>	7
Diatoxanthin	16,6	15,3	-	455	484	0,43	<i>P. tricornutum</i>	8
Vaucheriaxan.-Ester 2	17,1	15,6	422	446	474	0,80	<i>M. sphaerocephalus</i>	7
Lutein	17,1	15,7	427	449	476	0,65	<i>S. oleracea</i>	11, 12
Zeaxanthin	17,5	16,1	-	455	483	0,31	<i>S. oleracea</i>	11, 12
Vaucheriaxan.-Ester 3		16,4	422	446	474	0,80	<i>M. sphaerocephalus</i>	7
Chlorophyll b	19,4	18,5	458		646		<i>S. oleracea</i>	13
β -Cryptoxan.-Epoxid	19,5	19,0	-	449	476	0,58	<i>C. papaya</i>	14
Chlorophyll a	20,7	20,2	430		663		<i>P. tricornutum</i>	4
β -Cryptoxanthin	21,1	20,5	-	455	481	0,27	<i>C. papaya</i>	14
β -Carotin-Epoxid	22,2	21,9	-	449	476	0,60	<i>P. parvum</i>	15
α -Carotin	24,8	24,3	-	450	478	0,63	<i>P. parvum</i>	15
β -Carotin	25,0	24,6	-	456	483	0,27	<i>S. oleracea</i>	11, 12
Phaeophytin a	25,6	25,2	411		665			13
15-cis-Phytoen		25,8	-	287	-	-		16, 17

1) Fawley 1989, 2) Jeffrey 1969, 3) Jeffrey 1972, 4) Jeffrey und Wright 1997, 5) Johansen et al. 1974, 6) Swift et al. 1982, 7) Whittle und Casselton 1975b, 8) Pennington et al. 1988, 9) Takaichi und Mimuro 1998, 10) Haugan und Liaaen-Jensen 1992, 11) Hager und Meyer-Bertenrath 1967, 12) Partali et al. 1985, 13) Lichtenthaler 1987, 14) Khachik et al. 1991, 15) Berger et al. 1977, 16) Davis et al. 1966, 17) Khan et al. 1975.

wurden, die somit als Referenzen dienen konnten. Die Pigmente dieser Organismen besitzen fast ausnahmslos ausreichend charakteristische Spektren, um aus den PDA-Daten eine eindeutige Zuordnung treffen zu können.

Tab. 2.3 enthält zum einen die Retentionszeiten der Pigmente auf den beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Säulen gleichen Typs, die sich aber im Alterungsgrad unterschieden. Weiterhin sind die wichtigsten Kenndaten der Online-Spektren aufgeführt, die durch Mittelung von jeweils mindestens drei Spektren erhalten wurden. Allgemein kann festgehalten werden, daß die Spektren eines Pigmentes aus unterschiedlichen Läufen bei entsprechender Reinheit des Pigmentpeaks im Rahmen der Fehlertoleranz nicht unterscheidbar waren. Zur Identifizierung von gering konzentrierten Pigmenten wurden deren Online-Spektren unter Verwendung eines in der Auswertungssoftware integrierten Algorithmus von Savitzky und Golay (1964) geglättet. Dieser Algorithmus ermöglicht eine weitgehende Eliminierung des Signalrauschens, ohne die Form des Spektrums zu verändern. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende spektrale Auflösung der Daten. Bei der gewählten PDA-Auflösung von 1,2 nm wurde zur Auswertung eine 15-Punkt-Glättung verwendet. Außerdem ist in Tab. 2.3 zu jedem Pigment der jeweilige Referenzorganismus mit entsprechenden Literaturziten angegeben.

Die Identität der in den untersuchten Algen in größeren Mengen vorkommenden Carotinoide wurde ergänzend durch zwei einfach durchführbare Derivatisierungsreaktionen mit jeweils nachfolgender HPLC-Analyse überprüft. Der erste Schritt, die Verseifung des Pigmentextraktes, führt zur Derivatisierung mehrerer alkalilabiler Xanthophylle. Er ermöglicht außerdem die Abtrennung der Chlorophylle, aus denen andernfalls beim zweiten Schritt, der Ansäuerung, eine Reihe von Derivaten entstehen, welche die Analyse der Carotinoide erheblich stören würden. Die Ansäuerung hat die Furanoidumlagerung von 5,6-Epoxidgruppen zur Folge (Eugster 1995). Die resultierenden 5,8-Epoxide weisen nun einen um eine Doppelbindung verkürzten Chromophor auf (Abb. 2.2), was eine hipsochrome Verschiebung aller Absorptionsmaxima um etwa 20 nm zur Konsequenz hat. Im Falle des Vx mit zwei Epoxidgruppen beträgt die Verschiebung entsprechend 40 nm.

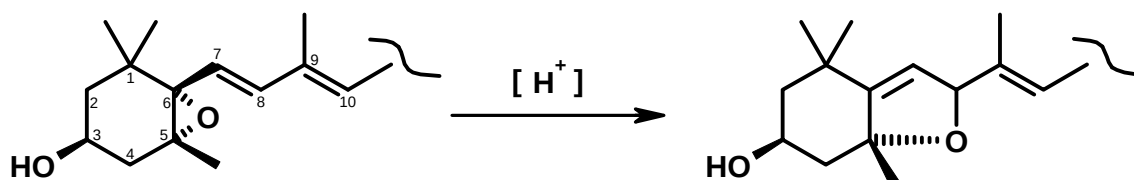


Abb. 2.2 Säurekatalysierte Umlagerung eines 5,6-Epoxides zum 5,8-Furanoid unter Verlust einer konjugierten Doppelbindung. Für weitere Details siehe z.B. Eugster (1995).

Die Benennung der meisten Furanoide erfolgt in Anlehnung an den Namen des ursprünglichen Epoxides, indem die Endung „-xanthin“ durch „-chrom“ ersetzt wird. So heißt z.B. das aus Ax entstehende Furanoid Antherachrom. Das aus Vx nach Umlagerung von nur einer Epoxidgruppe gebildete Monofuranoid wird abweichend Luteoxanthin genannt, für das Difuranoid hat sich die Bezeichnung Auroxanthin eingebürgert.

Die Verseifung wurde im wesentlichen nach Parry und Horgan (1992) durchgeführt. Hierfür wurde die nach HPLC-Injektion durch den Autosampler verbliebene Probenmenge von ca. 600 µL in ein 20 mL-Schraubdeckelglas überführt, mit 5 mL einer methanolischen 10%igen KOH-Lösung versetzt, dann mit N₂-Gas überschichtet und für 5 min bei 50 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die verseiften Pigmente nach Zugabe von 3 mL Diethylether und 8 mL H₂O_{dest.} in die Etherphase ausgeschüttelt und diese dreimal mit H₂O_{dest.} und noch zweimal mit 5 M NaCl-Lösung gewaschen, um ihr das Restwasser zu entziehen. Danach wurde 1/3 der Etherphase zwecks HPLC-Messung in ein 1 mL-Eppendorfgefäß überführt, während die verbliebenen 2/3 für die nachfolgende Ansäuerung in ein weiteres 20 mL-Schraubdeckelglas pipettiert wurden. Zur HPLC-Analyse des verseiften Extraktes wurde die im Eppendorfgefäß befindliche Pigmentlösung im N₂-Strom bis zur Trockne eingedampft, zunächst in 20 µL Ethylacetat wieder aufgenommen und schließlich mit 180 µL Extraktionsgemisch und dann mit 40 µL H₂O_{dest.} versetzt. Von diesem Gemisch wurden 100 µL in die HPLC-Anlage injiziert.

Vor der Ansäuerung des im Schraubdeckelglas verbliebenen Extraktes wurde auch dieser im N₂-Strom bis zur Trockne eingedampft, um die Pigmente anschließend in 850 µL Ethanol aufzunehmen. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µL HCl/Ethanol (1:50, v/v), und das Gemisch wurde nach Überschichtung mit N₂-Gas für 10 min bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Wie schon zuvor beschrieben, wurden die Pigmente anschließend in Diethylether ausgeschüttelt, getrocknet, wieder aufgenommen und mittels HPLC analysiert.

Im folgenden soll die Pigmentidentifizierung am Beispiel der Xanthophyceae *Mischococcus sphaerocephalus* illustriert werden. Abb. 2.3A zeigt das Chromatogramm eines Pigment-Rohextraktes aus *M. sphaerocephalus*. Der Verseifungsschritt hat die Abtrennung der Chlorophylle zur Folge, da diese nach Hydrolyse der Esterbindungen an C17³ (Phytolrest) und C13³ (Methylgruppe am Cyclopentanonring) zwei freie Carboxygruppen besitzen und daher beim Ausschütteln der Pigmente in der wässrigen Phase verbleiben. Entsprechend sind nach der Verseifung keine Chlorophylle mehr nachweisbar (Abb. 2.3B). Ebenso werden die Esterbindungen in Dinoxanthin (Acetylgruppe an C3) sowie den Vaucheriaxanthin-Estern (C3/C3' und C19') gespalten. Dies führt zur Umwandlung von Dinoxanthin in Neoxanthin, was in einer Erhöhung des Neoxanthinpeaks in Relation zu den anderen Pigmentpeaks resultiert, während Dinoxanthin nicht mehr detektierbar ist (Abb. 2.3B). Außerdem kommt es zur Bildung von freiem Vaucheriaxanthin aus den zuvor vorhandenen drei Vaucheriaxanthin-Estern.

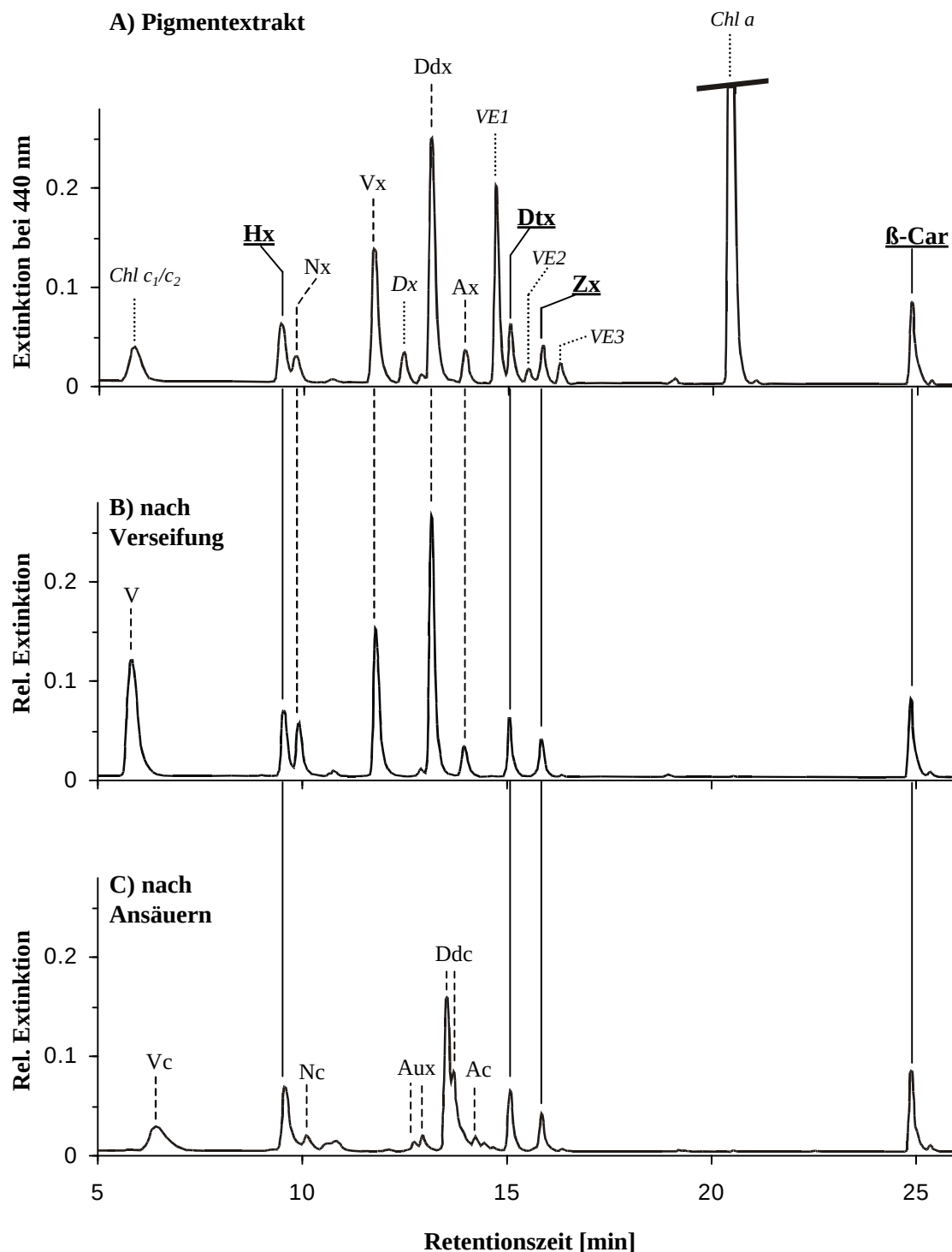


Abb 2.3 HPLC-Analyse von *Mischococcus sphaerocephalus* (Xanthophyceae). (A) Pigmentextrakt von Zellen nach 6 h Starklicht ($700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 10 min Schwachlicht ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); (B) Pigmentextrakt aus (A) nach Verseifung mit KOH; (C) Pigmentextrakt aus (B) nach Ansäuern mit HCl. Ac = Antherachrom, Aux = Auroxanthin, Ddc = Diadinochrom, Dx = Dincoxanthin, Hx = Heteroxanthin, Nc = Neochrom, Nx = trans-Neoxanthin, V = Vaucherixanthin, Vc = Vaucheriachrom, VE = Vaucherixanthin-Ester. Alkali- und säureresistente Pigmente fett und unterstrichen, alkalilabile Pigmente kursiv, säurelabile Pigmente normal beschriftet. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

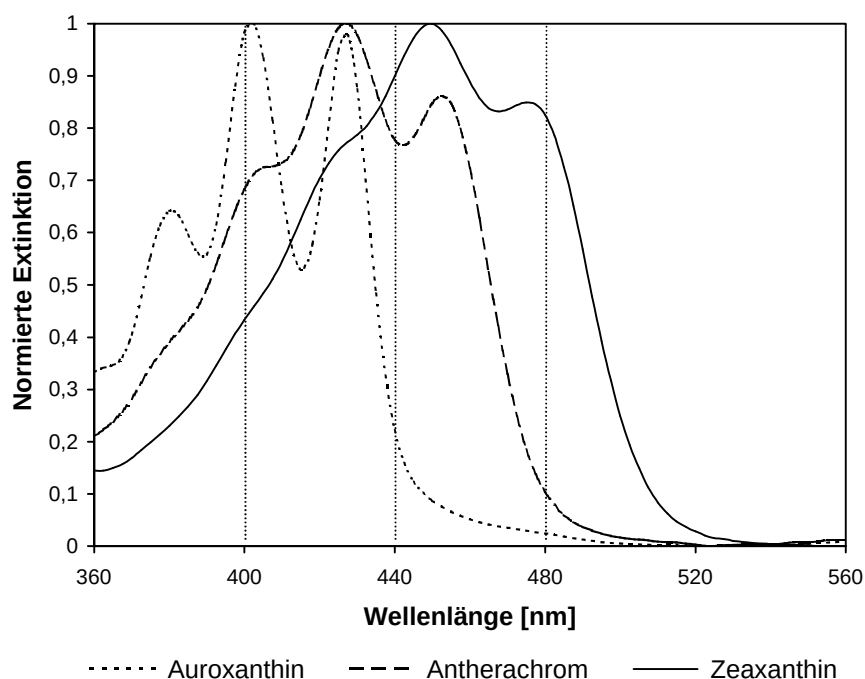


Abb. 2.4 Absorptionsspektren der Xanthophyllzykluspigmente Vx, Ax und Zx nach Einwirkung von HCl. Aus Vx ist das Difuranoid Auroxanthin entstanden, Ax wurde zu Antherachrom umgewandelt, Zx ist säurestabil.

Durch das nachfolgende Ansäuern werden die Epoxidgruppen in Neoxantin, Vx, Ddx und Antheraxantin umgelagert. Abb. 2.4 zeigt beispielhaft die Absorptionsspektren der Xanthophyllzykluspigmente Zx, Ax und Vx nach Säureeinwirkung. Das Spektrum des säurestabilen Zx bleibt unverändert, während das Spektrum des aus Ax entstandenen Monofuranoids Antherachrom um 20 nm verschoben ist und das aus Vx gebildete Difuranoid Auroxanthin um 40 nm verschobene Absorptionsmaxima aufweist (vgl. Tab. 2.3). Dadurch zeigt Auroxanthin bei 440 nm keine nennenswerte Absorption mehr und ist bei dieser Wellenlänge kaum noch detektierbar (Abb. 2.3C). Die Furanoidumlagerung führt außerdem zu einer leichten Erhöhung der Retentionszeiten sowie zu einer Peakaufspaltung, da es im Zuge der Umlagerung auch zur Racemisierung der Pigmente kommt (vgl. Abb. 2.3B und 2.3C). Die Identifizierung der verschiedenen Umlagerungsprodukte lässt sich sehr gut über einen Vergleich der HPLC-Chromatogramme bei drei verschiedenen Wellenlängen durchführen.

Abb. 2.5 zeigt die Chromatogramme einer Pigmentprobe aus *M. sphaerocephalus* nach Säurebehandlung bei den Wellenlängen 480 nm, 440 nm und 400 nm. Bei 480 nm (Abb. 2.5A) zeigen nur die nicht von einer Furanoidumlagerung betroffenen Pigmente noch nennenswerte Absorption, wie auch aus Abb. 2.4 ersichtlich wird. Bei 440 nm (Abb. 2.5B) absorbieren nun auch die Monofuranoide Vaucheriachrom, Neochrom, Diadinochrom und Antherachrom, während das aus Vx entstandene Difuranoid Auroxanthin erst bei 400 nm gut detektierbar ist (Abb. 2.5C).

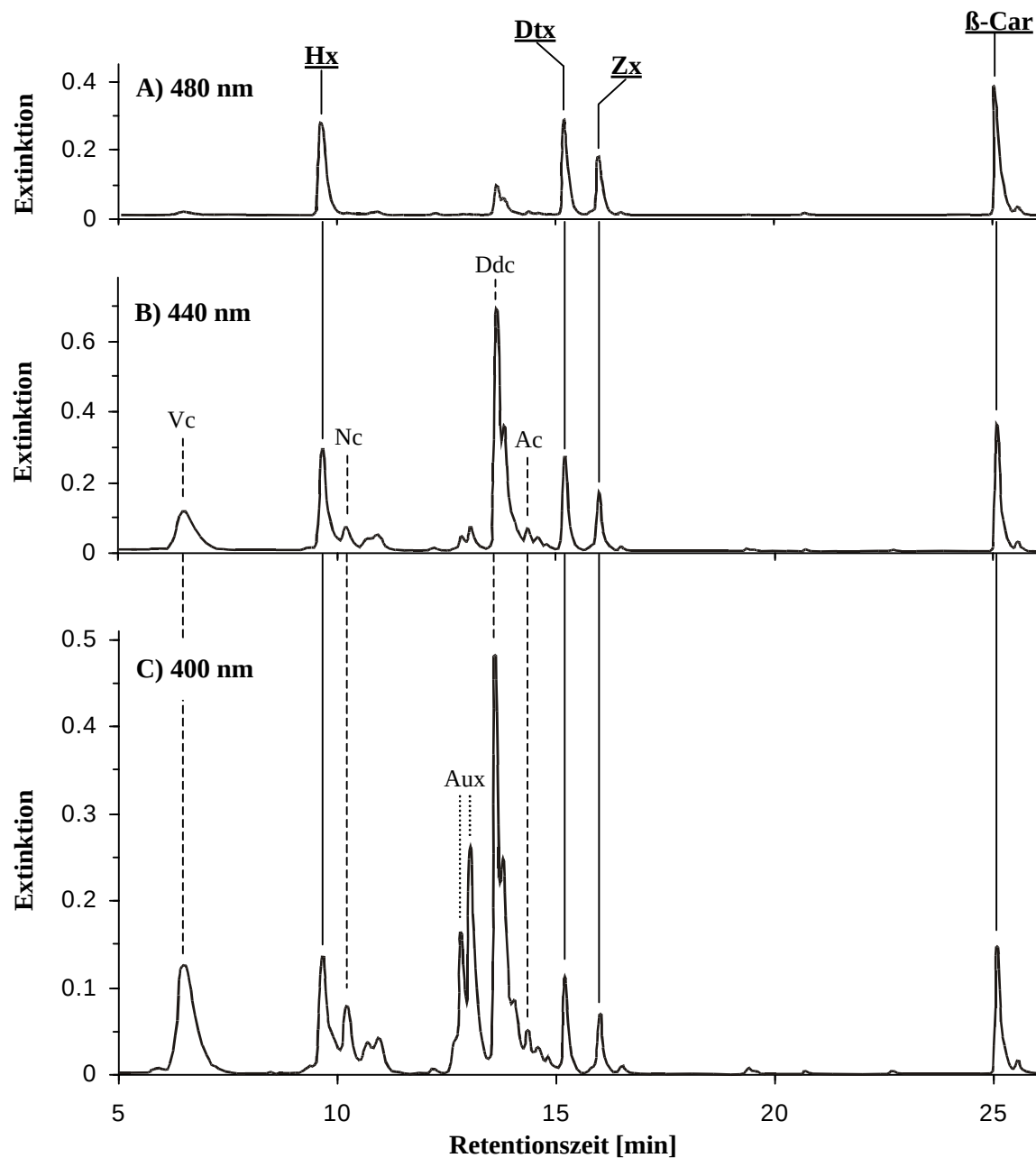


Abb 2.5 HPLC-Analyse von *Mischococcus sphaerocephalus* (Xanthophyceae). Pigmentextrakt nach Ansäuern mit HCl. Vergleich der Chromatogramme bei (A) 480 nm, (B) 440 nm und (C) 400 nm. Ac = Antherachrom, Aux = Auroxanthin, Ddc = Diadinochrom, Hx = Heteroxanthin, Nc = Neochrom, Vc = Vaucheriachrom. Säureresistente Pigmente fett und unterstrichen, andere Pigmente normal beschriftet. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

6.2.4 Pigmentquantifizierung

Abweichend von Lohmann (1996) und Volkmar (1999) wurde zur Pigmentquantifizierung – mit Ausnahme von Chl a – keine absolute Kalibrierung der Anlage für die einzelnen Pigmente vorge-

nommen. Statt dessen wurden die Extinktionskoeffizienten aus der Literatur direkt für die Quantifizierung verwendet, wodurch die Auswirkung des jeweiligen Lösungsmittels auf die Extinktion zunächst unberücksichtigt blieb. Allerdings wurde dem Einfluß des Lösungsmittels insoweit Rechnung getragen, als daß bei Vorliegen von Extinktionskoeffizienten in mehreren Solventien der Extinktionskoeffizient für das Lösungsmittel ausgewählt wurde, in dem die Lage der Absorptionsmaxima die größtmögliche Übereinstimmung mit den PDA-Online-Spektren zeigte. Zusätzlich wurden die Extinktionskoeffizienten der Xanthophyllzykluspigmente gegeneinander abgeglichen. Dies war anhand von Messungen der Xanthophyllzykluskinetiken des VAZ-Pools und des DT-Pools in *P. tricornutum* möglich (siehe Ergebnisteil, Kap. 2.1). Da diese Messungen sich nur über einen kurzen Zeitraum erstreckten, war eine Änderung der Pigmentkonzentrationen durch Neusynthese von Pigmenten auszuschließen. Es erfolgten lediglich die schnellen Umwandlungen der Xanthophyllzykluspigmente ineinander, wobei die Summe der Pigmente eines Pools bezogen auf Chl a als konstant angesehen werden konnte. Auf dieser Grundlage und unter Verwendung der Literaturdaten für A_x , Z_x und D_{dx} wurden die Extinktionskoeffizienten von V_x und D_{tx} so gewählt, daß die Summe der Pigmente jedes Pools während der ersten 10 min der Epoxidierungs- bzw. Deepoxidierungsreaktionen größtmögliche Konstanz aufwies. Tab. 2.4 gibt eine Übersicht über alle quantifizierten Pigmente und die dabei verwendeten Extinktionskoeffizienten.

Die Kalibrierung von Chl a erfolgte unter Verwendung von Gesamtpigmentextrakten von *P. tricornutum*. Hierzu wurden aus einer kontinuierlichen Kultur 140 mL entnommen (Kap. 2.3), davon 10 Proben von je 10 mL Volumen auf Filter abgesaugt und diese anschließend gefriergetrocknet. Von fünf Filterproben wurde der Chl a-Gehalt wie in Kap. 5.3 beschrieben spektralphotometrisch bestimmt, die verbliebenen fünf Proben wurden mittels HPLC aufgetrennt (Die Ergebnisse dieser Messungen finden sich in Anhang B). Anhand der Photometerdaten ließ sich nun die Menge des in die HPLC-Anlage injizierten Chl a berechnen und zum resultierenden Flächensignal des Detektors in Beziehung setzen. Der so erhaltene Faktor zur Umrechnung des Flächenintegrals in die Pigmentmenge wird durch die optische Geometrie der Detektorzelle bestimmt. Mit seiner Hilfe lassen sich die Detektorsignale für die anderen Pigmente anhand ihrer Extinktionskoeffizienten in absolute Mengen umrechnen.

Eine reproduzierbare Quantifizierung mittels eines UV/VIS-Detektors wird erschwert, wenn sich die Detektionswellenlängen in den steil abfallenden Flanken von Absorptionsspeaks befindet. Kleine Schwankungen in der Wellenlängeneinstellung des Detektors oder Verschiebungen der Pigmentabsorptionsspektren aufgrund einer leicht veränderten Zusammensetzung der Eluenten führen hier zu großen Quantifizierungsfehlern. Um diese Fehler zu minimieren, wurde jedes Pigment bei einer Wellenlänge in unmittelbarer Nähe eines seiner Absorptionsmaxima quantifiziert (vgl. Tab. 2.3 und Tab. 2.4).

Tab. 2.4 Zusammenstellung der für die Pigmentquantifizierung verwendeten Größen. Der Chl *a*-Eichwert, der für die Quantifizierung der anderen Pigmente verwendet wurde, ist fett gedruckt. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Pigment	Literaturdaten				HPLC			M _r	Area/ μ g Pigment
	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\alpha(\lambda_{\max})$ [L/10g/cm]	Lösungs- mittel	Ref.	$\lambda_{\max}$ [nm]	λ_{quant} [nm]	$\alpha(\lambda_{\text{quant}})$ [L/10g/cm]		
Chl c ₃	keine Daten; wie Chl c ₁ /c ₂				456	456	3460	652,96	23993216
Chl c ₁	443	3180	90% Aceton	1	441	440	3250	610,96	22536980
Chl c ₂	444	3740	90% Aceton	1	447	440	3250	608,96	22536980
Peridinin	472	1325	Ethanol	2	475	480	1314	630,83	9114648
Heteroxanthin	Spektrum wie Diadinoxanthin				449	480	1980	594,84	13727517
Fucoxanthin	449	1650	Petrolether	3	449	440	1544	658,92	10709573
<i>trans</i> -Neoxanthin	Spektrum wie Dincoxanthin				444	440	2146	600,89	14880787
<i>cis</i> -Neoxanthin	439	2240	Ethanol	4	439	440	2222	600,89	15408915
<i>cis</i> -Fucoxanthin	keine Daten; wie Fucoxanthin				449	440	1544	658,92	10709573
Violaxanthin	Koeffizient angeglichen ^a				443	440	2558	600,89	17741111
Dincoxanthin	441	2100	Aceton	5	443	440	2018	642,93	13994425
Diadinoxanthin	448	2230	Aceton	5	449	480	2034	582,87	14103018
Antheraxanthin	448	2350	Ethanol	6	449	480	2068	584,89	14340454
Vaucheriaxan.-Ester	2500				446	445	2495	616,89 ^c	17301466
Diatoxanthin	Koeffizient angeglichen ^b				455	480	1842	566,88	12773475
Lutein	447	2550	Ethanol	8	449	445	2476	568,89	17170058
Zeaxanthin	452	2340	Aceton	9	455	480	2062	568,89	14295657
Chl b	647	514	90% Aceton	10	646	646	513	907,51	3557181
β -Cryptoxn.-Epoxid	Spektrum wie Antheraxanthin				449	480	2126	568,89	14743207
Chl a	664	877	90% Aceton	10	663	385	574	893,52	3983686
Chl a					663	430	1049		7272969
Chl a					663	615	188		1301094
β -Cryptoxanthin	Spektrum wie Zeaxanthin				455	480	2121	552,89	14709357
β -Car-Epoxid	Spektrum wie Antheraxanthin					480	2188	552,89	15170446
α -Car	Spektrum wie Lutein				450	445	2624	536,89	18193437
β -Car	457	2505	Cyclohexan	11	456	480	2198	536,89	15238466
Phaeophytin a	665	519	80% Aceton	12	665	665	519	869,21	3598982
Phytoen	286	756	Hexan	13	287	300	538	544,96	3732623

^a angeglichenes $\alpha(\lambda_{\max})$ von 2600; Literaturwert für $\alpha(\lambda_{\max})$ von 2550 bei 443 nm in Ethanol (Jeffrey et al. 1997)

^b angeglichenes $\alpha(\lambda_{\max})$ von 2110; aus der Literatur kein $\alpha(\lambda_{\max})$ zum Vergleich vorhanden

^c M_r von Vaucheriaxanthin (nach Verseifung der Esterbindungen)

Referenzen: 1) Jeffrey 1972, 2) Jeffrey und Haxo 1968, 3) Jensen 1961, 4) Chlcnoky et al. 1966, 5) Johansen et al. 1974, 6) Hager und Meyer-Bertenrath 1966, 7) Davies 1976, 8) Zscheile et al. 1942, 9) Aasen und Liaaen-Jensen 1966, 10) Jeffrey und Humphrey 1975, 11) Isler et al. 1956, 12) Lichtenthaler 1987, 13) Khan et al. 1975.

Die Berechnung des zur jeweiligen Quantifizierungswellenlänge λ_{quant} gehörenden spezifischen Extinktionskoeffizienten $\alpha(\lambda_{\text{quant}})$ erfolgte über die Online-Spektren. Hierzu wurde für jedes Pigment der Quotient der Extinktionswerte $E(\lambda_{\text{quant}}) / E(\lambda_{\text{max}})$ aus mindestens fünf Spektren gemittelt und dann mit dem jeweiligen $\alpha(\lambda_{\text{max}})$ -Literaturwert multipliziert. Für ein beliebiges Pigment P berechnet sich der Extinktionskoeffizient $\alpha(\lambda_{\text{quant}})_P$ demnach als:

$$\alpha(\lambda_{\text{quant}})_P = \alpha(\lambda_{\text{max}})_P \cdot E(\lambda_{\text{quant}})_P / E(\lambda_{\text{max}})_P \quad (2.4)$$

Der Faktor für die Umrechnung der Detektorflächen in die spezifischen Pigmentmengen ergibt sich dann aus:

$$\text{Area}/\mu\text{g P} = \text{Area}/\mu\text{g Chl a} \cdot \alpha(\lambda_{\text{quant}})_P / \alpha(\lambda_{\text{quant}})_{\text{Chl a}} \quad (2.5)$$

Die resultierenden Werte für $\alpha(\lambda_{\text{quant}})$ und die Area/ μg Pigment sind ebenfalls in Tab. 2.4 aufgeführt.

Für einige Xanthophylle wurden die Extinktionskoeffizienten bisher noch nicht bestimmt (Jeffrey et al. 1997). Sofern aber zwei Carotinoide den gleichen Chromophor (Polyenkette inklusive der das konjugierte Doppelbindungssystem beeinflussenden Substituenten) aufweisen, sind ihre Absorptionsspektren identisch; gleiches gilt auch für ihre molaren Extinktionskoeffizienten (Britton 1995). Somit können Pigmente, für die keine Angaben zum Extinktionskoeffizient vorhanden sind, mittels der Koeffizienten anderer Pigmente mit gleichem Chromophor quantifiziert werden. In Tab. 2.4 ist für die betreffenden Xanthophylle das jeweilige Pigment mit identischem Chromophor angegeben. Wie zu fordern, wies jedes Pigmentpaar auch das gleiche Online-Absorptionsspektrum auf. Die Berechnung des fehlenden spezifischen Extinktionskoeffizienten $\alpha(\lambda_{\text{quant}})_X$ für ein Pigment X aus dem Koeffizienten $\alpha(\lambda_{\text{quant}})_P$ eines Pigmentes P mit identischem Chromophor erfolgte über die ebenfalls in Tab. 2.4 angegebenen Molmassen (M_r) der beiden Pigmente nach folgender Formel:

$$\alpha(\lambda_{\text{quant}})_X = \alpha(\lambda_{\text{max}})_P \cdot M_r(P) / M_r(X) \quad (2.6)$$

Für die Vaucheriaxanthin-Ester konnte nicht auf ein Referenzpigment mit gleichem Absorptionsspektrum zurückgegriffen werden. Ihre Quantifizierung erfolgte mit dem gebräuchlichen $\alpha(\lambda_{\text{max}})$ -Wert von $2500 \text{ L} \cdot 10\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für Carotinoide mit unbekanntem Extinktionskoeffizient (Davies 1976). Das Absorptionsspektrum von *cis*-Fucoxanthin zeigt im Vergleich zu dem von Fucoxanthin eine leichte Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen hin. Auch für dieses Pigment lag kein Extinktionskoeffizient vor. Es wurde daher unter Verwendung des Fucoxanthin-Koeffizienten quantifiziert. Bei *cis*-Fucoxanthin handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Artefakt der Pigmentisolierung (Haugan

und Liaaen-Jensen 1992). Sein Anteil am Fucoxanthin-Gesamtgehalt betrug in der Regel etwa 1%. Deshalb wurde es im Ergebnisteil nicht gesondert aufgeführt, sondern zur Fucoxanthin-Konzentration addiert.

Da Chl c_1 und Chl c_2 im verwendeten HPLC-Trennsystem nicht ausreichend getrennt wurden, erfolgte ihre gemeinsame Quantifizierung durch Integration des Summenpeaks bei 440 nm. Bei dieser Wellenlänge unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten beider Pigmente nur um etwa 6% (berechnet aus den Online-Spektren unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten in Jeffrey 1972). Zur Quantifizierung wurde deshalb der Mittelwert beider Koeffizienten bei 440 nm verwendet. Für Chl c_3 liegen noch keine Daten zum Extinktionskoeffizienten vor, deshalb wurde der Mittelwert der Extinktionskoeffizienten der Soretbanden von Chl c_1 und Chl c_2 verwendet (Jeffrey et al. 1997). Außerdem waren in der Nachbarschaft des Chl a-Hauptpeaks stets weitere Peaks zu finden, die ein Chl a-identisches Online-Spektrum aufwiesen. Die Summe dieser Chl a-Derivate betrug relativ reproduzierbar 5% der Chl a-Menge, bei der Quantifizierung wurden sie zur Chl a-Konzentration hinzu addiert. Die genaue Identität dieser Derivate sowie die Frage, ob es sich bei ihnen um Extraktionsartefakte oder um native Pigmente handelt, wurden nicht weiter untersucht.

6.3 Isolierung und Charakterisierung der Xanthophyllzykluspigmente

6.3.1 Extraktion und Aufarbeitung der Pigmente aus *Phaeodactylum tricornutum*

Da die spektrometrischen Analysen der Pigmente des VAZ-Zyklus aus *P. tricornutum* die Isolierung einer ausreichenden Menge dieser Pigmente erforderte, wurden zunächst über einen Zeitraum von fünf Tagen jeweils nach der sechsstündigen Starklichtphase 140 mL Algensuspension auf Glasfaserfilter (GF6, 45 mm Durchmesser; SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) abgesaugt, tiefgefroren, gefriergetrocknet und zwischengelagert, wie schon in Kap. 6.1 beschrieben.

Zur Pigmentextraktion wurden die Filter grob vorzerkleinert, zusammen mit 3 Teelöffeln Glasperlengemisch und 15 mL Extraktionsmittel (siehe Kap. 6.2.1) in eine 50 mL-Duranglasflasche überführt und für 60 s unter Trockeneiskühlung mittels Zellhomogenisator mechanisch aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mL Diethylether und Auffüllen der Duranglasflasche mit 5 M NaCl-Lösung. Die nach Phasentrennung resultierende pigmenthaltige Etherphase wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein 20 mL-Schraubdeckelglas überführt, dreimal gegen destilliertes Wasser und zweimal gegen 5 M NaCl-Lösung gewaschen und anschließend im sanften N_2 -Gasstrom bis zur Trockne eingedampft.

Im nächsten Schritt erfolgte die Verseifung des Extraktes zwecks Entfernung von Lipiden sowie der Chlorophylle. Hierzu wurden die im Schraubdeckelglas befindlichen Pigmente in 1,8 mL Ethanol (96%) aufgenommen, mit 200 μ L einer wässrigen 80%igen KOH-Lösung versetzt, mit N_2 überschichtet und im gut verschlossenen Glas für 30 min bei 30 °C dunkel inkubiert. Anschließend wurde

nach Zugabe von 3 mL Ether erneut eine Phasentrennung bis zur Trockne des nunmehr verseiften Pigmentextraktes durchgeführt.

Die Isolierung und Aufreinigung der Einzelpigmente erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Carotinoide mittels HPLC getrennt, dann die einzelnen Pigmente über eine Kieselgelsäule weiter gereinigt. Die HPLC-Trennung wurde mit der in Kap. 6.2.2 beschriebenen Anlage und den dort genannten Trennparametern durchgeführt, wobei jeweils die Pigmentfraktionen aus vier bis sechs Läufen gesammelt und vereinigt wurden. Die vereinzelt Pigmente wurden aus dem Eluenten in Ether überführt und im N₂-Strom getrocknet.

Tab. 2.5 *Bei der Säulenchromatographie eingesetzter Elutionsgradient. Jeder Eluent wurde in Portionen von jeweils 2 mL mittels Pasteurpipette auf die Säule gegeben und unter Verwendung von N₂-Gas mit leichtem Überdruck durch das Säulenmaterial geleitet.*

Eluent	n-Hexan	Diethylether	Aceton	Volumen [mL]
A	50	50	0	8
B	20	80	0	8
C	0	100	0	8
D	0	50	50	8
E	0	0	100	8

Für die anschließende Säulenchromatographie wurde eine Normalphasenanordnung mit Kieselgel 60 (Partikelgröße 15-40 µm; MERCK) als stationärer Phase gewählt, die der Abtrennung von eventuell noch vorhandenen farblosen Verunreinigungen wie z.B. Sterolen dient. Zur Säulenpackung wurde eine Einwaage von 1,6 g Kieselgel 60 mit 8 mL n-Hexan/Diethylether (1:1) aufgeschwemmt, durch 20sekündiges Einstellen in ein Ultraschallbad (Transsonic T460; ELMA, Singen/Htw.) suspendiert und in eine Glassäule mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Länge von 100 mm eingefüllt. Durch Anlegen eines leichten Überdruckes auf die Säule mittels N₂-Gas wurde eine Komprimierung der stationären Phase erreicht. Um das Aufwirbeln des gepackten Kieselgels bei der Probenaufgabe zu verhindern, wurde das Packungsmaterial von oben mit einer etwa 4 mm hohen Glasperlschicht (Perlendurchmesser 0,25-0,3 mm) bedeckt. Anschließend wurde die Säule mit dem auch bei der anschließenden Pigmenttrennung verwendeten, in Tab. 2.5 aufgeführten Elutionsgradienten gespült, um etwaige noch an der stationären Phase befindliche Verunreinigungen zu eluieren. Nach der Spülung und der Rückführung des Gradienten in 2 mL-Schritten wurde die Säule mit 10 mL Eluent A äquilibriert.

Die Pigmentproben wurden zuerst in etwa 10 µL Ethanol gelöst, dann mit 60-70 µL n-Hexan/Diethylether im Mischungsverhältnis 60:40 versetzt und mittels einer 100 µL-Pipette (GILSON) vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Pigmentfraktion vollständig in die stationäre Phase eingesickert war, begann die Spülung mit dem Elutionsgradienten aus Tab. 2.5.

Abb. 2.6 gibt beispielhaft die Trennung eines Gesamtpigmentextraktes aus Spinat wieder. Abweichend vom in Tab. 2.5 aufgeführten Elutionsgradienten wurden hier nur 4 mL Eluent A eingesetzt.

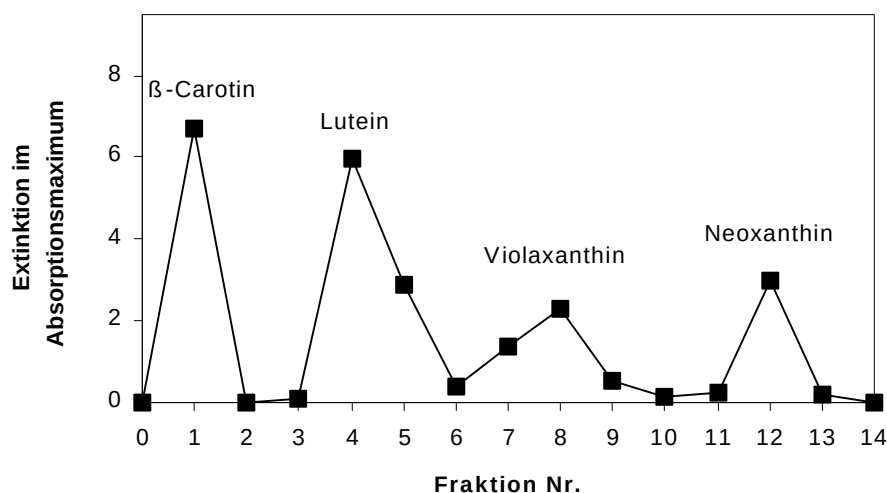


Abb 2.6 Säulenchromatographie eines Pigmentextraktes aus Spinat (*Spinacia oleracea*). Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 15-40 μm). Der verwendete Elutionsgradient entspricht dem in Tab. 2.5 aufgeführten Gradienten mit der Ausnahme, daß nur 4 mL Eluent A eingesetzt wurden. Die Identifizierung der einzelnen Pigmentfraktionen erfolgte anhand ihrer Absorptionsspektren und dem Nachweis von Epoxidgruppen durch Säurezugabe.

Bei der Aufreinigung der Einzelpigmente wurde grundsätzlich so verfahren, daß zunächst der Gradient aus Tab. 2.5 verwendet wurde, dann aber der Eluent, bei dem die jeweilige Pigmentbande durch die Säule zu wandern begann, bis zur Elution des Pigmentes beibehalten wurde. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit der zur Elution verwendeten Lösungsmittel konnte die so erhaltene Pigmentfraktion direkt im N_2 -Gasstrom getrocknet werden. Ein Aliquot jeder aufgereinigten Pigmentprobe wurde mittels HPLC untersucht, um zumindest die Verunreinigung mit weiteren Pigmenten oder mit bei der Isolierung entstandenen Derivaten ausschließen zu können. Die Aufbewahrung der getrockneten Pigmente bis zur weiteren Charakterisierung erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ unter N_2 -Atmosphäre.

6.3.2 Extraktion und Aufarbeitung der Referenzpigmente aus Spinat

Spinat (*Spinacia oleracea*, var. Matador) diente als Quelle zur Gewinnung der als authentisch anzusehenden Referenzpigmente Vx, Ax und Zx (Hager und Meyer-Bertenrath 1967, Partali et al. 1985). Der Spinat wurde als Hydroponic-Kultur auf einer Nährlösung nach Hoagland und Arnon (1938) angezogen, deren Zusammensetzung gemäß Robinson (1986) modifiziert war (Details in Richter 1989, Goss 1996). Die Pflanzen wurden bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ und einer PFD von $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ im 12 h Licht-/ 12 h Dunkel-Rhythmus kultiviert und waren zum Verwendungszeitpunkt 4-5 Wochen alt. Die Spinatanzucht wurde von Herrn R. Burgdorf (Universität Mainz) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Pigmentgewinnung dienten acht bis zehn Blätter, deren Stiele sofort nach der Ernte in wassergefüllte 2 mL-Eppendorfgefäße inseriert wurden. Anschließend wurden die Blätter in eine wasserdampfgesättigte, mit transparenter Folie verschlossene Kammer eingelegt und für 10 min mit einer PFD von $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Halogen-Metalldampf Lampe, Typ HQI-T 400 W / DV; OSRAM; Verminderung des Infrarotanteils durch 10 cm dicke Wasserschicht zwischen Lampe und Blattkammer) bestrahlt, um eine partielle Umwandlung von Vx in Ax und Zx zu induzieren (Yamamoto et al. 1962, Hager 1966). Danach wurden die Blätter sofort unter Entfernung der pigmentarmen Mittelrippen grob zerkleinert, in einen 250 mL-Rundkolben überführt und in flüssigem N₂ tiefgefroren. Mit Hilfe eines Spatels wurde das Blattmaterial im Rundkolben weiter zerkleinert, dann über Nacht gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Zur Pigmentextraktion wurde eine etwa zwei Blättern entsprechende Menge des Materials in einem Mörser mit 20 mL eisgekühltem, reinem Aceton, etwas Seesand und einer Spatelspitze Magnesiumhydroxidcarbonat-Pentahydrat gründlich zerrieben und die pigmenthaltige Acetonphase anschließend bei 5000×g und 0 °C (Varifuge RF, HERAEUS SEPATECH, Hanau) für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand (etwa 15 mL) wurde zusammen mit 10 mL Diethylether in einen 50 mL-Meßkolben überführt, mit 10 mL destilliertem Wasser und 10 mL einer 5 M NaCl-Lösung versetzt und ausgeschüttelt, um das Aceton aus der organischen Phase zu entfernen. Nach Verwerfen der wässrigen Phase wurden zwei weitere Phasentrennungen gegen je 20 mL der 5 M NaCl-Lösung durchgeführt. Schließlich wurde die Etherphase mittels Pipette abgezogen und im N₂-Strom bis zur Trockne eingedampft. Die anschließende Verseifung wurde wie in Kap. 6.3.1 beschrieben durchgeführt.

Auch die Isolierung und Aufreinigung von Ax und Vx erfolgte wie bereits in Kap. 6.3.1 beschrieben. Zx läßt sich mit den dort beschriebenen Chromatographiesystemen jedoch nicht vollständig von seinem Strukturisomeren Lutein abtrennen. Zx wurde deshalb zunächst mit Hilfe einer von Hager und Meyer-Bertenrath (1966, 1967) entwickelten Dünnschicht-Chromatographie isoliert. Hierzu wurden zwei Glasplatten von 20 x 20 cm Fläche mit einem Gemisch aus 29,5 g CaCO₃, 6 g MgO, 5 g Ca(OH)₂ und 60 mL KOH-Lösung (1,7% w/v) bestrichen (Schichtdicke 250 µm, Gemisch reicht für drei bis vier Platten) und anschließend für 1 Stunde bei 110 °C getrocknet. Nach Abkühlung der Platten auf Raumtemperatur wurde ein in Diethylether gelöster Pigmentextrakt aus Spinat als eine jeweils etwa 15 cm lange Bande auf die Platten aufgetragen, kurz mit einem Fön getrocknet und für 1 h in einem Laufmittelgemisch aus 50 mL Benzin (bei 100-120 °C siedend), 50 mL Aceton, 40 mL Chloroform und 1 mL Methanol entwickelt. Anschließend wurde die Zx-Bande sofort mittels einer Rasierklinge von den Platten abgeschabt und in einem 20 mL-Schraubdeckelglas mit 3 mL Aceton versetzt, wodurch die Pigmente von der Festphase gelöst wurden. Schließlich wurden die Pigmente in Ether überführt und getrocknet. Die so gewonnene Zx-Fraktion enthielt auch noch geringe Mengen an Neoxanthin, welches aber in der sich nun anschließenden Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (Kap. 6.3.1) quantitativ abgetrennt werden konnte.

6.3.3 Extraktion und Aufarbeitung der Referenzpigmente aus Papaya

Die Referenzpigmente β -Cryptoxanthin (Cx) und β -Cryptoxanthin-5,6-Epoxid (CxE) wurden aus handelsüblichen Früchten der Papaya (*Carica papaya*) isoliert, die relativ große Mengen dieser beiden Pigmente in Form von Estern akkumulieren (Khachik et al. 1991). Hierzu wurde zunächst das Fruchtfleisch von 1/8 Papaya in kleine Würfel geschnitten, sofort in flüssigem N₂ tiefgefroren und für 24 h gefriergetrocknet. Dann wurde das Material, wie bereits im vorigen Kapitel für den Spinat beschrieben, mittels Aceton extrahiert, der Pigmentextrakt in Ether ausgeschüttelt und nach Überführung in ein 20 mL-Schraubdeckelglas im N₂-Strom getrocknet. Die anschließende Verseifung sowie die Isolierung und Aufreinigung von Cx und CxE erfolgte nach den Angaben in Kap. 6.3.1.

6.3.4 Dünnschichtchromatographie

Als zweites chromatographisches System zur Charakterisierung der Xanthophyllzykluspigmente wurde neben der HPLC eine Dünnschichtchromatographie (DC) mit Kieselgel 60 als stationärer Phase auf Glasplatten von 20×20 cm Fläche (MERCK) verwendet. Zur Chromatographie wurden Gesamtpigmentextrakte aus *P. tricornutum* und *S. oleracea* in wenig Ethanol (20-50 μ L) gelöst, als etwa 1,5 cm lange Pigmentbanden auf die DC-Platte aufgetragen, mit einem Fön kurz getrocknet und dann für 20 bis 30 min in Diethylether mit einem Wasseranteil von 0,5% (v/v) entwickelt. Die Identifizierung der Pigmentbanden erfolgte mittels HPLC.

6.3.5 UV/VIS-Spektrometrie

Die Absorptionsspektren der reinen Pigmente wurden in 100% Ethanol an einem Zweistrahlphotometer (Modell U 2000, Spaltbreite 2 nm; HITACHI) aufgenommen. Über eine RS 232-Schnittstelle konnten die Extinktionswerte von 350 nm bis 700 nm bei einer Schrittweite von 0,5 nm direkt an einen PC übermittelt und in Microsoft-EXCEL weiterbearbeitet werden. Die Extinktion der untersuchten Pigmentproben betrug zwischen 0,1 und maximal 1. Vor der Ermittlung der Extinktionsmaxima und der III/II-Werte wurden alle Spektren unter Verwendung des Algorithmus von Savitzky und Golay (1964) einer 15-Punkt-Glättung unterzogen. Die Bestimmung der III/II-Werte erfolgte nach Liaaen-Jensen (1962), eine detaillierte Erläuterung hierzu findet sich z.B. bei Britton (1995). Zur Berechnung werden zunächst die Extinktionswerte des langwelligsten Maximums (P_{III}), des benachbarten Peaks (P_{II}) sowie des Minimums (M_{II}) zwischen beiden Peaks ermittelt. Der III/II-Wert berechnet sich dann als $(P_{III} - M_{II}) / (P_{II} - M_{II})$.

6.3.6 MALDI/TOF-Massenspektrometrie

Die Molekülmassenbestimmung der Pigmente erfolgte mittels *Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation/Time-Of-Flight*-Massenspektrometrie (MALDI/TOF-MS). Die Messungen wurden von Herrn Dr. Dietrich Haferburg am Institut für Biochemie der Universität Leipzig durchgeführt.

Die MALDI/TOF-MS zeichnet sich gegenüber der herkömmlichen MS mit Magnetsektor- oder Quadrupol-Detektoren durch ihre hohe Empfindlichkeit aus, die auch eine Analyse von sehr geringen

Substanzmengen (im pmol-Bereich) erlaubt. Ursache für diese Sensitivität ist das Flugzeit-(TOF-)Detektionsprinzip. Bei den sonst üblichen Detektionsverfahren werden die zuvor beschleunigten Ionen in einem Magnetfeld abgelenkt, wobei nur ein kleiner Anteil an Ionen bis zum Detektor gelangt, die anderen werden durch Blenden herausgefiltert. TOF-Detektoren messen die Flugzeit der zuvor beschleunigten Ionen auf einer definierten Strecke (je nach Detektor zwischen 1 und 2 m), was die Detektion praktisch aller ursprünglich erzeugten Ionen ermöglicht. Wichtige Voraussetzung für diese Art der Detektion ist, daß alle Probenmoleküle gleichzeitig ionisiert und beschleunigt werden, d.h. daß die Ionisation der Moleküle in einem möglichst engen Zeitfenster erfolgt. Dies wird bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation dadurch erreicht, daß die Probenmoleküle während sehr kurzer Laserpulse von etwa 10 ns ionisiert werden. Dabei führt das Laserlicht zunächst zur Anregung der im großen Überschuß vorliegenden Matrixsubstanz (in der Regel niedermolekulare aromatische Säuren), welche dann als Energieüberträger und zugleich als Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreservoir für die Probenmoleküle dient (Chapman 1993, Wingerath 1997).

Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an einer Voyager-DE Biospectrometry Workstation (PE-BIOSYSTEMS, Weiterstadt) durchgeführt. Als Matrixsubstanzen dienten 2-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure sowie 2,5-Dihydroxy-Benzoesäure; detektiert wurden die positiven Ionen.

III Ergebnisse und Diskussion

1. Untersuchung der Pigmente und der Xanthophyllzyklen von *Phaeodactylum tricornutum*

1.1 Charakterisierung des Wachstums der Turbidostatkulturen von *Phaeodactylum tricornutum* im kontinuierlichen Schwachlicht und unter Starklicht/Schwachlicht-Zyklen

Die Untersuchungen der Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* erfolgten an insgesamt vier Ansätzen, deren Kultivierungsdauer zwischen 3 und 11 Monaten betrug. Die Kulturen zeigten im kontinuierlichen Schwachlicht (LL; $40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) eine durchschnittliche Wachstumsrate μ von $0,71\cdot\text{d}^{-1}$ (Tab. 3.1), die anhand des Überlaufvolumens (Abb. 3.1) ermittelt wurde. Unter periodischem Wechsel von 6 h Starklicht (HL1 mit einer PFD von $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und 18 h Schwachlicht stieg die tägliche Wachstumsrate leicht an und betrug im Mittel $0,84\cdot\text{d}^{-1}$ (Tab. 3.1). Dabei war tendenziell eine Erhöhung der Wachstumsraten mit zunehmender Kultivierungsdauer zu verzeichnen. Jedoch wies die Wachstumsrate auch von Ansatz zu Ansatz Schwankungen in der gleichen Größenordnung von etwa 10% auf (Tab. 3.1). Für die weiteren Untersuchungen war allein eine ausreichend hohe Wachstumsrate erforderlich, die in allen Fällen vorlag.

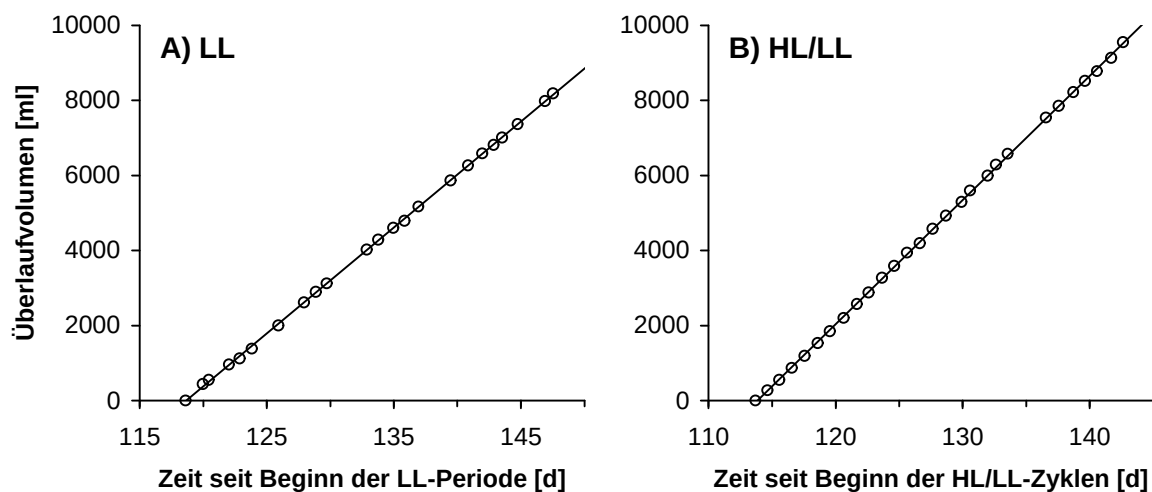


Abb. 3.1 Wachstumsraten einer Turbidostatkultur von *P. tricornutum*. Dargestellt ist die Zunahme des Überlaufvolumens pro Zeit (A) im kontinuierlichen LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und (B) unter einem Belichtungsrythmus von 6 h HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und 18 h LL. Die Daten stammen aus Kulturansatz 3 (vgl. Tab. 3.1).

Tab. 3.1 *Tägliche Wachstumsrate μ von Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* im kontinuierlichen LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und unter periodischem Belichtungswechsel von 6 h HL ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und 18 h LL. Angegeben ist neben dem jeweiligen Kulturansatz auch der für die Berechnung der Wachstumsrate berücksichtigte Zeitraum. Std.abw. = Standardabweichung.*

LL-Inkubation			HL/LL-Zyklen		
Ansatz Nr.	Tage im LL	$\mu [\text{d}^{-1}]$	Ansatz Nr.	Tage in Zyklen	$\mu [\text{d}^{-1}]$
1	33.-40.	0,728	1	5.-21.	0,771
2	29.-48.	0,661	4	17.-37.	0,837
3	55.-69.	0,693	3	68.-77.	0,867
3	70.-116.	0,700	3	94.-102	0,823
3	119.-148.	0,763	3	114.-143.	0,895
Mittelwert $\pm$ Std.abw.		0,71 $\pm$ 0,04	Mittelwert $\pm$ Std.abw.		0,84 $\pm$ 0,05

Eine erste Charakterisierung der Pigmententwicklung während der Starklichtphase erfolgte durch Aufnahme von *in-vivo*-Absorptionsspektren der Algensuspension. Wie die Spektren in Abb. 3.2.A zeigen, tritt während der 6 h Starklicht nur im blauen Spektralbereich zwischen 400 und 530 nm eine Extinktionszunahme auf. Im roten Spektralbereich, in dem allein die Chlorophylle für die Absorption verantwortlich sind, ist praktisch keine Änderung zu beobachten. Dieser Befund weist bereits darauf hin, daß im HL nur die Konzentration an Carotinoiden zunimmt, die der Chlorophylle dagegen stagniert. Noch klarer illustriert wird dies durch die in Abb. 3.2.B dargestellten Differenzspektren, die im Bereich zwischen 400 und 500 nm den für Carotinoide charakteristischen dreigipfligen Verlauf zeigen, während im Bereich der Rotabsorption von Chl a bei 680 nm nur eine minimale Extinktionszunahme zu beobachten ist.

Dennoch zeigen die Zellen während der Starklichtphase eine unverändert hohe Teilungsaktivität (Abb. 3.3). Als Folge der nahezu gleichbleibenden Teilungsrate bei stagnierender Chlorophyllkonzentration wird im Starklicht das Chlorophyll in den Zellen "ausgedünnt". In der anschließenden Schwachlichtphase zeigen die Zellen weiterhin hohe Teilungsaktivität, zugleich steigt nun aber die Chlorophyllkonzentration überproportional an (Abb. 3.3). Dies bedeutet, daß der Chlorophyllgehalt pro Zelle wieder zunimmt. Auf die parallele Entwicklung der Carotinoide wird an späterer Stelle ausführlich eingegangen (Kap. 1.7 der Ergebnisse).

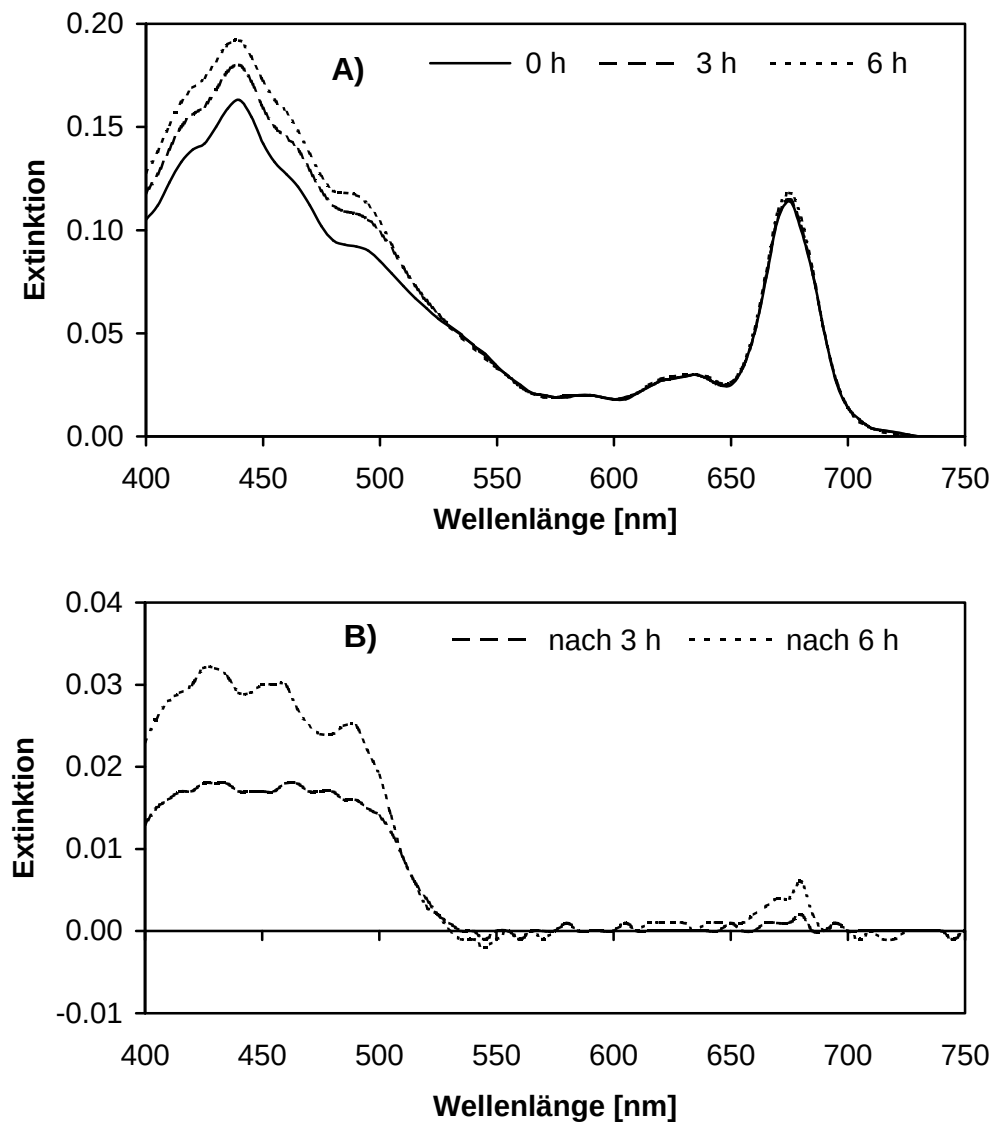


Abb. 3.2 *Pigmententwicklung einer Turbidostatkultur von P. tricornutum während 6 h Inkubation mit HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dargestellt sind (A) die in-vivo-Spektren und (B) die Extinktionsänderungen nach 3 bzw. 6 h Starklicht anhand von Differenzspektren aus (A).*

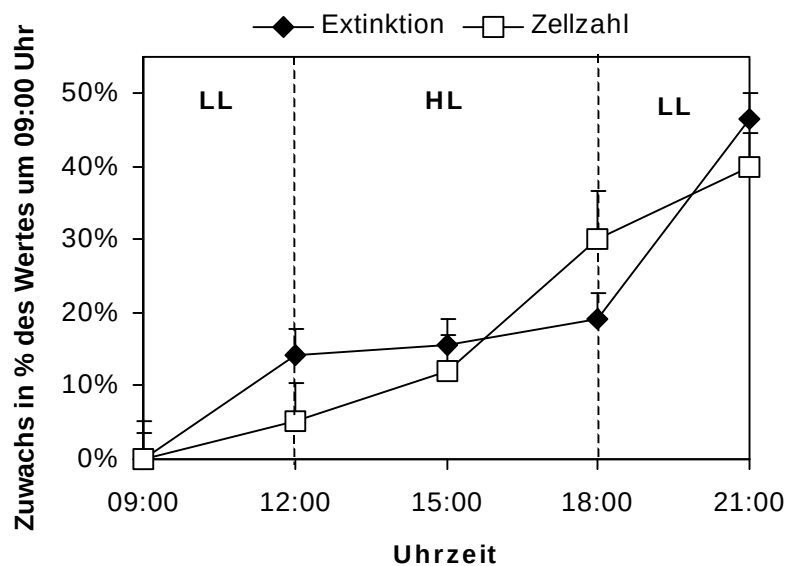


Abb. 3.3 Vergleich der Entwicklung von Zellzahl und Pigmenten einer Turbidostatkultur von *P. tricornutum* unter 6 h HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Dargestellt sind die prozentualen Zuwächse der Zellzahl und der in-vivo-Extinktion von Chl a (Rotmaximum bei 675 nm) einer Kultur während des 11. HL/LL-Belichtungszyklus, bezogen auf die Ausgangswerte um 9:00 Uhr am Versuchstag. Die Fehlerbalken geben im Fall der Zellzahlen das 95%-Vertrauensintervall an (t-Test, $n=8$ pro Uhrzeit), für die Extinktionswerte wurde der maximale Meßfehler auf ± 0.003 geschätzt.

1.2 Auftreten von bisher nicht in Diatomeen gefundenen Carotinoiden in einer Turbidostatkultur von *Phaeodactylum tricornutum* nach 6 h Starklicht

Ein detaillierteres Bild der Pigmententwicklung von *P. tricornutum* während der Starklichtinkubation ließ sich mittels Pigmentanalysen gewinnen. Eine HPLC-Analyse der Algen vor Beginn der Starklichtphase zeigte das für Diatomeen typische Pigmentmuster (Abb. 3.4): *P. tricornutum* besitzt neben Chl a die beiden Chlorophyllide Chl c_1 und Chl c_2 (unter den hier verwendeten Chromatographiebedingungen werden diese beiden Pigmente nicht getrennt), das dominierende Carotinoid ist Fucoxanthin (Fx). Weiterhin sind das Xanthophyllzykluspigment Ddx sowie β -Carotin anzutreffen. Bei Inkubation der Algen mit Starklicht wurde innerhalb kurzer Zeit ein beträchtlicher Teil des Ddx zu Dtx deepoxidiert (Abb. 3.4.A), welches im vorherigen Schwachlicht praktisch nicht vorhanden war. Nach 6 h Starklicht war der größte Teil des Ddx (Peak Nr. 4) in Dtx (Peak Nr. 6) umgewandelt worden (Abb. 3.4.B). Die Chl a-Konzentration blieb – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der in-vivo-Spektren (Abb. 3.2) – während der Starklichtphase praktisch konstant. Auch der Anteil an Phaeophytin a betrug zu jeder Zeit konstant 0,5% des Chl a-Gehaltes (daher werden im folgenden keine weiteren Angaben mehr zum Phaeophytin a-Gehalt gemacht). Jedoch wies das Chromatogramm

mehrere Pigmentpeaks auf, die vor der Starklichtinkubation noch nicht detektiert worden waren; dabei fiel besonders Peak Nr. 7 auf.

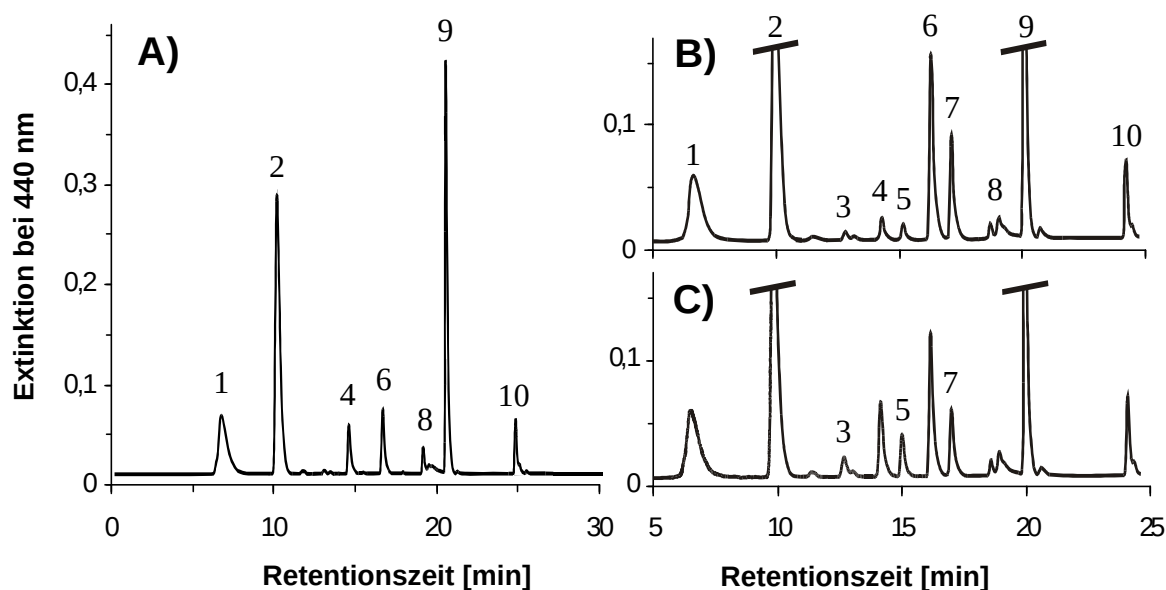


Abb. 3.4 *HPLC-Analyse von P. tricornutum unter periodischem Starklichtstreß. Pigmentextrakt von Zellen (A) nach 10 min Belichtung mit HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (B) nach 6 h Belichtung mit HL1 und (C) nach 6 h HL1, gefolgt von 10 min LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Peak Nr. 1 = Chl c_1 + Chl c_2 , 2 = Fx, 4 = Ddx, 6 = Dtx, 8 = Chl a -Derivate (2 Peaks), 9 = Chl a , 10 = b -Carotin; die Identität der Peaks Nr. 3, 5 und 7 wurde im folgenden eingehend untersucht.*

Wie Abb. 3.4.C zeigt, fand nach der Starklichtphase im anschließenden Schwachlicht rasch die Rückwandlung von Dtx in Ddx statt. Auffälligerweise nahm aber auch Peak Nr. 7 ab, und dies bei gleichzeitiger Zunahme der Peaks Nr. 3 und 5. Diese Beobachtung legte den Verdacht nahe, daß es sich bei den neu auftretenden Pigmenten um die Xanthophylle des VAZ-Zyklus handeln könnte. Deshalb wurden diese Pigmente im folgenden eingehend charakterisiert.

1.3 Identifikation der neu beobachteten Carotinoide als Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violaxanthin

Das chromatographische Verhalten und die spektralen Kenndaten der Carotinoide, die in *P. tricornutum* nach 6 h Starklicht detektiert wurden, sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Ein Vergleich der drei neu auftretenden Pigmente (Peaks Nr. 3, 5 und 7 in Abb. 3.4) mit den Xanthophyllen Vx, Ax und Zx aus Spinat (*Spinacia oleracea*) ergab identische Retentionszeiten und Online-Spektren. Wurden die Pigmentextrakte zunächst einer Verseifung unterzogen und dann mit HCl behandelt, so zeigten die Online-Spektren von Vx aus Spinat und Pigment Nr. 3 aus *P. tricornutum* eine hipsochrome Verschiebung aller Absorptionsmaxima um etwa 40 nm, die Spektren von Ax und Pigment Nr. 5 aus *P. tricornutum* eine entsprechende Verschiebung um lediglich 20 nm (Tab. 3.2, siehe auch Abb. 2.4).

Die Spektren von Zx und Pigment Nr. 7 aus *P. tricornutum* blieben unverändert. Da bei einem Epoxy-Xanthophyll die Umlagerung der 5,6-Epoxidgruppe zum 5,8-Furanoid in einer hipsochromen Verschiebung um 20 nm resultiert (Eugster 1995), läßt sich aus den vorliegenden Daten auf die Anwesenheit von zwei 5,6-Epoxidgruppen in Pigment Nr. 3 bzw. einer Epoxidgruppe in Pigment Nr. 5 schließen. Ferner ist festzuhalten, daß sich die neu detektierten Pigmente Nr. 5 und Nr. 7 sowohl in ihren Retentionszeiten als auch den spektralen Eigenschaften von Ddx und Dtx klar unterscheiden.

Tab. 3.2 *Retentionszeiten und Charakteristika der Online-Spektren der in P. tricornutum nach 6 h Starklicht gefundenen Carotinoide. Die Referenzpigmente Vx, Ax und Zx aus Spinat (Spinacia oleracea) waren nicht von den Pigmenten Nr. 3, 5 und 7 aus P. tricornutum zu unterscheiden. Rt_{S2} = Retentionszeit auf Säule 2.*

Pigment	Rt _{S2} ^a [min]	Absorptionsmaxima [nm]			III/II- ^b Wert
Fx	9,9	-	449	-	-
Nr. 3 (Vx)	12,0	418	442	472	0,98
nach HCl	12,8	382	403	428	1,03
Ddx	13,4	-	449	479	0,73
nach HCl	13,6	-	432	459	0,77
Nr. 5 (Ax)	14,2	-	449	476	0,64
nach HCl	14,4	-	430	456	0,61
Dtx	15,3	-	455	484	0,43
nach HCl	"	-	"	"	"
Nr. 7 (Zx)	16,1	-	455	482	0,31
nach HCl	"	-	"	"	"
β-Carotin	24,6	-	456	483	0,27
nach HCl	"	-	"	"	"

^a Siehe auch Material und Methoden, Tab. 2.3

^b Zur Definition des III/II-Wertes siehe Material und Methoden, Kap. 6.3.5

Schiedt und Liaaen-Jensen (1995) fordern für die eindeutige Identifizierung eines Carotinoids mit Hilfe eines Referenzpigmentes die Erfüllung der folgenden Mindestkriterien: den Nachweis gleicher chromatographischer Eigenschaften beider Pigmente in zwei verschiedenen Trennsystemen, identische UV/VIS-Spektren in zwei verschiedenen Lösungsmitteln sowie die massenspektrometrische Bestimmung der Molekülmasse. Um die Identität der drei neu beobachteten Pigmente entsprechend dieser Kriterien abzusichern, wurden sie aus *P. tricornutum* isoliert und mit den zuvor aus Spinat gewonnenen Referenzpigmenten in einem zweiten Chromatographiesystem (Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel) und einem zweiten Lösungsmittel (100% Ethanol) verglichen sowie einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die normalerweise in Diatomeen vorkommenden Xanthophyll-

zykluspigmente Ddx und Dtx wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 zusammengefaßt.

Tab. 3.3 *R_f-Werte, Charakteristika der Absorptionsspektren und massenspektrometrische Daten der aus P. tricornutum isolierten Xanthophyllzykluspigmente. Die Daten der aus Spinat gewonnenen Referenzpigmente Vx, Ax und Zx sind nur angegeben (kursiv), sofern sie von denen der entsprechenden Pigmente aus P. tricornutum abweichen. DC = Dünnschicht-Chromatographie, EtOH = Ethanol (100%), MS = MALDI/TOF-Massenspektrometrie.*

Pigment	Rf (DC)	Absorptionsmaxima [nm]				III/II- Wert	Theor. M _r	Hauptpeak (MS)	Ionen- spezies
		I	II	III					
Nr. 3 (Vx)	0,52	EtOH:	418 (417)	441	471	0,93 (0,97)	600,4	599,4 (599,3)	[M-1] ⁺
		EtOH+HCl:	381	402	427	0,96 (0,97)			
Ddx	0,60	EtOH:	426	447	477	0,70	582,4	581,5	[M-1] ⁺
		EtOH+HCl:	409	430	458	0,68			
Nr. 5 (Ax)	0,64	EtOH:	425	446	475 (474)	0,60 (0,50)	584,4	583,6 (583,5)	[M-1] ⁺
		EtOH+HCl:	407 (405)	427 (426)	453 (452)	0,41 (0,40)			
Dtx	0,72	EtOH:	-	453	481	0,41	566,4	566,5	[M] ⁺
		EtOH+HCl:	-	451	478	0,21			
Nr. 7 (Zx)	0,75	EtOH:	-	451	479	0,28 (0,33)	568,4	568,4	[M] ⁺
		EtOH+HCl:	-	450 (449)	475 (474)	0,11 (0,05)			

Auch in diesen Messungen zeigten die neu beobachteten Carotinoide beim Vergleich mit den Referenzpigmenten aus Spinat praktisch identische Eigenschaften. Bei näherer Betrachtung der massenspektrometrischen Daten fällt auf, daß im Falle der epoxidhaltigen Xanthophylle der Hauptpeak von der Ionenspezies [M-1]⁺ gebildet wird, ansonsten dominiert [M]⁺. MALDI/TOF-MS ist in der Carotinoidanalytik bisher nur vereinzelt eingesetzt worden. Kaufmann et al. (1996) beobachteten bei der MALDI/TOF-Analyse verschiedener Carotinoide generell Dominanz der [M]⁺-Spezies, während Wingerath (1997) für Carotinoide mit Sauerstofffunktionen eine Zunahme an [M+1]⁺-Ionen verzeichnete. Da die dominante Ionenspezies offensichtlich in Abhängigkeit von den jeweiligen Ionisationsbedingungen variieren kann, wurden zur Absicherung der Pigmentidentifikation die Molekülmassen der Referenzpigmente aus Spinat sowie von Ddx und Dtx ebenfalls ermittelt.

Zusammenfassend waren sowohl Ddx von Ax als auch Dtx von Zx chromatographisch, spektral und den Molekülmassen nach sicher zu unterscheiden, während die Pigmente Nr. 3, 5 und 7 aus *P. tricornutum* mit den jeweiligen Referenzpigmenten identische Eigenschaften aufwiesen. Damit sind

die von Schiedt und Liaaen-Jensen (1995) vorgeschlagenen Mindestkriterien für die eindeutige Identifizierung unbekannter Carotinoide für die Pigmente Nr. 3, 5 und 7 aus *P. tricornutum* erfüllt: Es handelt sich um Vx, Ax und Zx.

1.4 Akkumulation auch von β -Cryptoxanthin, β -Cryptoxanthin-Epoxid und einem β -Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll im Starklicht

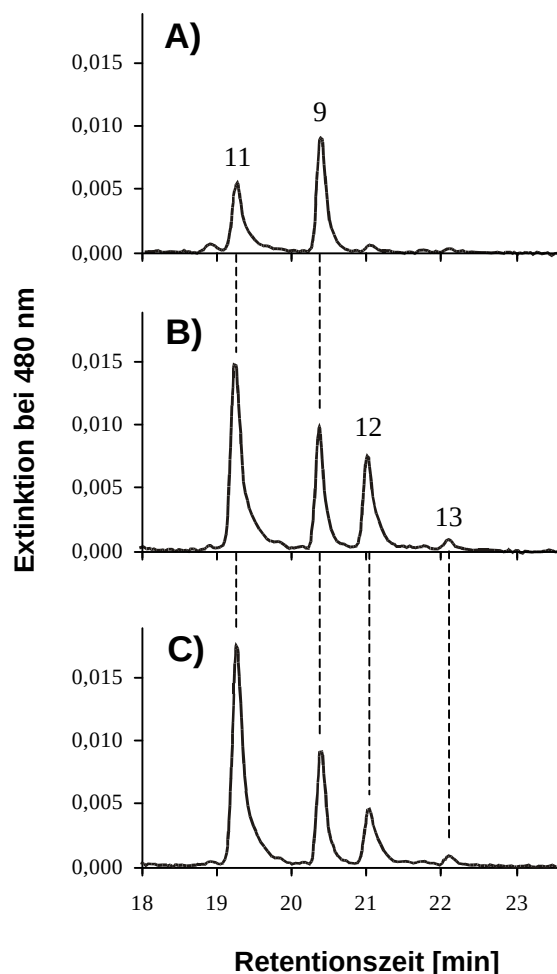


Abb. 3.5 *HPLC-Analyse von *P. tricornutum* unter periodischem Starklichtstreß. Der Abbildung liegt derselbe Datensatz zugrunde wie Abb. 3.4. Dargestellt ist hier das Detektorsignal bei 480 nm. Pigmentextrakt von Zellen (A) nach 10 min Belichtung mit HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), (B) nach 6 h Belichtung mit HL1 und (C) nach 6 h HL1, gefolgt von 10 min LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Peak Nr. 9 = Chl *a*; die Identität der Peaks Nr. 11, 12 und 13 wurde im folgenden genauer untersucht.*

Eine detaillierte Auswertung der HPLC-Chromatogramme ergab, daß *P. tricornutum* im Starklicht noch weitere Carotinoide akkumuliert, wenn auch nur in sehr geringen Mengen im Vergleich zu den Pigmenten des VAZ-Zyklus. Die Detektion dieser Pigmente bei 440 nm wird durch Überlagerung von

Chl a-Derivaten erschwert (vgl. Abb. 3.4). Dieses Problem kann aber durch eine Auswertung der Extinktion bei 480 nm umgangen werden, da Chl a bei dieser Wellenlänge nur sehr schwach absorbiert. Abb. 3.5 zeigt entsprechende Chromatogramme bei 480 nm. Es ist zu erkennen, daß nach 6 h Starklicht ein zuvor im Schwachlicht schon vorhandenes Pigment (Abb. 3.5.A, Peak Nr. 11) deutlich zugenommen hat und ein weiteres Pigment neu akkumuliert wird (Abb. 3.5.B, Peak Nr. 12). Außerdem sind sehr geringe Mengen eines dritten Carotinoids (Peak Nr. 13) detektierbar.

Während der anschließenden Schwachlichtphase nimmt Peak Nr. 12 ab, während gleichzeitig Peak Nr. 11 höher wird. Auch in diesem Fall könnte also das dem Retentionsverhalten nach hydrophilere Pigment Nr. 11 ein Epoxidierungsprodukt des Pigmentes Nr. 12 darstellen. Das Online-Spektrum von Peak Nr. 11 (Tab. 3.4) zeigt große Ähnlichkeit zum Spektrum des Mono-Epoxides Ax (Tab. 3.2), gleiches gilt für die Spektren von Peak Nr. 12 und der nicht epoxidierten Pigmente Zx bzw. β -Carotin. Die Retentionszeit von Peak Nr. 12 liegt nahezu mittig zwischen den Zeiten von Zx und β -Carotin. Zx besitzt an beiden Jononringen je eine Hydroxylgruppe in C3-Stellung, β -Carotin ist ein reiner Kohlenwasserstoff. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Pigment Nr. 12 um das Monohydroxy-Derivat von β -Carotin handeln könnte, also um β -Cryptoxanthin (Cx, Abb. 3.6). Pigment Nr. 11 könnte das entsprechende Epoxidierungsprodukt darstellen, nämlich β -Cryptoxanthin-Epoxid (CxE).

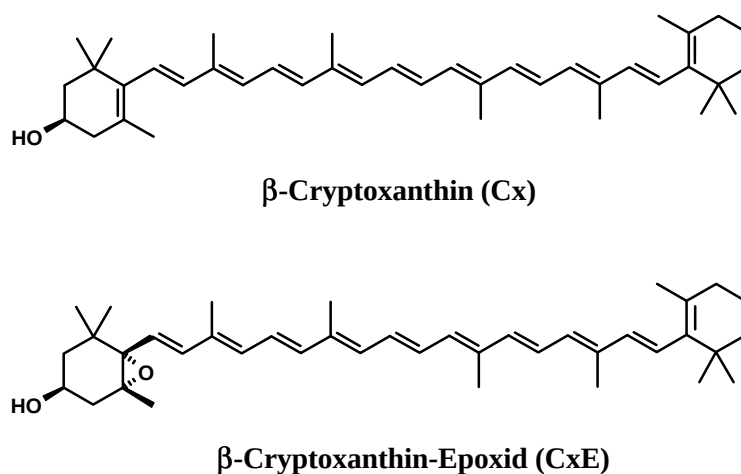


Abb. 3.6 **Strukturformeln von β -Cryptoxanthin (β , β -Carotin-3-ol) und β -Cryptoxanthin-Epoxid (5,6-Epoxy-5,6-dihydro- β , β -Carotin-3-ol).**

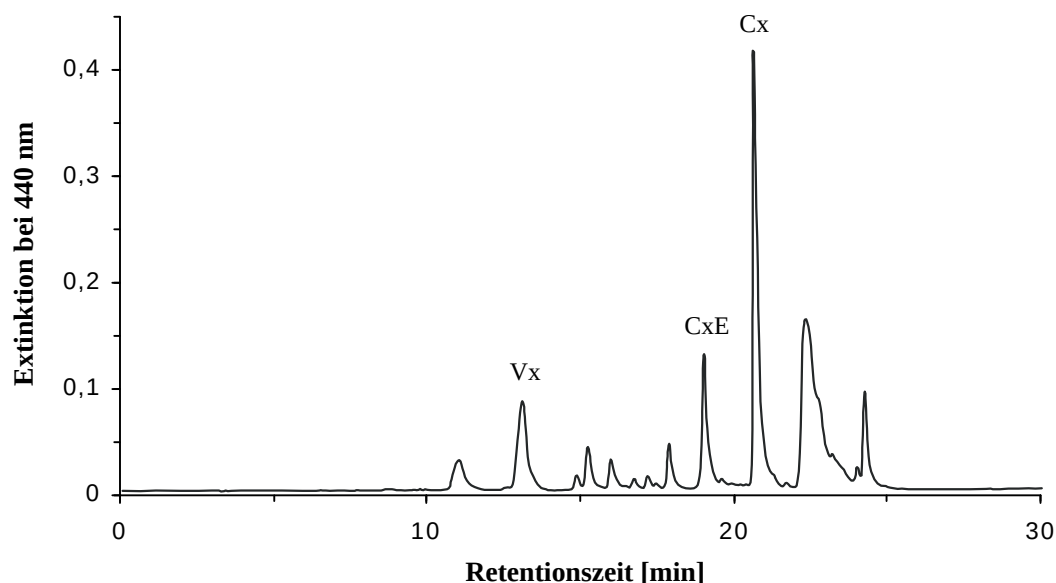


Abb. 3.7 HPLC-Analyse eines Pigmentextraktes aus Früchten der Papaya (*Carica papaya*) nach Verseifung. Cx = *b*-Cryptoxanthin, CxE = *b*-Cryptoxanthin-Epoxid, Vx = Violaxanthin.

Um die vermutete Identität dieser beiden Pigmente abzusichern, wurden zunächst die Referenzpigmente Cx und CxE aus Früchten der Papaya (*Carica papaya*) gewonnen (Khachik et al. 1991). Ein Pigmentextrakt aus Papaya wies nach Verseifung zwei ausgeprägte Peaks auf (Abb. 3.7), deren Retentionszeiten und Online-Spektren von denen der Pigmente Nr. 11 und 12 aus *P. tricornutum* nicht zu unterscheiden waren. Der Säuretest auf Anwesenheit von 5,6-Epoxidgruppen bestätigte das Vorhandensein einer solchen Gruppe in CxE aus Papaya und in Pigment Nr. 11 aus *P. tricornutum*. Papaya-Cx und Pigment Nr. 12 aus der Diatomee zeigten in Einklang mit der hypothetischen Identifikation keine Veränderung ihrer Absorptionseigenschaften (Tab. 3.4). Weiterhin wurde Pigment Nr. 11 aus *P. tricornutum* isoliert und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Wie Tab. 3.4 zeigt, wies die dominierende Ionenspezies eine Molekülmasse auf, die im Falle ihrer Identität mit CxE dem $[M-1]^+$ -Ion entsprechen würde. Diese Interpretation ist im Einklang mit der schon für die Epoxide Vx, Ax und Ddx beobachteten Dominanz des $[M-1]^+$ -Ions (Tab. 3.3).

Das Absorptionsspektrum von Pigment Nr. 13 ist mit dem von CxE praktisch identisch, und nach Säureeinwirkung zeigte es ebenfalls die für eine Furanoidumlagerung typische Absorptionsverschiebung (Tab. 3.4). Seine Retentionszeit legt das Vorhandensein von nur einer Sauerstofffunktion nahe, und seine Alkalistabilität spricht gegen einen Xanthophyllester. Deshalb handelt es sich bei Pigment Nr. 13 sehr wahrscheinlich um β -Carotin-Epoxid. Da jedoch die für eine zweifelsfreie Identifikation erforderlichen Kriterien nicht erfüllt sind und kein Referenzpigment vorlag, wird dieses Xanthophyll gemäß der von Schiedt und Liaaen-Jensen (1995) vorgeschlagenen Nomenklatur im folgenden als „ β -Carotin-Epoxid-ähnlich“ bezeichnet.

Tab. 3.4 *Retentionszeiten und Charakteristika der Online-Spektren der in P. tricornutum nach 6 h Starklicht lediglich in geringen Mengen gefundenen Carotinoide. Die Referenzpigmente CxE und Cx aus Früchten der Papaya (Carica papaya) waren nicht von den entsprechenden Pigmenten aus P. tricornutum zu unterscheiden. CxE aus P. tricornutum wurde außerdem isoliert und massenspektrometrisch untersucht. CarE-like = b-Carotin-Epoxid-ähnlich. Rt_{S2} = Retentionszeit auf Säule 2.*

Pigment	Rt _{S2} [min]	Absorptionsmaxima [nm]			III/II- Wert	Theor. M _r	Hauptpeak (MALDI)	Ionen- spezies
Nr. 11 (CxE)	19,0	-	449	476	0,58	568,4	567,4	[M-1] ⁺
nach HCl	19,2	-	430	455	0,50			
Nr. 12 (Cx)	20,5	-	455	481	0,27			
nach HCl	"	-	"	"	"			
Nr. 13 (CarE-like)	22,4	-	448	476	0,60			
nach HCl	22,5	-	430	456	0,54			

1.5 Der Viola-/Anthera-/Zeaxanthin-Zyklus und ein β-Cryptoxanthin-Epoxid/β-Cryptoxanthin-Zyklus als zwei weitere Xanthophyllzyklen neben dem Diadino-/Diatoxanthin-Zyklus in *Phaeodactylum tricornutum*

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob die in *P. tricornutum* nach 6 h Starklicht neu beobachteten Pigmente Vx, Ax und Zx sowie CxE und Cx tatsächlich an den Xanthophyllzyklusreaktionen teilnehmen. Hierzu wurden die Algen direkt nach der Starklichtphase zweimal mit je 20 min Schwachlicht, gefolgt von 10 min Starklicht inkubiert. Vor jedem Wechsel der Lichtintensität wurde eine Algenprobe für die HPLC-Analyse genommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 dargestellt. Die Xanthophylle wurden hier in drei Pools zusammengefaßt, den DT-Pool mit den Pigmenten Ddx und Dtx (Abb. 3.8.A), den VAZ-Pool mit Vx, Ax und Zx (Abb. 3.8.B), und den CE-Pool mit CxE und Cx (Abb. 3.8.C). Alle Pigmentmengen sind auf Chl a bezogen, da die Chl a-Konzentration der Algensuspension über die einstündige Versuchsdauer hinweg praktisch konstant blieb.

Am Ende der sechsstündigen Starklichtperiode dominieren im DT- und im VAZ-Pool erwartungsgemäß die deepoxidierten Pigmente Dtx bzw. Zx, während im CE-Pool das epoxidierte CxE im leichten Überschuß vorliegt. Nach der ersten 20minütigen Schwachlichtphase (1. LL) haben in allen drei Pools die epoxidierten Pigmente zugenommen. Die Zunahme an CxE fällt aufgrund des bereits im Starklicht vorhandenen relativ hohen Anteils dieses Pigmentes nicht so deutlich aus wie die der anderen Epoxy-Xanthophylle. Bei Betrachtung der prozentualen Abnahme der deepoxidierten Formen während dieser Schwachlichtphase (Abb. 3.8.D) zeigen sich aber für alle drei Pools vergleichbare Werte, die zwischen 40 und 60% liegen.

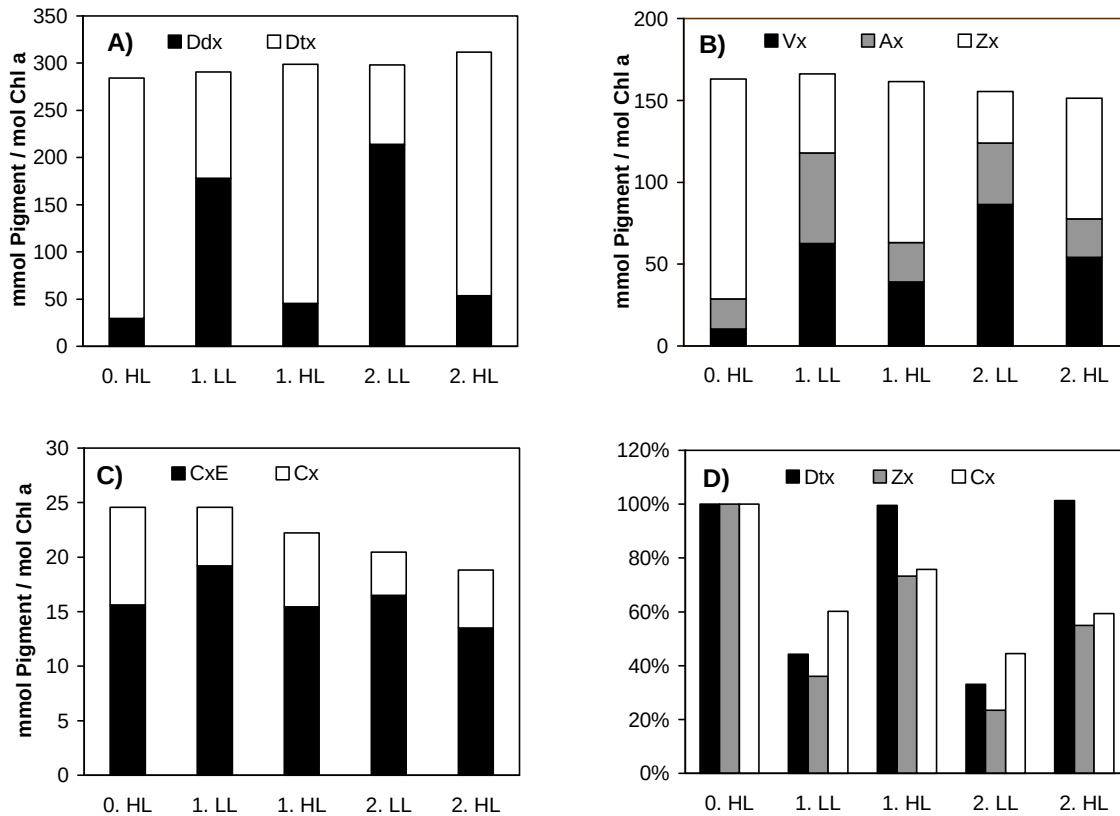


Abb. 3.8 *Pigmentumwandlungen innerhalb der drei in *P. tricornutum* beobachteten Xanthophyllzyklus-Pools unter wiederholtem Wechsel zwischen HL1 (700 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und LL (40 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dargestellt sind die Änderungen des DT-Pools (A), des VAZ-Pools (B) und des CE-Pools (C) sowie die prozentuale Änderung der deepoxidierten Xanthophylle in jedem der drei Pools während der Lichtintensitätswechsel (D). Weitere Erläuterungen im Text.*

In der anschließenden ersten zehnminütigen Starklichtphase (1. HL) findet lediglich im DT-Pool eine praktisch vollständige Rückwandlung von Ddx zu Dtx statt, Zx und Cx erreichen nur knapp 80% des Ausgangsniveaus. Dennoch ist in allen drei Pools eine erneute Zunahme der deepoxidierten Pigmentformen auf Kosten der epoxidhaltigen Pigmente erkennbar. Auch bei einem weiteren Wechsel von Schwachlicht und Starklicht (2. LL, 2. HL) wiederholt sich dieser Zyklus in allen drei Pools. Sowohl der VAZ- als auch der CE-Pool zeigen dabei über die Zeit eine Abnahme, während der DT-Pool zunimmt. Dies deutet zumindest im Fall des VAZ-Pools bereits auf eine mögliche Umwandlung in Richtung DT-Pool hin. Das Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt und lieferte sehr gut reproduzierbare Ergebnisse. Somit kann gefolgert werden, daß die untersuchten Pigmente tatsächlich drei Pools bilden, innerhalb derer lichtintensitätsabhängig eine rasche Umwandlung der Pigmente ineinander erfolgen kann. Man kann somit von drei parallel ablaufenden Xanthophyllzyklen in *P. tricornutum* sprechen.

1.6 Ursachen für die Akkumulation der neuen Xanthophyllzyklus-Pools im Starklicht

Da die Akkumulation des VAZ-Pools und des CE-Pools nur unter längerer Starklichtinkubation erfolgte und dabei bevorzugt die deepoxidierten Xanthophyllspezies angereichert wurden, sollte im folgenden die Rolle der Xanthophyllzyklus-Deepoxidase bei der Akkumulation näher untersucht werden. Zudem stellte sich die Frage, ob die Pigmente des VAZ-Zyklus aus den bereits im Schwachlicht vorhandenen Pigmenten Ddx und Fx gebildet werden können oder ob für ihre Akkumulation eine *de-novo*-Synthese von Carotinoiden erforderlich ist.

1.6.1 Einfluß der Lichtintensität auf die Akkumulation

Um den Einfluß der Deepoxidase auf die Zunahme der drei Xanthophyllzyklus-Pools zu klären, wurde zunächst die Aktivität der Deepoxidase in den Algenzellen durch die Wahl verschiedener Lichtintensitäten moduliert. Die Änderungen der einzelnen Xanthophyllzykluspigmente nach sechsstündiger Inkubation bei fünf verschiedenen Intensitäten sind in Tab. 3.5 zusammengefaßt.

Tab. 3.5 Änderungen des Gehaltes an den drei Xanthophyllzyklus-Pools in einer *P. tricornutum*-Kultur in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Der Deepoxidierungsstatus (DPS) des DT- und des CE-Pools entspricht dem Anteil der deepoxidierten Spezies Dtx bzw. Cx am jeweiligen Pool. Als DPS des VAZ-Pools ist der Quotient $(Vx+0,5 \cdot Ax) / (Vx+Ax+Zx)$ angegeben.

Pigment [$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]	Vor HL	6 h bei 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	6 h bei 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	6 h bei 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	6 h bei 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
Ddx	0,211	0,103	0,049	0,042	0,035
Dtx	0,008	0,414	0,321	0,286	0,277
DT-Pool	0,219	0,518	0,370	0,328	0,312
DPS _{DT-Pool}	0,04	0,80	0,87	0,87	0,89
Vx	0,014	0,025	0,023	0,018	0,012
Ax	0,003	0,020	0,027	0,025	0,025
Zx	0,002	0,092	0,185	0,204	0,248
VAZ-Pool	0,019	0,137	0,234	0,248	0,285
DPS _{VAZ-Pool}	0,18	0,75	0,85	0,88	0,91
CxE	0,011	0,017	0,019	0,021	0,025
Cx	0	0,005	0,011	0,014	0,017
CE-Pool	0,011	0,022	0,030	0,034	0,041
DPS _{CE-Pool}	0	0,23	0,36	0,40	0,40
DT+VAZ+CE	0,249	0,677	0,634	0,610	0,638

Abb. 3.9 illustriert die absoluten Veränderungen des VAZ-Pools und des DT-Pools. Die Summe beider Pools am Ende der jeweiligen Starklichtphase wird durch die Lichtintensität praktisch nicht beeinflusst (vgl. Tab. 3.5), sie beträgt etwa das Zweieinhalbfache der Ausgangsmenge.

Eine höhere PFD führt jedoch zu einer stärkeren Zunahme des VAZ-Pools auf Kosten der Zunahme des DT-Pools. Die Verteilung der neu gebildeten Xanthophyll verschiebt sich demnach vom DT-Pool zum VAZ-Pool, wodurch im Extremfall beide Pools annähernd gleich groß werden können.

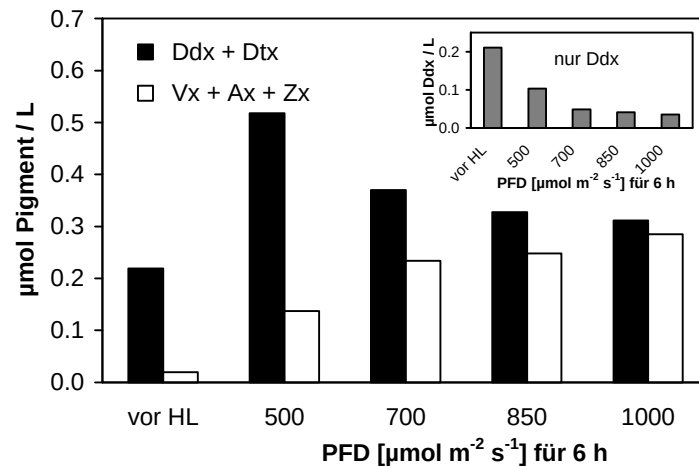


Abb. 3.9 Zunahme und Verteilung der während einer sechsstündigen Starklichtinkubation neu gebildeten Xanthophyllzykluspigmente in *P. tricornutum* zwischen den Pools von DT-Zyklus und VAZ-Zyklus in Abhängigkeit von der PFD. Für jede Lichtintensität wurden zwei Proben analysiert, deren Ergebnisse sich um weniger als 1% unterschieden. Die Zunahme der Deepoxidase-Aktivität mit höherer PFD zeigt sich in einer verstärkten Deepoxidierung von Ddx (eingefügte Grafik).

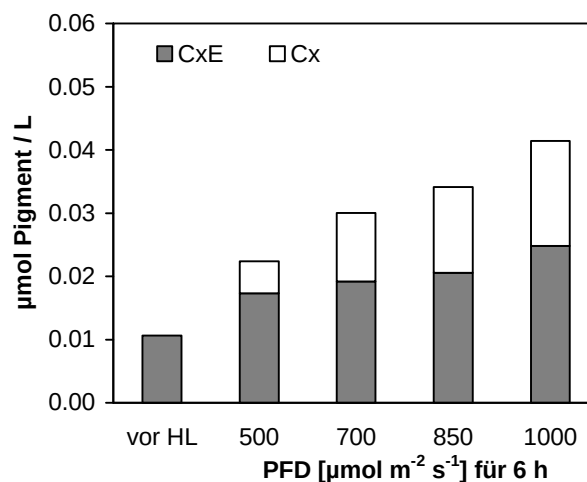


Abb. 3.10 Zunahme und Verteilung der während einer sechsstündigen Starklichtinkubation neu gebildeten Pigmente des CE-Zyklus in *P. tricornutum* in Abhängigkeit von der PFD. Für jede Lichtintensität wurden zwei Proben analysiert, deren Ergebnisse sich um weniger als 1% unterschieden.

Auch die Zunahme des CE-Pools ist mit der Lichtintensität positiv korreliert. Während jedoch die anderen beiden Pools am Ende der Starklichtphase einen Deepoxidierungsgrad von bis zu 90% aufweisen, überwiegt im CE-Pool auch bei der höchsten PFD immer noch die epoxidierte Spezies CxE (Tab. 3.5). Und obwohl sich der CE-Pool bei Inkubation mit $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ vervierfacht, ist seine absolute Zunahme im Vergleich zur Akkumulation der anderen beiden Xanthophyllzyklus-Pools gering.

1.6.2 Einfluß der Hemmung von Deepoxidase oder Carotinoidbiosynthese auf die Akkumulation

Die Bedeutung der Deepoxidase für die Zunahme der VAZ- und des CE-Pools zeigte sich auch, wenn das Enzym vor Beginn der Starklichtphase durch Zugabe von DTT inhibiert wurde. Wie aus Abb. 3.11.A ersichtlich, führt die Anwesenheit von $500 \mu\text{M}$ DTT in der Algensuspension zu einer stark beeinträchtigten Deepoxidierung von Ddx zu Dtx im Vergleich zur Kontrolle ohne Hemmstoff-zusatz. Die Zunahme an Zx wird durch DTT praktisch vollständig unterbunden (Abb. 3.11.B), statt dessen ist ein leichter Anstieg des Gehaltes an Vx und an Ax zu beobachten. Insgesamt wächst der VAZ-Pool aber deutlich langsamer als in der Kontrollkultur. Auch der CE-Pool (Abb. 3.11.C) zeigt unter DTT eine langsamere Zunahme, was darauf zurückzuführen ist, daß nun die Anreicherung von Cx unterbleibt.

Die Akkumulation von Pigmenten des VAZ- und des CE-Pools ließ sich auch durch Zugabe von Norflurazon zur Algenkultur unterbinden. Norflurazon verhindert die Neusynthese von Carotinoiden durch Hemmung des Enzyms Phytoen-Desaturase (Sandmann et al. 1989). Die Deepoxidase wird durch den Hemmstoff nicht beeinflusst, wie ein Vergleich der Abnahmen von Ddx und Vx unter Norflurazon und in der unbehandelten Kontrollkultur zeigt. Jedoch ist nach Zugabe von Norflurazon kein Anwachsen des VAZ-Pools mehr zu beobachten (Abb. 3.11.B), die Abnahme von Vx wird nur durch eine entsprechende Zunahme an Zx ausgeglichen. CxE nimmt unter Norflurazon ab, die Akkumulation von Cx unterbleibt wie schon bei Zugabe von DTT (Abb. 3.11.C). Demnach speist sich die Zunahme sowohl des VAZ- als auch des CE-Pools unter Starklicht nicht aus den bereits vorhandenen Pigmenten, sondern ist an eine *de-novo*-Synthese von Carotinoiden geknüpft. Dieser Befund deutet bereits darauf hin, daß die Pigmente dieser beiden Pools Synthesevorstufen für die in *P. tricornutum* dominierenden Xanthophylle Ddx, Dtx und Fx darstellen.

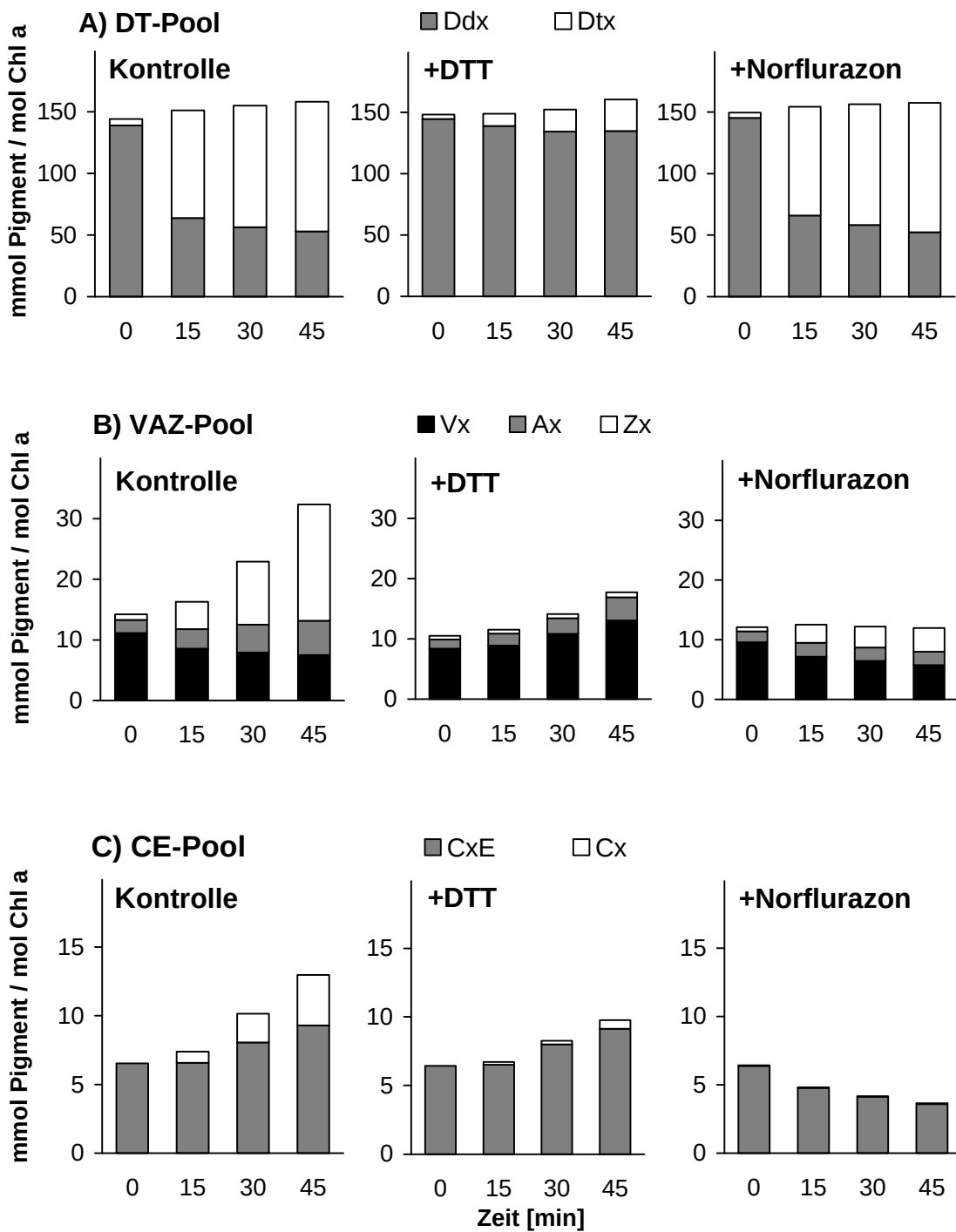


Abb. 3.11 Konzentrationsänderungen der Xanthophyllzykluspigmente in *P. tricornutum* während der ersten 45 min einer Inkubation mit HL2 ($1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Messungen der drei Pools erfolgten an einer Kontrollkultur ohne Zusatz von Hemmstoffen, an einer Kultur nach Inhibierung der Deepoxidase-Reaktion durch DTT ($500 \mu\text{M}$) und an Algen mit einer durch Zugabe von Norflurazon ($5 \mu\text{M}$) gehemmten Carotinoidbiosynthese.

1.7 Umwandlung der im Starklicht akkumulierten Pigmente während der anschließenden Schwachlichtphase

Die Biosyntheseverknüpfung zwischen den Pigmenten des VAZ-Pools, des DT-Pools und Fx wurde an Algen untersucht, die zunächst für 6 h einer PFD von $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (HL2) ausgesetzt waren. Wie bereits in Kap. 1.1 beschrieben wurde, stagniert während dieser Starklichtphase die Zunahme an Chl a, während die Carotinoide weiter akkumulieren. Aus Abb. 3.12 wird nochmals ersichtlich, daß vor allem die Pigmente des VAZ-Zyklus zunehmen, und hier in erster Linie das Zx (Tab. 3.6). Der Gehalt an β -Carotin erhöht sich im Starklicht nur leicht, die Konzentration an Fx nimmt sogar ab. Nach 6 h Starklicht hat der VAZ-Pool nahezu die gleiche Größe erreicht wie der DT-Pool.

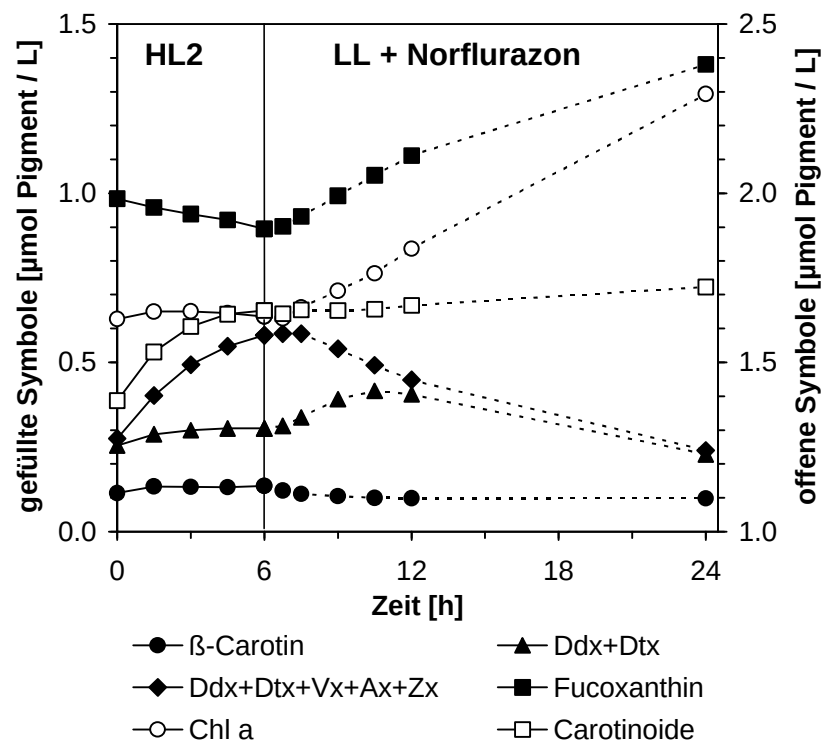


Abb. 3.12 Entwicklung der Pigmente in einer *P. tricornutum*-Kultur während 6h Belichtung mit HL2 ($1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und anschließender Inkubation im LL ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die durch gestrichelte Linien verbundenen Meßpunkte geben die Pigmententwicklung nach Zugabe von Norflurazon ($5 \mu\text{M}$ Endkonzentration) am Ende der Starklichtphase wieder. Anstelle des VAZ-Pools ist die Summe von VAZ- und DT-Pool aufgetragen. Folglich läßt sich die Entwicklung des VAZ-Pools anhand der Fläche zwischen (Ddx+Dtx) und der Summe beider Pools verfolgen.

Vor der anschließenden Schwachlichtinkubation wurde die Algenkultur in zwei Aliquots geteilt und die eine Hälfte mit Norflurazon ($5 \mu\text{M}$ Endkonzentration) versetzt, um die Neusynthese von Carotinoiden zu unterbinden. Während der ersten eineinhalb Stunden im Schwachlicht findet in beiden Ansätzen zunächst die Epoxidierung von Zx zu Vx und von Dtx zu Ddx statt (Tab. 3.6). Im Ansatz mit

Norflurazon (Abb. 3.12) ist während der folgenden Stunden eine starke Chlorophyllzunahme zu beobachten, wobei die Konzentration der Carotinoide sich infolge der Hemmung ihrer Neusynthese praktisch nicht verändert. Auch die β -Carotin-Menge ändert sich während des gesamten Meßzeitraumes nur unwesentlich und spielt ebenso wie die Pigmente des sehr kleinen CE-Pools für die im folgenden beschriebenen Änderungen in den Xanthophyllkonzentrationen keine Rolle.

Tab. 3.6 *Pigmentänderungen in P. tricornutum nach 6 h HL2 (1000 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und während einer anschließenden LL-Inkubation von 18 h. Nach der Starklichtphase wurde einem Aliquot der Kultur Norflurazon (Endkonzentration 5 μM) zugesetzt, der andere Teil ohne Hemmstoffzugabe diente als Kontrolle.*

Pigment [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	Vor HL	6 h HL1	0,75 h LL	1,5 h LL	3 h LL	4,5 h LL	6 h LL	18 h LL
Chl a	1,628	1,636	1,653	1,657	1,736	1,787	1,846	3,223
		+Nor.	1,631	1,662	1,712	1,763	1,836	2,293
Chl c ₁ /c ₂	0,210	0,199	0,206	0,207	0,216	0,224	0,233	0,449
		+Nor.	0,201	0,207	0,214	0,221	0,231	0,307
Carotinoide	1,387	1,653	1,669	1,661	1,705	1,711	1,724	2,801
		+Nor.	1,644	1,656	1,653	1,657	1,669	1,723
β -Carotin	0,114	0,135	0,128	0,120	0,116	0,113	0,119	0,228
		+Nor.	0,121	0,112	0,104	0,100	0,099	0,098
CxE	0,011	0,023	0,030	0,022	0,014	0,010	0,009	0,027
		+Nor.	0,027	0,020	0,010	0,006	0,005	0,001
Cx	0,000	0,017	0,005	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
		+Nor.	0,005	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
Vx	0,016	0,010	0,144	0,195	0,141	0,075	0,041	0,036
		+Nor.	0,140	0,184	0,120	0,056	0,027	0,008
Ax	0,003	0,023	0,060	0,024	0,010	0,007	0,006	0,007
		+Nor.	0,058	0,026	0,010	0,007	0,005	0,002
Zx	0,002	0,242	0,071	0,034	0,018	0,013	0,010	0,004
		+Nor.	0,075	0,037	0,018	0,013	0,010	0,002
Ddx	0,245	0,041	0,208	0,268	0,353	0,389	0,392	0,474
		+Nor.	0,207	0,269	0,348	0,381	0,376	0,159
Dtx	0,009	0,264	0,107	0,068	0,046	0,036	0,029	0,019
		+Nor.	0,106	0,069	0,044	0,034	0,030	0,069
Fx	0,984	0,895	0,911	0,923	1,000	1,061	1,113	2,000
		+Nor.	0,902	0,932	0,992	1,053	1,111	1,381

Die Menge an Fx steigt im Schwachlicht parallel zu der von Chl a an. Aber auch der DT-Pool nimmt während der ersten vier Stunden im Schwachlicht weiter zu, gleichzeitig verkleinert sich der VAZ-Pool drastisch. Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß das im Starklicht akkumulierte Zx über Vx in Ddx

und Fx umgewandelt wird. Nach etwa fünf Stunden im Schwachlicht ist der VAZ-Pool weitestgehend abgebaut, fast das gesamte Dtx ist zu Ddx epoxidiert worden, und nun beginnt auch der Ddx-Gehalt abzunehmen; allein die Fx-Menge nimmt weiter zu. Diese Beobachtung zeigt, daß in *P. tricornutum* Ddx zur Synthese von Fx dienen kann.

Aus Tab. 3.6 wird ersichtlich, daß auch in der Kontrollkultur ohne Zusatz von Norflurazon im wesentlichen die gleichen Umwandlungsprozesse ablaufen. Während der ersten sechs Stunden im Schwachlicht zeigen beide Ansätze gleiche Zuwachsraten an Chl a und Chl c_1/c_2 . Zudem wächst der Carotinoidgehalt der Kontrollkultur in diesem Zeitraum deutlich langsamer als während der vorangegangenen Starklichtphase. Der Carotinoidzuwachs macht sich lediglich in den Poolgrößen der drei Pigmente β -Carotin, Vx und Ddx bemerkbar, die Epoxidierungsreaktionen sowie die Fx-Entwicklung verlaufen in beiden Ansätzen parallel. Zu deutlichen Unterschieden kommt es erst im weiteren Verlauf der Schwachlichtinkubation. Nach 18 h Schwachlicht ist die Chlorophyllneubildung in der mit Norflurazon versetzten Algenkultur weit hinter der Syntheseleistung der Kontrollkultur zurückgeblieben. In letzterer hat sich der Chlorophyllgehalt verdoppelt, während er in der Norflurazon-Kultur im gleichen Zeitraum nur um 40% gestiegen ist. Gleiches gilt auch für die Entwicklung von Fx. Demnach führt die Hemmung der Carotinoidbiosynthese längerfristig auch zu einer Beeinträchtigung der Chlorophyllbildung. Zudem fällt auf, daß eine enge Kopplung der Entwicklung von Chl a und Fx zu bestehen scheint.

1.8 Diskussion der Akkumulation der drei Xanthophyllzyklus-Pools in *Phaeodactylum tricornutum*

Die Zusammensetzung der in Kieselalgen vorkommenden Carotinoide war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So berichtet schon Kylin (1927), daß Diatomeen das erstmals bei Braunalgen beschriebene Fx enthalten. Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurden ferner β -Carotin, Diadinoxanthin und Diatoxanthin als stets vorhandene Carotinoide identifiziert (Strain et al. 1944, Parsons 1961, Jeffrey 1961, 1968, Hager und Stransky 1970b, Stauber und Jeffrey 1988, Pennington et al. 1988; in allen genannten Arbeiten gehörte *P. tricornutum* zu den untersuchten Algenarten). Auch das Vorhandensein des DT-Zyklus in Kieselalgen wurde bereits vor 30 Jahren durch Hager und Stransky (1970b) gezeigt. Seit der Entdeckung, daß der im Pflanzenreich nahezu ubiquitär verbreitete Xanthophyllzyklus an der Dissipation überschüssiger Lichtenergie beteiligt ist (Demmig et al. 1987), wurde der DT-Zyklus bei Diatomeen wiederholt untersucht (Demers et al. 1991, Willemoës und Monas 1991, Arsalane et al. 1994, Olaizola und Yamamoto 1994, Olaizola et al. 1994, Latasa 1995, Müller 1995, Müller und Wilhelm 1997, Casper-Lindley und Björkman 1998, Oku und Kamatani 1999). Deshalb erscheint es zunächst sehr überraschend, daß in keiner dieser Arbeiten Xanthophylle des VAZ-Zyklus gefunden wurden.

Wie die Ergebnisse in Kap. 1.6 zeigen, sind für die Akkumulation der Pigmente des VAZ-Zyklus wie auch des CE-Zyklus drei Faktoren von besonderer Bedeutung: Zunächst ist eine hohe Aktivität der

Xanthophyllzyklus-Deepoxidase erforderlich (Abb. 3.9-3.11), weiterhin die Neusynthese von Carotinoiden (Abb. 3.11), und schließlich läßt sich erst mehrere Stunden nach dem Lichtintensitätswechsel eine signifikante Akkumulation beobachten (Abb. 3.12).

Die zuvor genannten Untersuchungen zur Pigmentzusammensetzung sowie ein Teil der Studien zum Xanthophyllzyklus erfolgten an Algen, die unter konstanten Lichtbedingungen kultiviert wurden. Inkubation der Algen in konstantem Starklicht hat eine entsprechende Akklimatisierung der Algen zur Folge: Die Pigmentkonzentration pro Zelle wird erniedrigt (Falkowski 1980, Falkowski et al. 1985, Sukenik et al. 1988), während die Konzentration der Calvinzyklus-Enzyme, wie z.B. der RUBISCO, gleich bleibt (Sukenik et al. 1987) oder sogar erhöht wird (Fisher et al. 1989). Unter diesen Bedingungen ist die Aktivität der Xanthophyllzyklus-Deepoxidase und damit der Deepoxidierungsgrad des DT-Pools gering (Willemoës und Monas 1991, Goericke und Welschmeyer 1992b), folglich ist eine nennenswerte Akkumulation von Zx nicht zu erwarten. Bei anderen Untersuchungen zum Xanthophyllzyklus von Diatomeen wurden die Algen vor Beginn der eigentlichen Starklichtphase bereits bei einer relativ hohen Lichtintensität angezogen (PFD von $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei Aarsland et al. 1994 sowie Casper-Lindley und Björkman 1998, $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei Olaizola et al. 1994, $365 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei Olaizola und Yamamoto 1994). In diesen Fällen ist ebenfalls von einer partiellen Akklimatisierung der Algen an erhöhte Lichtintensitäten auszugehen, die eine geringere Deepoxidase-Aktivierung im Zuge der Starklichtinkubation zur Folge haben könnte. Zudem dauerten die Starklichtperioden in keiner der genannten Studien länger als zwei Stunden. Die in dieser Zeit akkumulierte Menge an Zx war vermutlich zu gering, um im HPLC-Chromatogramm Aufmerksamkeit zu erregen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand ein leistungsfähiges HPLC-Trennsystem in Kombination mit einem Photodiodenarray-Detektor zur Verfügung, welcher die Aufnahme von Online-Absorptionsspektren aller Pigmentfraktionen ermöglichte. Hiervon profitierte besonders die Identifikation unbekannter, gering konzentrierter Pigmente wie Cx und CxE. Die Hinzunahme des Epoxidgruppen-Tests ermöglichte eine weitere, schnell durchführbare Absicherung der Identifikation. Schließlich standen durch das kontinuierliche Kulturverfahren für die Versuche Algen mit hoher Wachstumsrate und damit auch hoher Pigmentsyntheseaktivität zur Verfügung, wodurch die Untersuchung der neu beobachteten Pigmente und der Ursachen ihres Auftretens deutlich erleichtert wurde.

Die Daten aus Kap. 1.7 zeigen, daß *P. tricornutum* das im Starklicht angereicherte Zx über Vx zu Ddx und Fx umwandelt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß Vx auch im Schwachlicht als Precursor für die Synthese von Ddx und Fx dient. Schon 1969 diskutierten Bonnett und Mitarbeiter Violaxanthin als mögliche Vorstufe der Fx-Synthese in Braunalgen. Swift et al. (1982) zeigten, daß im Dinoflagellat *Amphidinium carterae* Ddx und Peridinin über die Vorstufen Zeaxanthin und *trans*-Neoxanthin synthetisiert werden. Swift und Milborrow (1981) postulierten daraufhin die Bildung von Ddx aus Vx über Neoxanthin als Zwischenstufe (Abb. 3.13), ohne jedoch die Beteiligung von Vx experimentell belegen zu können. Goericke und Welschmeyer (1992b) wiederum schlossen aus der

Kinetik der Pigmentmarkierung in der Diatomee *Thalassiosira weissflogii* nach Zusatz von ^{14}C -Bicarbonat, daß ein Teil des Ddx als Precursor-Pool für die Fx-Synthese dient.

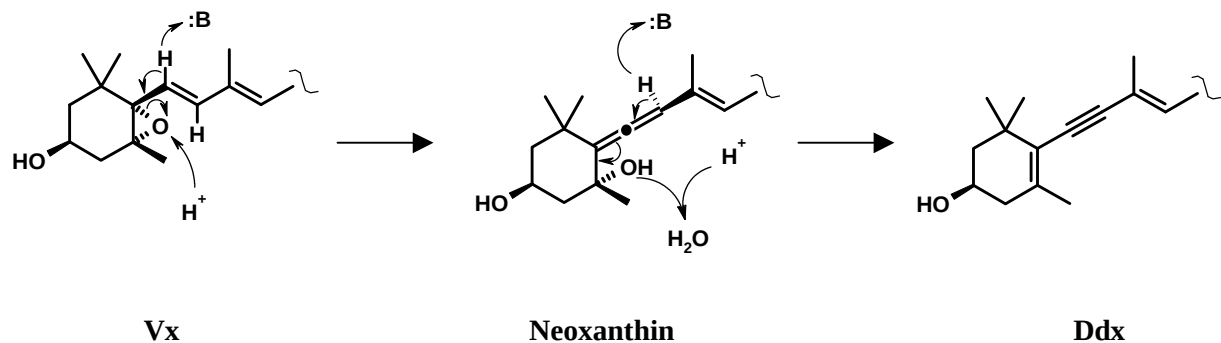


Abb. 3.13 Von Swift und Milborrow (1981) postulierter Mechanismus der Synthese von Ddx aus Vx. Dieser Hypothese nach wäre die 5,6-Epoxidgruppe in Vx Ausgangspunkt für die Bildung sowohl der allenischen Gruppe, wie sie in Neoxanthin und Fx zu finden ist, als auch der acetylenischen Gruppe in Ddx und Dtx.

Die Ergebnisse aus Kap. 1.7 bestätigen die bisherigen Vorstellungen zur Synthese von Ddx und Fx und belegen erstmals die Beteiligung von Vx. Außerdem sind mit Cx und CxE zwei potentielle Zwischenstufen bei der Synthese von Vx aus β -Carotin identifiziert worden, deren Vorhandensein in Kieselalgen bis jetzt nicht belegt war.

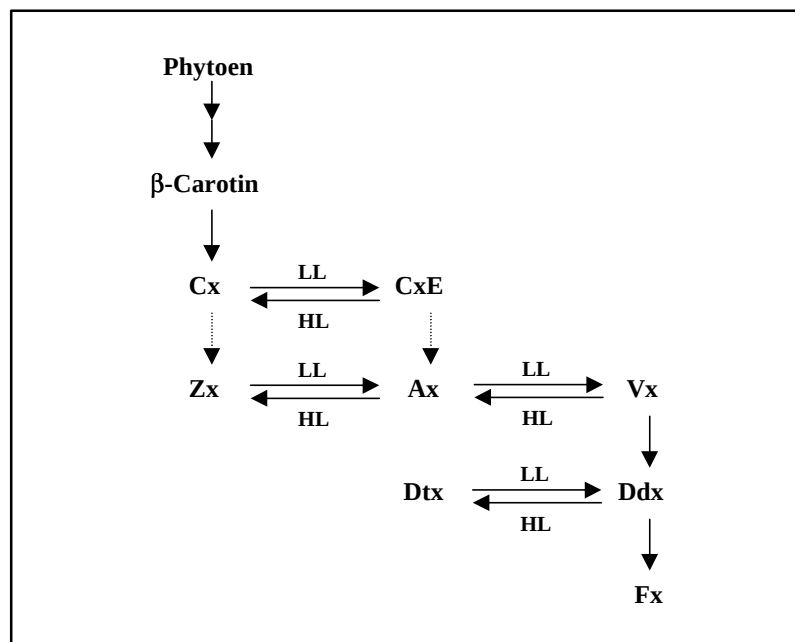


Abb. 3.14 Hypothetische Verknüpfung der in *P. tricornutum* identifizierten Xanthophyllzyklen mit der Biosynthese von Fx.

Abb. 3.14 faßt die oben diskutierten Ergebnisse zu einem hypothetischen Syntheseweg der Xanthophylle in *P. tricornutum* zusammen. Auf der Basis dieses Schemas resultiert die Akkumulation des VAZ-Pool daraus, daß die starklichtinduzierte Deepoxidase-Reaktion mit der im Schwachlicht favorisierten Umwandlung von Vx zu Ddx und Fx konkurriert. Die Deepoxidase-Reaktion entzieht dabei dem Biosyntheseweg zu Fx die Substrate. Bei einer niedrigen Deepoxidase-Aktivität akkumulieren die neu synthetisierten Carotinoide überwiegend in Form von Dtx, doch mit zunehmender Deepoxidierungsrate werden sie bereits auf der Stufe des Zx „abgefangen“ (vgl. Abb. 3.9). Im nachfolgenden Schwachlicht werden die in Form von Zx und Dtx gespeicherten Carotinoide epoxidiert und so dem Fx-Biosyntheseweg zugeleitet. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die Deepoxidierung von Ddx, Vx, Ax und CxE in *P. tricornutum* vom gleichen Enzym katalysiert wird oder ob die Algen über mehrere Deepoxidase-Isoformen verfügen. Gleiches gilt für die Epoxidierung von Dtx, Zx, Ax und Cx. Bemerkenswerterweise ergaben Substratstudien an einer aus Salat (*Lactuca sativa*) aufgereinigten Vx-Deepoxidase, daß dieses Enzym dazu in der Lage ist, auch Ddx und CxE zu deepoxidieren, obwohl zumindest Ddx in Gefäßpflanzen nicht vorkommt (Yamamoto und Higashi 1978). Somit wäre es prinzipiell möglich, daß auch zur Katalyse der in *P. tricornutum* beobachteten Reaktionen nur eine Deepoxidase erforderlich ist. Eine nähere Untersuchung dieser Frage erfolgt in Kap. 2.1.3. Zu erwähnen bleibt noch die Beobachtung, daß die Vx-Deepoxidase aus Salat ebenso wenig β -Carotin-Epoxid als Substrat akzeptiert wie Antheraxanthin-A, bei dem die 3-Hydroxylgruppe und die 5,6-Epoxidgruppe auf der gleichen Seite von der Jononringebene abgewinkelt sind (*cis*-Epoxid mit 3S, 5S, 6R-Konfiguration). Das Enzym hat demnach eine Stereospezifität für 3-Hydroxy-5,6-Epoxy-Carotinoide mit 3S, 5R, 6S-Konfiguration (Yamamoto und Higashi 1978). Dieser Befund kann Hilfestellung für die Beantwortung der Frage nach der Konfiguration des in *P. tricornutum* identifizierten CxE leisten, über die mit den hier verwendeten Methoden keine Aussage gemacht werden kann. Unter der Annahme, daß das für die Deepoxidierung von CxE in *P. tricornutum* verantwortliche Enzym die gleiche Substratspezifität hat wie die Deepoxidase aus Salat, sollte CxE aus *P. tricornutum* die bereits in Abb. 3.6 dargestellte 3S, 5R, 6S-Konfiguration aufweisen.

Fx und die Chlorophylle erscheinen in ihrer Entwicklung eng miteinander korreliert. So stagnieren im Starklicht die Konzentrationen beider Pools (Abb. 3.12), um im nachfolgenden Schwachlicht parallel anzusteigen. In diesem Zusammenhang sind besonders die Unterschiede in der längerfristigen Pigmententwicklung zwischen der Kontrollkultur und den mit Norflurazon versetzten Algen bemerkenswert (Tab. 3.6). In den Algen mit gehemmter Carotinoidbiosynthese bleibt nach 18 h Schwachlicht nicht nur der Gehalt an Fx, sondern auch der an Chl a und Chl c₁/c₂ um 30% hinter dem der Kontrolle zurück, obwohl während der ersten 6 h noch keine Unterschiede zwischen beiden Kulturen auftraten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß der unter anhaltender Hemmung der Carotinoidbiosynthese eintretende Mangel an Fx die weitere Akkumulation der Chlorophylle unterbindet. Mewes (1997) konnte an UV-behandelten Kulturen von *P. tricornutum* auch den umgekehrten Effekt beobachten. Dort führte unter bestimmten Bedingungen eine Inkubation der Algen mit Stark-

licht und UV-B im nachfolgenden Schwachlicht zu einer parallelen Abnahme von Chl a und Fx, obwohl die Summe der anderen Carotinoide weiter zunahm.

Die enge Korrelation von Chlorophyll- und Fx-Entwicklung ist dadurch erklärbar, daß Chl a, Chl c_1/c_2 und Fx in definierter Stöchiometrie an die Lichtsammelkomplexe der Kieselalgen, die Fx-Chl-Proteine (FCP) gebunden sind (Friedman und Alberte 1984, Gugliemelli 1984, Owens und Wold 1986, Caron und Brown 1987, Berkloff et al. 1990). Nach einem Wechsel von Schwachlicht- zu Starklichtinkubation zeigen Kieselalgen nicht nur die auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Reduktion der Chlorophyllbiosynthese bei ansteigender Wachstumsrate (Post et al. 1984), sondern zugleich auch eine stark verminderte FCP-Akkumulation (Friedman und Alberte 1986). Bei Rückführung der Algen vom Starklicht ins Schwachlicht ist ein rascher Anstieg sowohl der Chlorophyll- als auch der FCP-Apoproteinsynthese zu beobachten (Post et al. 1984, Friedman und Alberte 1986). Die enge Korrelation von Fx-Bildung und FCP-Synthese ließe sich mit Hilfe einer von Plumley und Schmidt (1995) für die Biogenese des LHC II der Höheren Pflanzen formulierten Hypothese erklären. Die Autoren postulierten, daß die Synthese des an den nativen LHC II gebundenen *cis*-Neoxanthins aus der Vorstufe Violaxanthin eine Wechselwirkung des katalysierenden Enzyms mit bestimmten Domänen des LHC-Apoproteins erfordert. Im Falle der Kieselalgen würde ein solcher Mechanismus auf elegante und zugleich effektive Weise sicherstellen, daß die Synthese an Fx dem aktuellen FCP-Bedarf angepaßt ist. Die Vorstufen Ddx und Vx ließen sich in diesem Rahmen als rasch mobilisierbare Reservepools für die Fx-Synthese interpretieren. Dieser Gedanke wird in Kapitel 3.3 noch ausführlicher diskutiert.

Der starklichtinduzierte Anstieg des CE-Pools fällt im Vergleich zur Akkumulation des VAZ-Pools sehr gering aus. Auch hier wird hauptsächlich die deepoxidierte Spezies Cx angereichert, allerdings nimmt die CxE-Konzentration im Starklicht ebenfalls noch leicht zu (Abb. 3.10). Somit scheint ein Teil des CxE für die Deepoxidase nicht zugänglich zu sein. Grundsätzlich sind für die Akkumulation des CE-Pools aber die gleichen Faktoren entscheidend wie im Falle des VAZ-Pools. Mögliche Gründe für den im Starklicht unverändert hohen CxE-Anteil sowie die geringe Akkumulationsrate des CE-Pools werden in Kap. 2.5 ausführlicher diskutiert. Dort wird auch näher auf die Rolle von Cx und CxE bei der Biosynthese von Vx aus β -Carotin eingegangen.

2. Bestimmung der Xanthophyllumwandlungskinetiken in *Phaeodactylum tricornutum* und Modellierung der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen

In den folgenden Versuchen wurden zeitaufgelöste Messungen der Pigmentänderungen in *P. tricornutum* und *Cyclotella meneghiniana* durchgeführt, aus denen die Kinetiken verschiedener Pigmentumwandlungsschritte ermittelt werden konnten. Ferner wurde mittels der experimentell bestimmten Wachstumsraten und der *steady-state*-Pigmentgehalte einer Turbidostatkultur von *P. tricornutum* für jede Teilreaktion des bereits in Abb. 3.14 gezeigten hypothetischen Xanthophyllbiosyntheseschemas eine theoretisch zu erwartende Ratenkonstante berechnet. Der Vergleich von gemessenen und theoretischen Ratenkonstanten ermöglicht die Evaluation von Modellen der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen.

2.1 Kinetiken der Pigmentumwandlungen im Rahmen des Xanthophyllzyklus

Zunächst erfolgte eine eingehendere Untersuchung der Reaktionen, die in *P. tricornutum* im Rahmen des Xanthophyllzyklus ablaufend. Dabei wurden die Umwandlungskinetiken sowohl in Kulturen vor Beginn der Starklichtzyklen als auch unter periodischer Starklichtbehandlung ermittelt.

2.1.1 Xanthophyllzykluskinetiken einer Schwachlichtkultur

Unter Schwachlichtbedingungen angezogene Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* zeigten im Starklicht eine rasche Deepoxidierung von Ddx zu Dtx (Abb. 3.15.A). Allerdings wurde innerhalb der ersten Minuten nur ein Teil des in den Algen vorhandenen Ddx deepoxidiert. Im weiteren Verlauf der Starklichtinkubation war eine deutlich verlangsamte Ddx-Abnahme zu beobachten. Eine Kurvenregression der Meßwerte zeigte, daß sich die Ddx-Abnahme als eine biexponentielle Funktion folgender Form beschreiben läßt:

$$Ddx(t) = Ddx_N + Ddx_S \cdot \exp(-k_{DT1} \cdot t) + Ddx_L \cdot \exp(-k_{DT2} \cdot t) \quad (3.1)$$

mit $Ddx(t)$ = Ddx-Menge zum Zeitpunkt t ,
 Ddx_N = Nicht deepoxidierbarer Anteil an Ddx,
 Ddx_S, Ddx_L = Schnell bzw. langsam deepoxidierbarer Ddx-Anteil,
 k_{DT1}, k_{DT2} = Ratenkonstanten der schnellen bzw. der langsamen Deepoxidierungsreaktion.¹

¹ Für die Benennung der Ratenkonstanten wurde jedes Pigment mit einem Ein-Buchstaben-Code versehen. Im tiefgestellten Index jeder Ratenkonstante gibt der erste Buchstabe das Ausgangs- und der zweite Buchstabe das Produktpigment an. Die Codierung der Pigmente lautet: A = Ax, B = β -Carotin, C = Cx, D = Ddx, E = CxE, F = Fucoxanthin, T = Dtx, V = Vx.

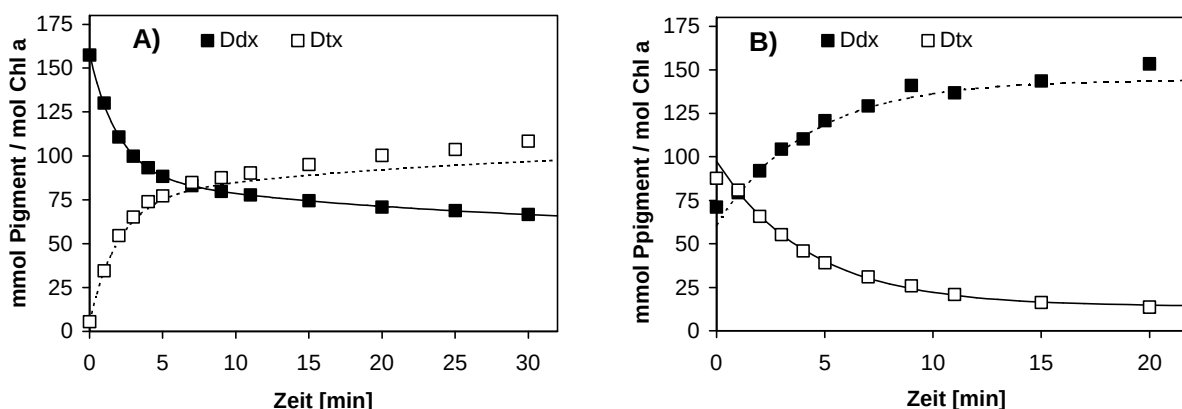


Abb. 3.15 Kinetik der Deepoxidierung und Epoxidierung des DT-Zyklus in *P. tricornutum* nach Schwachlichtakklimatisierung. Zur Bestimmung der (A) Deepoxidierungskinetik von Ddx wurden an LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) adaptierte Algen für 30 min mit HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) belichtet. Die Epoxidierungsreaktion von Dtx (B) wurde in Algen ermittelt, die zunächst 15 min mit HL1 inkubiert und dann wieder in LL transferiert wurden. Die durchgezogene Linie in (A) ergibt sich aus Kurvenregression unter Annahme von zwei überlagerten Zerfallskinetiken erster Ordnung (biexponentieller Zerfall), die durchgezogene Linie in (B) entspricht einer einfachen Kinetik erster Ordnung (hier wurde der erste Datenpunkt bei der Regression nicht berücksichtigt). Die gepunkteten Linien zeigen die Produktzunahmen bei Annahme stöchiometrischer Pigmentumwandlungen zwischen Ddx und Dtx. Die Pigmentkonzentrationen sind auf den Chl a-Gehalt bezogen, da dieser während des Meßzeitraumes praktisch konstant blieb.

Tab. 3.7 Parameter der Deepoxidierung von Ddx zu Dtx in *P. tricornutum*. Die Versuchsbedingungen entsprechen den Angaben zu Abb. 3.15.A. Die Parameter der Ddx-Abnahme ergaben sich durch Regression der Meßkurven nach Gleichung 3.1. Die Ratenkonstanten sind in $[\text{min}^{-1}]$ angegeben, die Pigmentkonzentrationen in $[\text{mmol}\cdot\text{mol Chl a}^{-1}]$. Exp. = Experiment, Mw. = Mittelwert, r^2 = Korrelationskoeffizient der Regression.

Exp.	k_{DT1}	k_{DT2}	Ddx_N	Ddx_S	Ddx_L	r^2
1	0,498	0,105	71,4	65,6	24,5	0,998
2	0,502	0,039	56,9	69,4	31,5	1,000
Mw.	0,500	0,072				

Die Regressionsergebnisse aus zwei Messungen sind in Tab. 3.7 aufgeführt. Aus der Tabelle geht hervor, daß in schwachlichtadaptierten Zellen von *P. tricornutum* drei verschiedene Ddx-Pools vorliegen. Etwa 40% des vorhandenen Ddx stehen für eine schnelle Deepoxidierung zur Verfügung, weitere 20% werden mit einer deutlich langsameren Kinetik zu Dtx umgewandelt. Die verbleibenden 40%, also 60 bis 70 mmol Ddx pro mol Chl a, sind einer Deepoxidierung nicht zugänglich. Aus Abb. 3.15.A

geht ferner hervor, daß der Gehalt an Dtx im Laufe der Starklichtinkubation stärker zunimmt, als dies bei stöchiometrischer Umwandlung von Ddx zu Dtx zu erwarten wäre. Der zusätzliche Anstieg an Dtx ist auf die parallel zur Deepoxidierung stattfindende Neusynthese von Carotinoiden zurückzuführen.

Wurden die Algen nach 15 min Starklichtbehandlung wieder ins Schwachlicht transferiert, so setzte unmittelbar die Rückwandlung von Dtx zu Ddx ein (Abb. 3.15.B). Die Dtx-Abnahme ließ sich als eine einfache Reaktion erster Ordnung mit folgender Gleichung beschreiben:

$$Dtx(t) = Dtx_N + Dtx_S \cdot \exp(-k_{TD} \cdot t) \quad (3.2)$$

mit $Dtx(t)$ = Dtx-Menge zum Zeitpunkt t ,
 Dtx_N = Nicht epoxidierbarer Anteil an Dtx,
 Dtx_S = Epoxidierbarer Dtx-Anteil,
 k_{TD} = Ratenkonstante der Epoxidierungsreaktion.

Die Regressionsergebnisse aus drei Messungen sind in Tab. 3.8 zusammengestellt. Der größte Teil des Dtx, das während der Starklichtinkubation gebildet wurde, steht unmittelbar für die Rückreaktion zur Verfügung. Ein Vergleich der Ratenkonstanten k_{DT1} der Deepoxidierung und k_{TD} der Epoxidierung zeigt, daß letztere Reaktion nur etwa halb so schnell verläuft.

Tab. 3.8 *Parameter der Epoxidierung von Dtx zu Ddx in P. tricornutum. Die Versuchsbedingungen entsprechen den Angaben zu Abb. 3.15.B. Die Parameter der Dtx-Abnahme ergaben sich durch Regression der Meßkurven nach Gleichung 3.2. Ddx_N gibt die nach 15 min HL1 verbliebene Ddx-Menge an. Die Ratenkonstanten sind in $[\text{min}^{-1}]$ angegeben, die Pigmentkonzentrationen in $[\text{mmol} \cdot \text{mol Chl } a^{-1}]$. Exp. = Experiment, Mw. = Mittelwert, r^2 = Korrelationskoeffizient der Regression.*

Exp.	k_{TD}	Dtx_N	Dtx_S	Ddx_N	r^2
1	0,221	11,2	83,1	68	0,999
2	0,199	12,2	86,2	66	0,998
3	0,233	14,0	83,3	61	0,998
Mw.	0,218				

2.1.2 Xanthophyllzykluskinetiken einer Kultur nach 6 h Starklicht

Im nächsten Schritt erfolgte eine genauere Untersuchung der Kinetiken der Epoxidierung und Deepoxidierung in den drei nach der sechsständigen Starklichtphase vorliegenden Xanthophyllzyklus-Pools. Für die Bestimmung der Epoxidierungskinetiken wurde eine Probenserie aus den ersten 45 min der Erholungsphase im Schwachlicht mittels HPLC analysiert (Abb. 3.16.A-C). Zur Ermittlung der Deepoxidierungskinetiken wurden die Algen nach der Starklichtphase zunächst für 45 min mit Schwachlicht inkubiert und dann erneut mit HL1 bestrahlt (Abb. 3.16.D-F).

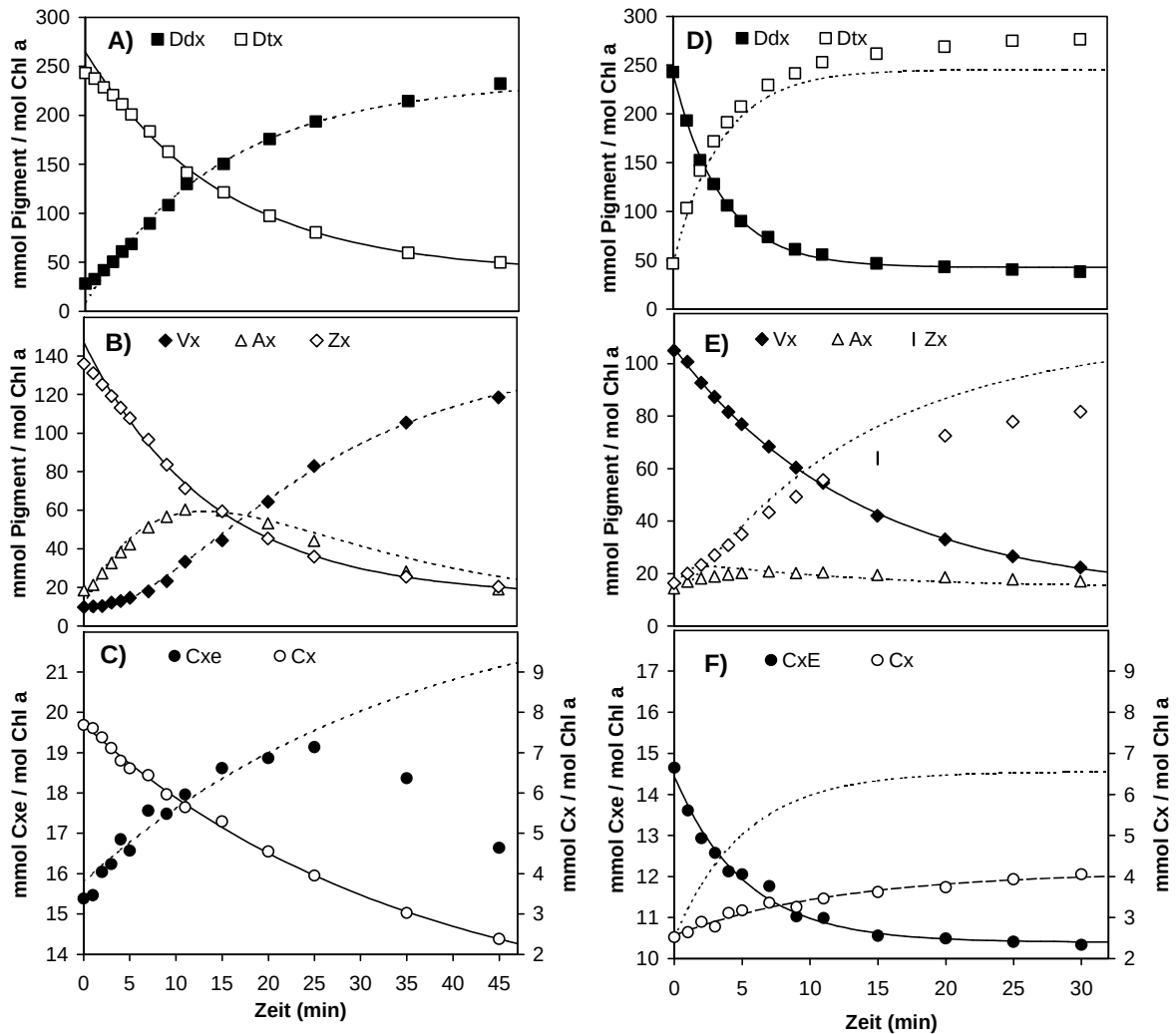


Abb. 3.16 Kinetik der Epoxidierung und Deepoxidierung der drei in *P. tricornutum* beobachteten Xanthophyllzyklen nach 6 h Starklicht. Die Algen wurden zunächst für 6 h mit HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) belichtet. Die Epoxidierungsreaktionen (A)-(C) wurden während einer anschließenden 45minütigen LL-Belichtung ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gemessen. Für die Analyse der Deepoxidierungsreaktionen (D)-(F) wurden die Algen nach der 45minütigen LL-Phase erneut mit HL1 inkubiert. Die durchgezogenen Linien ergeben sich aus einer Kurvenregression unter Annahme einer Zerfallskinetik erster Ordnung (für die Regression der Epoxidierungen in (A) und (B) wurden die ersten drei Datenpunkte jeweils nicht berücksichtigt). Die gepunkteten Linien zeigen die Produktzunahmen bei Annahme stöchiometrischer Pigmentumwandlungen innerhalb jedes Pools. Die gestrichelte Linie in (F) beschreibt die Zunahme von Cx als Sättigungsfunktion erster Ordnung.

Der zeitliche Verlauf der Epoxidierungen entsprach in allen drei Xanthophyllzyklus-Pools dem von Reaktionen erster Ordnung. Die Abnahme von Dtx (Abb. 3.16.A) war durch eine Kurvenregression nach Gleichung 3.2 beschreibbar, die Regression der Änderungen von Zx und Cx erfolgte analog. In

Tab. 3.9 sind die auf diese Weise ermittelten Parameter aus drei unabhängigen Experimenten aufgelistet. Die dort aufgeführte Ratenkonstante k_{AV} der Umwandlung von Ax zu Vx wurde durch numerische Iteration der folgenden Differentialgleichung ermittelt:

$$dAx / dt = k_{ZA} \cdot Zx - k_{AV} \cdot Ax \quad (3.3)$$

Wie aus Abb. 3.16.A,B ersichtlich ist, findet während der 45 min Schwachlicht eine rasche, praktisch stöchiometrische Umwandlung von Dtx in Ddx sowie von Vx über Ax zu Zx statt. Direkt zu Beginn der Schwachlichtphase läuft die Epoxidierung noch mit einer etwas niedrigeren Rate ab, weshalb die ersten drei Datenpunkte beider Datensätze, die einen Zeitraum von 2 min abdecken, nicht für die Kurvenregression berücksichtigt wurden. Ansonsten lassen sich die gemessenen Pigmententwicklungen sehr gut als Reaktionen erster Ordnung beschreiben. Der Vergleich der Ratenkonstanten der Epoxidierungen in Tab. 3.9 zeigt, daß Dtx, Zx und Ax mit vergleichbarer Kinetik epoxidiert werden. Die Ratenkonstanten der schnellsten ($Ax \rightarrow Vx$) und der langsamsten ($Dtx \rightarrow Ddx$) der drei Kinetiken unterscheiden sich in Experiment 1 um 35%, in Experiment 2 und 3 lediglich um 10%.

Tab. 3.9 *Parameter der Epoxidierungsreaktionen für die drei nach 6 h Starklicht akkumulierten Xanthophyllzyklus-Pools in P. tricornutum. Die Versuchsbedingungen entsprechen den Angaben zu Abb. 3.16.A-C. Für die Regression der Epoxidierungen von Dtx und Zx ergab sich in allen Fällen ein r^2 von 0,999; für die Epoxidierung von Cx war r^2 in Exp. 1 gleich 0,974 und in Exp. 3 gleich 0,998. Exp. = Experiment, Mw. = Mittelwert, n.a. = nicht auswertbar.*

a) Ratenkonstanten [min^{-1}]

Exp.	k_{TD} (Dtx→Ddx)	k_{ZA} (Zx→Ax)	k_{AV} (Ax→Vx)	k_{CE} (Cx→Cx _E)	k_{EX} (Cx _E →X)	k_{TD} / k_{ZA}
1	0,049	0,058	0,070	0,026	0,01	0,85
2	0,068	0,073	0,076	n.a.	n.a.	0,92
3	0,067	0,073	0,076	0,028	0,01	0,92
Mw.	0,061	0,068	0,074	0,027	0,01	0,90

b) Poolgrößen [$\text{mmol} \cdot \text{mol Chl a}^{-1}$]

Exp.	Dtx_N	Dtx_S	Ddx_N	Zx_N	Zx_S	Ax_N	Vx_N	Cx_N	Cx_S	CxE_N
1	37,6	247,4	8	10,9	118,2	9	10	0,3	7,1	14,4
2	52,8	277,8	9	16,6	106,3	12	15	n.a.	n.a.	n.a.
3	38,6	225,9	9	15,3	131,6	11	8	0,3	7,4	15,8

Die Epoxidierung von Cx zu CxE läuft dagegen deutlich langsamer ab. Bei der Umwandlung von Cx zu CxE fällt weiterhin auf, daß Cx zwar über den gesamten Meßzeitraum hinweg mit monoexponentieller Kinetik abnimmt, die CxE-Konzentration aber nur während der ersten 25 min eine entsprechende Zunahme zeigt und dann rasch sinkt. Offensichtlich setzt nach etwa 25 min ein weiterer Umwandlungsprozeß mit CxE als Substrat ein. Für eine genaue Bestimmung der Ratenkonstante k_x der Umwandlung von CxE in das unbekannte Produkt X reicht die Anzahl der in diesem Zeitfenster vorhandenen Datenpunkte nicht aus; die entsprechenden Angaben in Tab. 3.9 dienen deshalb nur zur Abschätzung der Größenordnung dieser Kinetik (auch hier wurde eine Reaktion erster Ordnung zugrunde gelegt). Aus Tab. 3.9.B wird ferner ersichtlich, daß etwa 90% der Pigmente Dtx, Zx und Cx, die während der Starklichtperiode akkumuliert wurden, für die im Schwachlicht einsetzende Epoxidierungsreaktion unmittelbar zur Verfügung stehen. Die Konzentration an den Epoxy-Xanthophyllen Ddx, Ax und Vx ist nach 6 h Starklicht sehr niedrig. Wie bereits aus Abb. 3.8.C deutlich wurde, liegt allein der CE-Pool noch zu über 50% in Form von CxE vor.

Auch die Deepoxidierungsreaktionen (Abb. 3.16.D-F) ließen sich als Reaktionen erster Ordnung beschreiben. Die Kurvenregression der Abnahme von Ddx bzw. Vx wurde entsprechend auf Grundlage von Gleichung 3.2 durchgeführt. Die Ratenkonstante k_{AZ} der Deepoxidierung von Ax zu Zx wurde durch numerische Iteration der folgenden Differentialgleichung ermittelt:

$$dAx / dt = k_{VA} \cdot Vx - k_{AZ} \cdot Ax \quad (3.4)$$

Die Regressionsergebnisse der Deepoxidierung aus drei unabhängigen Experimenten sind in Tab. 3.10 zusammengestellt. Bei Betrachtung der Ratenkonstanten fällt zunächst auf, daß Ddx um den Faktor 4 schneller deepoxidiert wird als Vx. Die Deepoxidierung von Ax zu Zx verläuft sogar etwa zehnmal schneller als die Bildung von Ax aus Vx. Dadurch ist im Gegensatz zur Epoxidierungsreaktion (Abb. 3.16.B) keine temporäre Akkumulation von Ax zu beobachten (Abb. 3.16.E). Weiterhin ist festzustellen, daß während der erneuten Starklichtinkubation mehr Dtx gebildet wird als anhand der Ddx-Abnahme berechnet (Abb. 3.16.D). Die Zunahme an Zx dagegen fällt geringer aus als erwartet (Abb. 3.16.E). Demnach findet parallel zur Deepoxidierung ein Übergang von Pigmenten des VAZ-Pools in den DT-Pool statt. Dabei ist neben der Umwandlung von Vx zu Ddx prinzipiell auch eine direkte Bildung von Dtx aus Ax denkbar.

Wie aus Abb. 3.16.F ersichtlich wird, steht auch der Abnahme an CxE keine entsprechende Cx-Zunahme gegenüber. Dies könnte bedeuten, daß das aus CxE gebildete Cx sofort in ein weiteres Pigment umgewandelt wird, bei dem es sich um Zx handeln könnte. Alternativ wäre denkbar, daß nur ein Teil des CxE zu Cx deepoxidiert und ein weiterer Teil in einer Konkurrenzreaktion zu einem anderen Xanthophyll umgesetzt wird. Diese Alternative ist aus zwei Gründen wahrscheinlicher. Zum einen sprechen die Pigmentänderungen in Abb. 3.16.C dafür, daß CxE schon während der vorangegangenen Schwachlichtphase als Vorstufe für ein weiteres Xanthophyll diene, während Cx allein zu CxE epoxidiert wurde. Zum anderen läßt sich die zeitliche Entwicklung der Cx-Konzentration in Abb. 3.16.F

unter Annahme einer sequentiellen Umwandlung $CxE \Rightarrow Cx \Rightarrow Zx$ nicht durch ein Modell mit definierten Ratenkonstanten beschreiben. Statt dessen müßte für die Umwandlung von Cx zu Zx zu Beginn der Starklichtphase eine hohe Umwandlungsrate angenommen werden, die dann schnell abnimmt.

Tab. 3.10 *Parameter der Deepoxidierungsreaktionen für die nach 6 h Starklicht akkumulierten Xanthophyllzyklus-Pools in P. tricornutum. Die Versuchsbedingungen entsprechen den Angaben zu Abb. 3.16.D-F. Für die Regression der Deepoxidierungen von Ddx und Vx ergaben sich r^2 -Werte von 0,998 bis 1,000. Exp. = Experiment, Mw. = Mittelwert.*

a) Ratenkonstanten [min^{-1}]

Exp.	k_{DT} (Ddx→Dtx)	k_{VA} (Vx→Ax)	k_{AZ} (Ax → Zx)	k_{EC} (CxE→Cx)	r^2	k_{EX} (CxE→X)	r^2	k_{DT} / k_{VA}
4	0,256	0,061	0,80	0,085	0,828	0,212	0,905	4,19
5	0,249	0,066	0,70	0,064	0,975	0,271	0,986	3,77
6	0,280	0,073	0,70	0,081	0,990	0,285	0,968	3,83
Mw.	0,262	0,066	0,73	0,077		0,256		3,93

b) Poolgrößen [$\text{mmol} \cdot \text{mol Chl a}^{-1}$]

Exp.	Ddx_N	Ddx_S	Dtx_N	Vx_N	Vx_S	Ax_N	Zx_N	CxE_N	CxE_S	CxE_X
4	46,6	208,6	54,2	13,6	89,9	16,7	18,5	11,1	1,4	2,1
5	44,0	206,6	43,5	19,0	92,4	12,1	16,6	10,6	1,5	2,9
6	42,6	198,6	46,7	11,4	94,5	14,5	16,4	10,2	1,6	2,8

Wird daher die zweite Alternative zugrunde gelegt, so läßt sich die CxE-Abnahme analog zu Gl. 3.1 durch folgende Formel beschreiben, die sich aus zwei Kinetiken erster Ordnung zusammensetzt:

$$CxE(t) = CxE_N + CxE_S \cdot \exp(-k_{EC} \cdot t) + CxE_X \cdot \exp(-k_{EX} \cdot t) \quad (3.5)$$

mit $CxE(t)$ = CxE-Menge zum Zeitpunkt t,

CxE_N = Nicht deepoxidierbarer Anteil an CxE,

CxE_S = Zu Cx deepoxidierbarer CxE-Anteil,

CxE_X = In unbekanntes Xanthophyll X umwandelbarer CxE -Anteil,

k_{EC}, k_{EX} = Ratenkonstanten der Deepoxidierung zu Cx bzw. der Umwandlung zu X.

Zur Bestimmung dieser Parameter aus den Meßdaten wurde zunächst eine Kurvenregression der Cx-Zunahme nach der folgenden Gleichung durchgeführt:

$$Cx(t) = Cx_N + CxE_S \cdot (1 - \exp(-k_{EC} \cdot t)) \quad (3.6)$$

mit $Cx(t)$ = Cx-Menge zum Zeitpunkt t ,
 Cx_N = Bereits zum Zeitpunkt t_0 vorhandene Cx-Menge,
 CxE_S = Zu Cx deepoxidierbarer CxE-Anteil,
 k_{EC} = Ratenkonstante der Deepoxidierung von CxE zu Cx.

Die auf diese Weise erhaltenen Größen CxE_S und k_{EC} wurden in Gl. 3.5 eingesetzt, um CxE_N , CxE_X und k_{CX} zu berechnen. Die resultierenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. 3.10 zu finden. Demnach liegt die Deepoxidierungsrate von CxE in der gleichen Größenordnung wie die von Vx. Allerdings werden nur etwa 10% des vorhandenen CxE zu Cx deepoxidiert, weitere 20% werden mit einer fast viermal schnelleren Kinetik zu einem anderen Xanthophyll umgewandelt. Etwa 70% des CxE scheinen an den Umwandlungsreaktionen nicht teilzunehmen.

2.1.3 Lichtintensitätsabhängigkeit der Deepoxidierungskinetiken nach 6 h Starklicht

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß der Lichtintensität auf die Deepoxidierungsgeschwindigkeit sowie den Deepoxidierungsgrad von Ddx und Vx verglichen. Diese Untersuchungen sollten zur Klärung der bereits in Kap. 1.8 aufgeworfenen Frage beitragen, ob die Deepoxidierungsreaktionen in den drei verschiedenen Xanthophyllzyklus-Pools in *P. tricornutum* vom gleichen Enzym oder von verschiedenen Isoformen katalysiert werden. Abb. 3.17 zeigt, daß mit Zunahme der Lichtintensität sowohl die Ratenkonstanten beider Deepoxidierungsreaktionen als auch der Deepoxidierungsgrad von Dtx und Vx parallel ansteigen. Für beide Pigmente zeigt sich zudem, daß der maximale Deepoxidierungsgrad von etwa 80% schon bei einer Lichtintensität von etwa 500 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ erreicht wird, während eine Sättigung der Ratenkonstanten erst ab einer PFD von etwa 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ eintritt.

Wie bereits aus Abb. 3.17.A ersichtlich wird, behalten die Ratenkonstanten der Deepoxidierung von Ddx und Vx über den gesamten untersuchten Lichtintensitätsbereich das schon zuvor bei einer PFD von 700 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tab. 3.10) ermittelte Verhältnis von etwa 4:1 bei. Noch deutlicher wird dies in Abb. 3.18, in der die Ratenkonstanten beider Deepoxidierungsreaktionen gegeneinander aufgetragen sind. Eine lineare Regression der Werte ergab, daß Ddx im Mittel um den Faktor 4,07 schneller deepoxidiert wird als Vx. Auch wenn dieser Befund nicht eindeutig beweisen kann, daß die Deepoxidierung von Ddx und Vx in *P. tricornutum* vom gleichen Enzym katalysiert wird, so spricht doch die parallele Zunahme der Ratenkonstanten beider Reaktionen mit steigender Lichtintensität für diese Annahme.

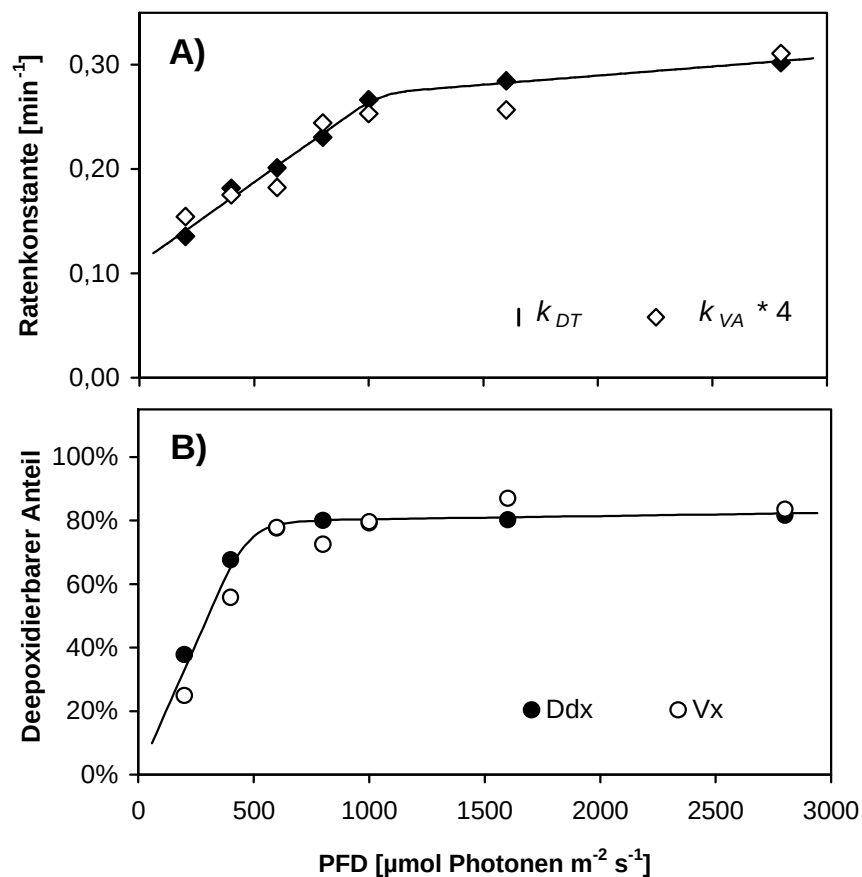


Abb. 3.17 Deepoxidierungsraten (A) und maximal deepoxidierbare Anteile (B) von Ddx und Vx in *P. tricornutum* in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Um für die Messungen ausreichende Mengen an Vx zu akkumulieren, wurden die Algen zunächst für 6 h mit HL2 ($1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) sowie weitere 45 min mit LL ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) belichtet (vgl. Abb. 3.16). Die Ratenkonstanten und der deepoxidierbare Anteil an Ddx bzw. Vx bei der jeweiligen PFD wurden durch Kurvenregression (Gl. 3.2) der nach 0, 2, 4, 7, 12 und 20 min Starklicht gemessenen Pigmentkonzentrationen ermittelt. Dabei lag r^2 für Ddx zwischen 0,998 und 1,000 und für Vx zwischen 0,995 und 1,000 (der Mittelwert von r^2 betrug für beide Pigmente 0,999). Die Ratenkonstanten der Deepoxidierung von Vx wurden mit dem Faktor 4 multipliziert, um sie direkt mit denen von Ddx vergleichen zu können.

Weitere Unterstützung erhält diese Hypothese durch die schon in Kap. 1.8 angesprochenen *in-vitro*-Untersuchungen von Yamamoto und Higashi (1978) an einer aus Salat (*Lactuca sativa*) angereicherten Vx-Deepoxidase. Obwohl Salat kein Ddx enthält, war die Deepoxidase in der Lage, exogenes Ddx fast zweieinhalb Mal schneller zu deepoxidieren als Vx, die Deepoxidierung von Ax erfolgte sogar mit etwa fünffacher Rate. Auch CxE wurde als Substrat akzeptiert und mit gleicher Rate deepoxidiert wie Vx. Die *in-vivo*-Deepoxidierungsraten der verschiedenen Epoxy-Xanthophylle, die nach 6 h Starklicht in *P. tricornutum* vorliegen (Tab. 3.10), zeigen demnach die gleiche Tendenz wie die der zuvor

geschilderten Vx-Deepoxidase aus Salat: Ddx wird hier viermal und Ax sogar zehnmals schneller deepoxidiert als Vx, während CxE und Vx praktisch die gleiche Deepoxidierungsrate aufweisen.

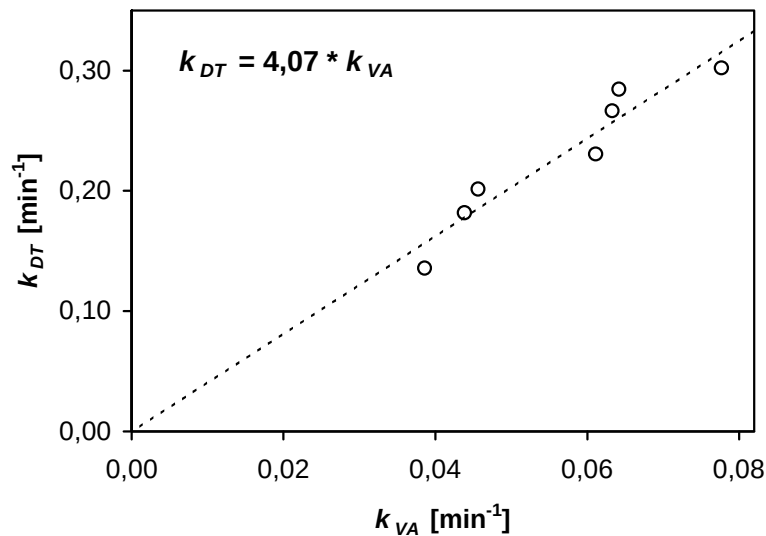


Abb. 3.18 Verhältnis der unter verschiedenen Starklichtintensitäten ermittelten Deepoxidierungsraten von Ddx und von Vx. Der Grafik liegen die bereits in Abb. 3.17.A dargestellten Ratenkonstanten zugrunde. Die Regressionsgerade weist einen erzwungenen Nulldurchgang auf.

2.2 Diskussion der Kinetiken und des Deepoxidierungsgrades der Xanthophyllzyklen

Bei den kinetischen Analysen des DT-Zyklus in *P. tricornutum* sind zunächst interessante Unterschiede festzustellen zwischen Algen, die zuvor länger an Schwachlicht adaptieren konnten, und Kulturen nach sechsstündiger Starklichtinkubation. Im letztgenannten Fall verliefen sowohl die Epoxidierung von Dtx als auch die Deepoxidierung von Ddx deutlich langsamer als zu Beginn der Starklichtinkubation. So halbierte sich die Deepoxidierungsrate (Tab. 3.7 und 3.10) von $0,500 \cdot min^{-1}$ auf $0,262 \cdot min^{-1}$, und die Ratenkonstante der Epoxidierung (Tab. 3.8 und 3.9) fiel sogar von $0,218 \cdot min^{-1}$ auf $0,061 \cdot min^{-1}$. Im Falle der Epoxidierung machten Arsalane et al. (1994) vergleichbare Beobachtungen an *P. tricornutum*. Dort zeigten die Algen nach 2 min Starklicht ($2000 \mu mol \text{ Photonen} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) im anschließenden Schwachlicht ($7,5 \mu mol \text{ Photonen} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) eine Epoxidierungsrate von etwa $0,15 \cdot min^{-1}$. Nach nur 35 min Starklicht wies die Epoxidase-Reaktion im nachfolgenden Schwachlicht allerdings bereits eine einstündige lag-Phase auf, um dann mit einer Rate von nur noch $0,013 \cdot min^{-1}$ einzusetzen. Wie die von den Autoren parallel gemessene Sauerstoffentwicklung der Algen zeigt, führte die halbstündige Starklichtphase bei den dort verwendeten Kulturen offensichtlich schon zu einer photoinhibitorischen Schädigung, da die Zellen im anschließenden Schwachlicht eine negative Sauerstoffbilanz aufwiesen, die auf eine sehr starke Atmung hindeutet. Die Epoxidase benö-

tigt als Cosubstrate sowohl molekularen Sauerstoff (Yamamoto und Chichester 1965, Hager 1967) als auch NADPH (Hager 1975, Siefermann & Yamamoto 1975a). Da die Algen bei Arsalane et al. (1994) nach der Starklichtphase zunächst praktisch keine Photosyntheseaktivität mehr zeigten, erscheint ein Mangel an einem oder beiden Cosubstraten in den Plastiden als Ursache der stark verzögerten Epoxidierung wahrscheinlich. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Turbidostatkulturen war nach Beendigung der sechsständigen Starklichtinkubation keine *lag*-Phase bei der Epoxidierung zu beobachten (Abb. 3.16), obwohl die Abnahme von Dtx und Zx erst nach etwa 2 min die maximale Geschwindigkeit erreichte (auf diese Beobachtung wird an späterer Stelle noch näher eingegangen). Als Ursache für die insgesamt langsamere Epoxidierung nach 6 h Starklicht wäre ebenfalls eine Unterversorgung der Epoxidase mit Cosubstraten denkbar, doch könnte auch eine direkte Regulation der Epoxidase vorliegen. Die Beantwortung dieser Frage erfordert weitere Untersuchungen, da über die *in-vivo*-Regulation der Epoxidase bisher praktisch nichts bekannt ist.

Auch hinsichtlich der verlangsamten Deepoxidierungsreaktion bieten sich die bereits für die Epoxidase genannten Erklärungsmöglichkeiten an. So könnte zum einen das Cosubstrat Ascorbat limitiert sein. Für die Vx-Deepoxidase aus Höheren Pflanzen wurde sowohl *in vitro* (Bratt et al. 1995) als auch *in vivo* (Leipner et al. 2000) eine Beschleunigung der Reaktion mit ansteigender Ascorbatkonzentration gezeigt. Einen vergleichbaren Effekt hätten eine verlangsamte Re-Reduktion des bei der Deepoxidierung gebildeten Dehydroascorbats durch Glutathion bzw. NADPH oder ein verringerter pH-Gradient über der Thylakoidmembran (vgl. Einleitung, Kap. 3, Abb. 1.3). Schließlich wäre auch eine partielle Endprodukthemmung der Deepoxidase durch die Mengen an Dtx bzw. Zx denkbar, die nach 6 h Starklicht sowie 45 min Schwachlicht noch in *P. tricornutum* vorhanden waren (siehe Abb. 3.16). Havir et al. (1997) beobachteten in einem *in-vitro*-Ansatz für die aus Spinat aufgereinigte Vx-Deepoxidase eine solche Endprodukthemmung bei Zugabe von Zx. Um die Ursache für die Verlangsamung der Xanthophyllzyklusreaktionen nach längerer Starklichtinkubation letztendlich klären zu können, sind ebenfalls weitere Untersuchungen erforderlich. Besonders der Einfluß längerer Starklichtperioden auf die Deepoxidase-Reaktion ist bisher noch nicht näher beleuchtet worden.

Hinsichtlich der Komplexität der Kinetiken lassen sich ebenfalls Unterschiede zwischen schwachlichtadaptierten und für 6 h mit Starklicht behandelten Kulturen feststellen. Zwar ließ sich die Epoxidierung von Dtx zu Ddx unabhängig von der Dauer der Starklichtinkubation als Reaktion erster Ordnung beschreiben, und auch die Epoxidierung der während der sechsständigen Starklichtphase akkumulierten Xanthophylle Zx und Cx verlief monoexponentiell. Die Deepoxidierungsreaktionen konnten jedoch nur nach der Starklichtperiode durch monoexponentielle Kinetiken beschrieben werden. Die an Schwachlicht adaptierten Algen dagegen zeigten mit Einsetzen des Starklichtes eine biexponentielle Abnahme von Ddx. Dabei betrug der schnell deepoxidierbare Ddx-Anteil ($k_{DT1} = 0,500 \cdot \text{min}^{-1}$) etwa 40% des Ddx-Pools, der langsam deepoxidierbare Anteil ($k_{DT2} = 0,072 \cdot \text{min}^{-1}$) weitere 20%, und die restlichen 40% – das entspricht etwa 65 mmol Ddx pro mol Chl a – waren zunächst nicht deepoxidierbar (Tab. 3.7).

In den bisherigen Untersuchungen von Xanthophyllzykluskinetiken wurden die Deepoxidierungsraten nur unmittelbar bei Einsetzen des Starklichtes bestimmt. Entsprechende Messungen von Arsalane et al. (1994) an *P. tricornutum* zeigten ebenfalls eine zweiphasige Zunahme von Dtx. Allerdings wurden dort keine Angaben über die parallelen Ddx-Änderungen gemacht, weshalb die langsame Phase der Dtx-Zunahme theoretisch auch auf eine Neusynthese dieses Pigmentes rückführbar sein könnte. Die kinetische Analyse der Pigmentänderungen wird zusätzlich durch die sehr geringe Zahl an Meßpunkten eingeschränkt. Gleiches gilt auch für die Versuche von Olaizola et al. (1994) an *P. tricornutum* sowie von Olaizola und Yamamoto (1994) an der Diatomee *Chaetoceros muelleri*, in denen für die Ddx-Abnahme nur eine Phase angegeben wurde. In beiden Arbeiten war für die Ddx-Abnahme eine Unterscheidung in mehrere Phasen auch aufgrund der relativ starken Streuung der Meßwerte nicht möglich (bei Olaizola et al. (1994) betrug r^2 für die schnelle Dtx-Zunahme zwischen 0,934 und 0,967). Im Falle des VAZ-Zyklus konnten Härtel et al. (1996) bei Messungen an Gerste (*Hordeum vulgare*) die Deepoxidierung von Vx in Wildtyp-Pflanzen mit ausreichender Genauigkeit durch eine monoexponentielle Kinetik beschreiben; in einer *chlorina*-Mutante mit stark reduziertem Gehalt an LHC II und LHC I jedoch wies die Vx-Abnahme einen biexponentiellen Verlauf auf. Dabei erfolgte die schnelle Abnahme mit einer Rate k von $0,35 \cdot \text{min}^{-1}$ und betraf 83% des Vx-Pools, die langsame Komponente hatte ein k von $0,04 \cdot \text{min}^{-1}$ und umfaßte lediglich 14% des Vx.

Kinetische Analysen höherer Genauigkeit lassen sich durch die zeitaufgelöste Messung der mit den Xanthophyllumwandlungen verbundenen Absorptionsänderung bei 505 nm (Yamamoto et al. 1972) erreichen. Bei entsprechenden Versuchen an isolierten Chloroplasten aus Salat (*Lactuca sativa*) konnten Siefermann und Yamamoto (1975b) die Vx-Abnahme während des Meßzeitraums von 15 min durch eine monoexponentielle Kinetik beschreiben. Pfündel und Dilley (1993) aber beobachteten während einer einstündigen Starklichtinkubation von Erbsenchloroplasten eine aus zwei exponentiellen Kinetiken zusammengesetzte Deepoxidierung von Vx. Die schnelle Phase mit einer Ratenkonstante von $0,284 \cdot \text{min}^{-1}$ umfaßte etwa 50%, die langsame mit einer Rate von $0,054 \cdot \text{min}^{-1}$ nochmals 25% der insgesamt vorhandenen Vx-Menge. 25% des Vx-Pools ($25\text{--}30 \text{ mmol} \cdot \text{mol Chl a}^{-1}$) wurden nicht deepoxidiert. Diese Verhältnisse kommen den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse recht nahe. Es bleibt zu klären, ob die langsame Phase in den anderen genannten Messungen aufgrund zu kurzer Beobachtungszeiträume oder eines zu kleinen Anteils an langsam deepoxidierbaren Xanthophyllen übersehen wurde. Bei zukünftigen Untersuchungen der Deepoxidationsreaktionen im Rahmen des Xanthophyllzyklus sollte deshalb dem möglichen Vorliegen von zwei Phasen stärkere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Bezüglich des maximalen Deepoxidierungsgrades von Ddx in Diatomeen wurde in bisherigen Messungen eine im Starklicht verbleibende Restmenge von 50 mmol Ddx pro mol Chl a in keinem Fall unterschritten. So detektierten für *P. tricornutum* Olaizola et al. (1994) nach 15minütiger Starklichtinkubation der Algen mit $1500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ noch gut 150 mmol Ddx pro mol Chl a, nach 2 h Starklicht war der Ddx-Gehalt auf etwa 100 mmol erniedrigt. Auch Casper-Lindley und Björkman

(1998) beobachteten nach 20minütiger Belichtung von *P. tricornutum* mit einer PFD von $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ noch einen Anteil von 100 mmol Ddx pro mol Chl a, während Arsalane et al. (1994) nach halbstündiger Starklichtbestrahlung der gleichen Algenart mit einer PFD von $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nur noch 50 mmol Ddx pro mol Chl a fanden. In *Nitzschia palea* betrug das Verhältnis nach 9 min Starklicht ($2000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ebenfalls nur noch 50 mmol Ddx pro mol Chl a (Willemoës und Monas 1991), in *Chaetoceros muelleri* nach 30 min Starklicht ($1500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dagegen noch etwa 120 mmol Ddx pro mol Chl a (Olaizola und Yamamoto 1994). Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Anteil von etwa 65 mmol Ddx pro mol Chl a (Abb. 3.15, Tab. 3.7) für *P. tricornutum* nach halbstündiger Inkubation mit $700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bewegt sich demnach im Rahmen der Ergebnisse der zuvor genannten Untersuchungen. Nach 6 h Starklicht hatte sich die Ddx-Menge jedoch auf 25 mmol pro mol Chl a erniedrigt (Abb. 3.16; vgl. auch Tab. 3.6) und lag damit deutlich unter den bisher gemessenen Werten. Demnach wird unter länger andauerndem Starklicht der größte Teil des Ddx in *P. tricornutum* für die Deepoxidierung zugänglich.

Welche Prozesse stehen nun hinter der biexponentiellen Umwandlung von Ddx in Dtx zu Beginn der Starklichtinkubation, und wodurch wird der Anteil an nicht deepoxidiertem Ddx reguliert? Während die schnelle Phase wahrscheinlich in erster Linie durch die Katalysegeschwindigkeit der Deepoxidase bestimmt wird, spiegelt die langsame Phase der Ddx-Deepoxidierung sicher nicht die Kinetik des Enzyms wider. Viel eher kann davon ausgegangen werden, daß ein Teil des Ddx erst unter länger anhaltender Starklichtinkubation für die Deepoxidase zugänglich wird und die langsame Phase die Kinetik dieses Prozesses wiedergibt. Nach aktuellem Erkenntnisstand zur Raumstruktur und dem Katalysemechanismus der Vx-Deepoxidase aus Höheren Pflanzen ist es sehr wahrscheinlich, daß nur frei in der Thylakoidmembran gelöste bzw. leicht von LHC-Komplexen ablösbare Epoxy-Xanthophylle für das Enzym zugänglich sind. Die aus dem klonierten Vx-Deepoxidase-Gen ermittelte Aminosäuresequenz weist die drei für Lipocaline typischen Motive auf (Bugos et al. 1998). Bei Lipocalinen handelt es sich um relativ kleine, lösliche Proteine, die häufig hydrophobe Moleküle binden (Flower 1996). Sie finden sich sowohl bei Eukaryoten als auch bei Bakterien. Trotz zum Teil sehr schwacher Gesamtsequenzidentität (< 20%) ist die 3D-Struktur der Lipocaline, die inzwischen von etwa zehn Proteinen vorliegt, hoch konserviert (Flower 1996). Es handelt sich um eine Faßform, die durch ein aus acht antiparallelen Strängen bestehendes β -Faltblatt gebildet wird. Eine Analyse der Proteinsequenz der Vx-Deepoxidase sagt das Vorhandensein entsprechender β -Faltblattbereiche vorher (Bugos et al. 1998). Die faßartige räumliche Struktur der Vx-Deepoxidase spielt bei der Substraterkennung vermutlich eine entscheidende Rolle. So ist die Vx-Deepoxidase zwar in der Lage, die Epoxidgruppen von linearen Xanthophyllen wie Violaxanthin oder Antheraxanthin abzuspalten. Doch stellt bereits *trans*-Neoxanthin, dessen der Epoxidgruppe gegenüberliegender Jononring aufgrund der angrenzenden kumulierten Doppelbindungen abgewinkelt ist, ein schlechtes Substrat dar, und 9'-*cis*-Neoxanthin wird überhaupt nicht deepoxidiert (Yamamoto und Higashi 1978). Diese

Befunde führten zu der Hypothese, daß das katalytische Zentrum der Vx-Deepoxidase am Boden des durch die β -Faltblattstränge gebildeten Fasses liegt und so für die Epoxidgruppen von gewinkelten Carotinoidmolekülen nicht erreichbar ist (Yamamoto und Higashi 1978, Bugos et al. 1998). Demnach kann davon ausgegangen werden, daß die an der lumenalen Seite der Thylakoidmembran anliegende Deepoxidase (Hager und Holocher 1994) ihr Substrat aus der Membran heraus in ihr katalytisches Zentrum ziehen muß, um die Deepoxidierung zu bewerkstelligen. Die Xanthophylle könnten folglich bei der Reaktion nicht an die LHC-Komplexe gebunden bleiben, und noch gebundene Pigmente müssen vor ihrer Deepoxidierung erst freigesetzt bzw. für das Enzym zugänglich werden.

Über die Lokalisation der Xanthophylle in den LHC-Proteinen existieren nur für den LHC II der Höheren Pflanzen genauere Vorstellungen. LHC II ist der bisher einzige Pigment-Protein-Komplex der LHC-Superfamilie, dessen Raumstruktur durch Elektronenkristallographie ermittelt werden konnte (Kühlbrandt und Wang 1991, Kühlbrandt et al. 1994). Da er sich zudem in Bakterien überexprimieren und anschließend durch Zugabe von Pigmenten *in vitro* rekonstituieren läßt (Paulsen et al. 1990, Cammarata und Schmidt 1992), eröffnete dies auch die Möglichkeit, die Pigmentbindungseigenschaften des LHC II durch Variation des Xanthophyllangebotes oder nach gezieltem Austausch einzelner Aminosäuren zu studieren. Danach ist der LHC II in der Lage, bis zu vier Xanthophylle zu binden. Zwei Xanthophyllbindungsstellen (L1, L2) binden mit sehr hoher Affinität Lutein (Croce et al. 1999b, Hobe et al. 2000). Sie entsprechen höchstwahrscheinlich den beiden bereits bei den Raumstrukturanalysen (Kühlbrandt et al. 1994) identifizierten Bindungsstellen im zentralen Bereich des LHC II, der von zwei sich kreuzenden, transmembranen α -Helices gebildet wird. Den dort gebundenen Xanthophyllen wird eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung des Komplexes zugeschrieben. Eine dritte, periphere Bindungsstelle (N1) wird mit hoher Selektivität durch 9'-cis-Neoxanthin besetzt (Croce et al. 1999a, 1999b, Hobe et al. 2000). Schließlich deuten die Versuche von Ruban et al. (1999) auf einen vierten, ebenfalls peripheren Proteinbereich, der bevorzugt Vx bindet. Allerdings dissoziiert Vx bei der Isolation von LHC II sehr leicht vom Komplex ab, was für eine relativ lockere Bindung dieses Xanthophylls spricht (Ruban et al. 1999). In dieser Bindungsnische lokalisiertes Vx ist demnach auch relativ leicht für eine Deepoxidierung mobilisierbar, wie ein maximaler Deepoxidierungsgrad von bis zu 80% in den Versuchen von Ruban et al. (1999) belegt.

Dagegen sollte die Beteiligung der in den zentralen Bindungsstellen L1 und L2 lokalisierten Xanthophylle an der Stabilisierung der LHC II-Struktur einer möglichen Freisetzung dieser Pigmente aus dem Komplex eher entgegenstehen. Darauf deuten auch erste Ergebnisse zur Deepoxidierung von Vx in einer Pigmentmutante der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, die nicht mehr in der Lage ist, β,ϵ -Carotinoide zu synthetisieren, und die daher auch kein Lutein mehr besitzt. Der Ausfall von Lutein wird durch einen deutlich erhöhten Vx-Gehalt der Mutante kompensiert (Niyogi et al. 1997b). Offensichtlich ist in den Xanthophyllbindungsstellen L1 und L2 des LHC II das Lutein durch Vx ersetzt worden. Dieser Austausch ist prinzipiell möglich, wie die erfolgreiche *in-vitro*-Rekonstitution von LHC II mit Vx als alleinigem Xanthophyll zeigt (Croce et al. 1999b, Hobe et al. 2000). Unter Stark-

lichtinkubation wird in der Mutante zwar deutlich mehr Vx zu Zx deepoxidiert als im Wildtyp, doch besitzt sie nach 15 min Starklicht noch fast die dreifache Menge an nicht deepoxidiertem Vx (Niyogi et al. 1997b). Dieser Befund könnte dahingehend interpretiert werden, daß die in L1 und L2 gebundenen Vx-Moleküle der Deepoxidierung nicht oder zumindest nicht kurzfristig zur Verfügung stehen. Ein Vergleich mit den Pigmentbindungseigenschaften der minoren LHC-Komplexe CP29 und CP26 läßt es aber möglich erscheinen, daß zur Stabilisierung nur eine der beiden zentralen Bindungsstellen besetzt bleiben muß. In beiden minoren LHC-Komplexen ist nur in einer dieser Bindungsnischen (L1) Lutein lokalisiert, in der zweiten statt dessen vermutlich Vx gebunden. CP29 ist auch bei unbesetztem L2 relativ stabil (Bassi et al. 1999), und in beiden minoren LHC-Komplexen wird im Starklicht bis zu 50% des Vx gegen Zx ausgetauscht (Ruban et al. 1999).

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, legt ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der FCP-Komplexe in Kieselalgen mit der Sequenz des LHC II aus Höheren Pflanzen eine sehr ähnliche Raumstruktur dieser Komplexe nahe (Green und Kühlbrandt 1995). Besonders im Bereich der beiden im LHC II eng miteinander assoziierten α -Helices finden sich viele konservierte Aminosäuren (Durnford et al. 1996), so daß auch die beiden zentralen Xanthophyllbindungsstellen des LHC II in den FCP-Komplexen konserviert sein könnten. Sofern in diesen Bindungsnischen nun Ddx die Rolle von Lutein übernimmt, wären die entsprechenden Ddx-Moleküle einer schnellen Deepoxidierung wahrscheinlich nicht zugänglich. Allerdings könnten die entsprechenden Positionen im FCP auch durch Fx besetzt und Ddx vergleichbar dem Vx im LHC II peripher gebunden sein. Hierfür spricht der Umstand, daß zumindest aus Braunalgen wiederholt FCP-Komplexe isoliert wurden, die neben Chl a und Chl c Fx als einziges Xanthophyll aufwiesen (Caron et al. 1995, De Martino et al. 1997, Pascal et al. 1998). Aber auch die Zugänglichkeit von peripher an die FCP-Komplexe gebundenem Ddx könnte durch die Aggregation mehrerer Komplexe zunächst limitiert sein. Hinweise für das Vorliegen von LHC-Suprakomplexen existieren sowohl für die Höheren Pflanzen (Boekema et al. 1999a, 1999b, Garab und Mustárdy 1999) als auch für Diatomeen (Gugliemelli 1984) und Braunalgen (Katoh et al. 1989, Katoh und Ehara 1990). Einen Zusammenhang zwischen der limitierten Zugänglichkeit von Epoxy-Xanthophyllen für die Deepoxidase und der Organisation der LHC-Komplexe in der Thylakoidmembran legen auch Versuche an Pflanzen mit stark reduziertem LHC-Gehalt nahe. So wiesen z.B. Chl b-Mangelmutanten von Weizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) im Starklicht einen Vx-Deepoxidierungsgrad von nahezu 100% auf (Falbel et al. 1994, Härtel et al. 1996); gleiches wurde an Gerste sowie Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*) nach Anzucht in intermittierendem Licht beobachtet (Jahns 1995, Härtel et al. 1996, Färber und Jahns 1998).

Anhand der bisherigen Ausführungen wäre also eine Erklärungsmöglichkeit für die zweiphasige Deepoxidierung von Ddx, die in schwachlichtadaptierten Kulturen von *P. tricornutum* beobachtet wurde, daß die schnelle Phase einem leicht mobilisierbaren Anteil von Ddx entspricht, der unter Umständen nur peripher an die FCP-Komplexe gebunden ist. Im Zuge einer länger andauernden Starklichtphase würde dann möglicherweise eine Umorganisation von FCP-Suprakomplexen stattfin-

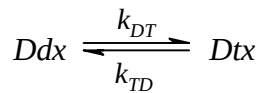
den, die zur schrittweisen Freisetzung und Deepoxidierung weiterer Ddx-Moleküle führt. Der nach 6 h Starklicht verbleibende Ddx-Anteil könnte in FCP-Bereichen gebunden sein, die eine Freisetzung nicht erlauben.

Eine andere Situation liegt im Falle der Deepoxidierungskinetiken in *P. tricornutum* nach sechsständiger Starklichtinkubation vor. Wie die kinetischen Analysen der Deepoxidierung bei einer PFD von $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zeigen, lassen sich nun alle Deepoxidierungsreaktionen mit nur einer exponentiellen Kinetik beschreiben, und die Menge an nicht deepoxidierbarem Ddx (Ddx_N) ist laut Kurvenregression deutlich geringer als zu Beginn der Starklichtphase (vgl. Tab. 3.7 mit Tab. 3.10). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß nur noch maximal zwei Ddx-Pools vorliegen. Ein sehr hoher Anteil an Ddx ist direkt für die Deepoxidase zugänglich, der nicht deepoxidierbare Rest beträgt weniger als 20%; gleiches gilt auch für Vx. Weitere Informationen lassen sich aus den Daten zur Lichtabhängigkeit des Deepoxidierungsgrades von DT-Pool und VAZ-Pool gewinnen (Kap. 2.1.3). Wie Abb. 3.17 zeigt, steigt der Deepoxidierungsgrad in beiden Pools mit zunehmender Lichtintensität an, wobei er seinen Maximalwert jedoch schon bei einer deutlich niedrigeren PFD erreicht als die zugehörigen Ratenkonstanten. Die gleiche Beobachtung machten bereits Siefermann und Yamamoto (1974) an einer Chloroplastenpräparation aus Salat (*Lactuca sativa*). Sie schlossen aus dem unterschiedlichen Lichtsättigungsverhalten von Deepoxidierungsgrad und Ratenkonstanten, daß beide Parameter durch unterschiedliche Faktoren kontrolliert werden (Siefermann und Yamamoto 1975b). Wie im Verlauf der folgenden Ausführungen deutlich werden wird, lassen sich die differierenden PFD-Abhängigkeiten beider Parameter prinzipiell aber auch durch eine ansteigende Deepoxidaseaktivität vor dem Hintergrund einer konstant ablaufenden Epoxidase-Reaktion erklären.

Der bereits mehrfach angesprochene hohe Deepoxidierungsgrad von DT- und VAZ-Pool in *P. tricornutum* nach 6 h Starklicht zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt ein sehr hoher Anteil an Ddx und Vx für die Deepoxidase-Reaktion zugänglich ist (vgl. auch Tab. 3.5). Im nachfolgenden Schwachlicht setzt die Epoxidierung von Dtx und Zx praktisch unmittelbar ein, doch wird die maximale Epoxidierungsrate erst mit etwa zweiminütiger Verzögerung erreicht (Abb. 3.16). Diese Verzögerung könnte prinzipiell auf zwei Arten erklärt werden. Eine Möglichkeit bestünde darin, daß die Epoxidase während der Starklichtperiode inaktiviert wurde und die Verzögerung ihrer Aktivierungskinetik im nachfolgenden Schwachlicht entspricht. Alternativ könnte die Epoxidase auch während der 6 h Starklicht aktiv geblieben sein und die Verzögerung durch eine abklingende Restaktivität der Deepoxidase erklärt werden (Jahns 1995). Zwar folgert einerseits Jahns (1995) aus Experimenten an Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*), daß eine Epoxidase-Aktivität unter extremen Starklichtbedingungen (1700 bis $2500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) unwahrscheinlich sei. Auf der anderen Seite deuten aber eine Reihe von Untersuchungen auf eine parallele Aktivität von Deepoxidase und Epoxidase zumindest unter moderatem Starklicht (200 bis $400 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) hin (Siefermann 1972, Siefermann und Yamamoto 1975a, Gilmore et al. 1994, Jahns 1995, Goss et al. 1998). Unter der bereits in Kap. 1.8

diskutierten Voraussetzung, daß die acetylenische Gruppe in Ddx bzw. Dtx nur über eine Epoxidgruppe als Zwischenstufe gebildet werden kann (siehe Kap. 1.8), ist auch für *P. tricornutum* eine unter Starklicht aktive Epoxidase zu fordern, da der DT-Pool in den Algen selbst bei hoher Starklichtintensität noch zunimmt (Abb. 3.9).

Die in Kap. 2.1 durchgeführten kinetischen Analysen der Deepoxidierungsreaktionen in *P. tricornutum* basierten alle auf der Annahme, daß im Starklicht die Rückreaktion der Epoxidierung mit vernachlässigbarer Rate stattfindet. Doch lassen sich die Meßdaten auch auf Basis der alternativen Annahme auswerten, daß in *P. tricornutum* nach 6 h Starklichtinkubation alle Epoxy-Xanthophylle des DT- und des VAZ-Pools für die Deepoxidase ohne Einschränkung zugänglich sind, jedoch die Epoxidase im Starklicht mit der gleichen Umsatzrate arbeitet wie im Schwachlicht, also konstitutive Aktivität aufweist. Die kinetische Analyse des DT-Zyklus basiert nun also auf dem folgenden Modell:



In diesem Modell wird die Änderung der Ddx-Konzentration mit Einsetzen des Starklichtes durch die folgende Gleichung beschrieben (Herleitung in Anhang C):

$$Ddx(t) = Ddx(t_0) \cdot (1 - k_{DT}/(k_{DT} + k_{TD}) \cdot (1 - \exp(-t \cdot (k_{DT} + k_{TD})))) \quad (3.7)$$

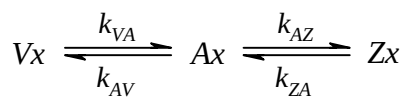
mit $Ddx(t)$ = Ddx-Menge zum Zeitpunkt t,

$Ddx(t_0)$ = Ddx-Menge zu Beginn der Starklichtinkubation.

Der im Starklicht maximal verbleibende Prozentanteil von Ddx am DT-Pool (Ddx_G [%]) ist dann allein durch das Verhältnis der Ratenkonstanten von Deepoxidierung und Epoxidierung bestimmt und berechnet sich zu:

$$Ddx_G [\%] = k_{TD} / (k_{TD} + k_{DT}) \quad (3.8)$$

Analog erfolgt die kinetische Analyse der Reaktionen im Rahmen des VAZ-Zyklus nach dem Modell:



Die Konzentrationsänderungen der drei Pigmente Vx, Ax und Zx im Starklicht lassen sich dabei durch das folgende System von Differentialgleichungen beschreiben:

$$dV_x / dt = k_{AV} \cdot Ax - k_{VA} \cdot V_x \quad (3.9)$$

$$dAx / dt = k_{VA} \cdot V_x + k_{ZA} \cdot Zx - (k_{AV} + k_{AZ}) \cdot Ax \quad (3.10)$$

$$dZx / dt = k_{AZ} \cdot Ax - k_{ZA} \cdot Zx \quad (3.11)$$

Sofern die Ratenkonstanten in den Gleichungen 3.9 bis 3.11 ermittelt worden sind, läßt sich aus ihnen der im Starklicht nach Einstellung des Deepoxidations-/Epoxidationsgleichgewichtes verbleibende Prozentanteil von Vx ($V_{xG} [\%]$) nach der folgenden Gleichung berechnen (Herleitung in Anhang C):

$$V_{xG} [\%] = (k_{ZA} \cdot k_{AV}) / (k_{AZ} \cdot k_{VA} + k_{ZA} \cdot k_{VA} + k_{ZA} \cdot k_{AV}) \cdot 100 \quad (3.12)$$

Im folgenden wurde nun der Datensatz, der den Abb. 3.17 und 3.18 zugrunde lag, nach den o.g. kinetischen Modellen ausgewertet. Dabei wurde angenommen, daß die Epoxidase die Substrate Dtx, Zx und Ax unabhängig von der Lichtintensität mit einer Rate von $0,06 \cdot \text{min}^{-1}$ umsetzt und daß die Deepoxidierungsrate k_{AZ} immer den zehnfachen Wert der Rate k_{VA} aufweist (vgl. Tab. 3.9). Die Bestimmung der in Abb. 3.19.A dargestellten Ratenkonstanten k_{DT} erfolgte durch Regression der Meßdaten nach Gl. 3.7 (Berechnung unter Verwendung des Programms TableCurve von SPSS Inc., Chicago); die Werte für k_{VA} wurden durch numerische Iteration der Änderungen von Vx, Ax und Zx mittels des Differentialgleichungssystems 3.9-3.11 bei einer Schrittweite von 0,03 min bestimmt (Durchführung im Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 von MICROSOFT). Unter Verwendung dieser Ratenkonstanten erfolgte mittels der Gl. 3.8 bzw. 3.12 die Berechnung des Deepoxidierungsgrades von Ddx bzw. Vx in Abhängigkeit von der Lichtintensität.

Wie die in Abb. 3.19 dargestellten Ergebnisse dieser Berechnungen verdeutlichen, ließe sich das unterschiedliche Lichtsättigungsverhalten von Ratenkonstanten und Deepoxidierungsgrad der beiden Xanthophyllzyklen in *P. tricornutum* im Prinzip auch allein auf Basis einer parallelen Aktivität von Deepoxidase und Epoxidase beschreiben; das Postulat eines weiteren, speziell den Deepoxidierungsgrad der beiden Xanthophyllzyklus-Pools regulierenden Faktors wäre in diesem Fall nicht erforderlich. Auch der im Starklicht verbleibende Rest an Ddx bzw. Vx ließe sich so ohne die Annahme erklären, daß diese Pigmente für die Deepoxidase nicht zugänglich sind. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Alternativen erfordert weitere Untersuchungen, da zunächst nachzuweisen bleibt, daß die Epoxidase in *P. tricornutum* unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Starklichtbedingungen auch tatsächlich aktiv ist.

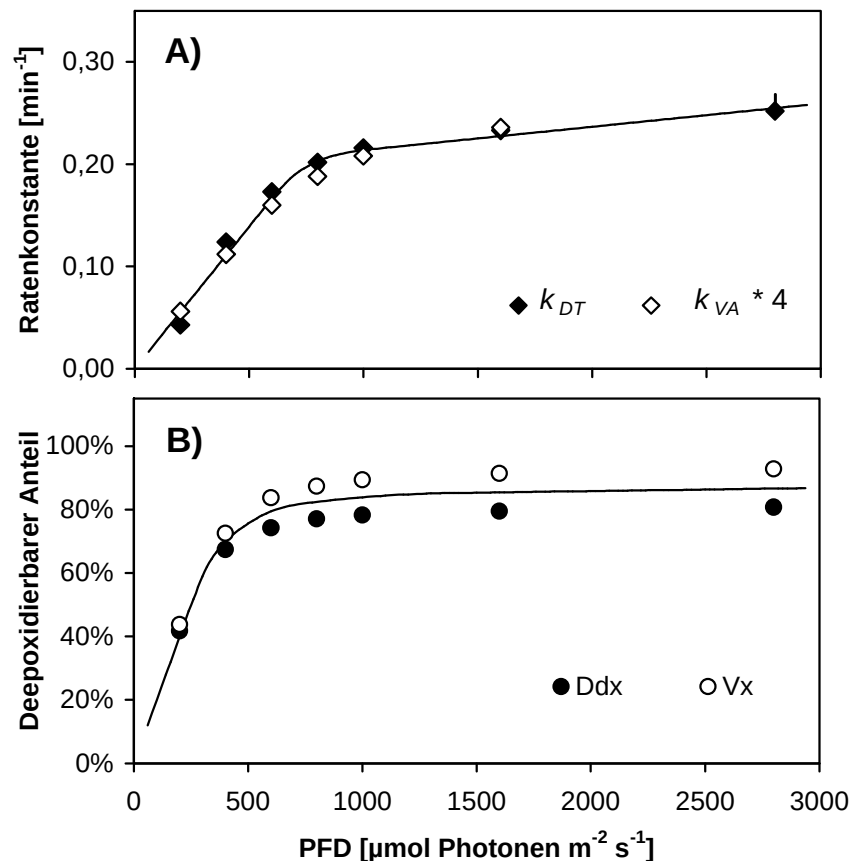


Abb. 3.19 Deepoxidierungsraten (A) und maximal deepoxidierbare Anteile (B) von Ddx und Vx in *P. tricornutum* in Abhängigkeit von der Lichtintensität unter der Annahme einer konstitutiven Epoxidierungsreaktion mit den Ratenkonstanten $k_{TD} = k_{ZA} = k_{AV} = 0,06 \cdot \text{min}^{-1}$. Den Berechnungen liegt derselbe Datensatz zugrunde wie in Abb. 3.17. Die Bestimmung von k_{DT} erfolgte durch Regression der Meßdaten nach Gl. 3.7, dabei lag r^2 zwischen 0,986 und 0,999 mit einem Mittelwert von 0,995. k_{VA} wurde durch numerische Iteration des Differentialgleichungssystems 3.9-3.11 ermittelt. Alle in (A) dargestellten Werte von k_{VA} wurden mit dem Faktor 4 multipliziert, um sie direkt mit denen von k_{DT} vergleichen zu können. Die Berechnung der deepoxidierten Anteile von Ddx und Vx in (B) erfolgte nach Gl. 3.8 bzw. Gl. 3.12 unter Verwendung der Ratenkonstanten aus (A) sowie der Annahme, daß $k_{AZ} = 10 \cdot k_{VA}$ beträgt.

Der Vergleich von Abb. 3.17.A und 3.19.A zeigt ferner, daß die alternative Auswertung zu einer Erniedrigung der Ratenkonstanten der Deepoxidierung von Ddx und Vx führt, die um so stärker ausfällt, je kleiner die PFD ist. Dadurch verläuft in Abb. 3.19.A die lineare Extrapolation der Meßpunkte für kleine Lichtintensitäten durch den Ursprung und entspricht damit der Erwartung einer bei fehlendem pH-Gradient inaktiven Deepoxidase. Sofern die Deepoxidase-Aktivität jedoch allein über den pH-Wert im Thylakoidlumen reguliert würde, sollte der bei 200 und 400 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ zu erwartende pH-Gradient über der Thylakoidmembran eigentlich bereits eine höhere Aktivität der Deepoxidase zur Folge haben, wie auch *in-vitro*-Versuche an Thylakoiden von *P. tricornutum* nahelegen (Jakob, Goss und Wilhelm; persönliche Mitteilung). Daher scheint eine Beteiligung weite-

rer Faktoren an der Regulation der Deepoxidase-Aktivität wahrscheinlich, hier wäre besonders die Konzentration des Deepoxidase-Cosubstrates Ascorbat im Thylakoidlumen zu nennen (Bratt et al. 1995).

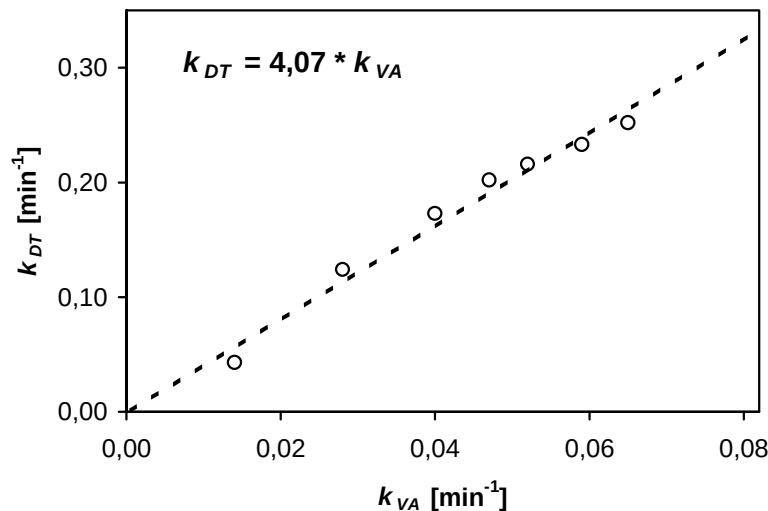


Abb. 3.20 Verhältnis der bei verschiedenen Starklichtintensitäten unter der Annahme einer konstitutiven Epoxidierungsreaktion ermittelten Deepoxidierungsraten von Ddx und von Vx. Der Grafik liegen die bereits in Abb. 3.19.A dargestellten Ratenkonstanten zugrunde. Die Regressionsgerade weist einen erzwungenen Nulldurchgang auf.

Die lineare Korrelation zwischen den Ratenkonstanten der Deepoxidierung von Ddx und von Vx bleibt jedoch auch unter der Annahme einer parallelen Epoxidase-Aktivität erhalten, wie Abb. 3.20 illustriert. Der Vergleich mit Abb. 3.18 zeigt, daß das Verhältnis beider Ratenkonstanten unverändert geblieben ist. Die zuvor geäußerte Hypothese, daß Ddx und Vx in *P. tricornutum* durch das gleiche Enzym deepoxidiert werden, erfährt demnach keine Einschränkung, wenn der kinetischen Analyse eine konstitutive Epoxidase-Aktivität zugrunde gelegt wird.

2.3 Kinetiken der Umwandlungen von Violaxanthin in Diadinoxanthin und von Diadinoxanthin in Fucoxanthin

Wie bereits in Kap. 1.7 gezeigt worden ist, wird das in *P. tricornutum* während der Starklichtphase akkumulierte Zx im anschließenden Schwachlicht über Vx zu Ddx und weiter zu Fx umgewandelt. Da sich unter den hier gewählten Bedingungen in den Algen beträchtliche Mengen an Vx anreichern ließen, eröffnete dies die Möglichkeit, auch die Umwandlungsraten von Vx zu Ddx und von Ddx nach Fx zu bestimmen. Um die Analyse der Pigmentänderungen zu erleichtern, wurde den Algenkulturen unmittelbar nach der Starklichtphase Norflurazon zugesetzt, wodurch sich eine Neusynthese von Carotinoiden unterbinden ließ. Neben mehreren Experimenten an Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* wurde ergänzend auch ein Versuch an einer Batchkultur der Kieselalge *Cyclotella meneghiniana* durchgeführt.

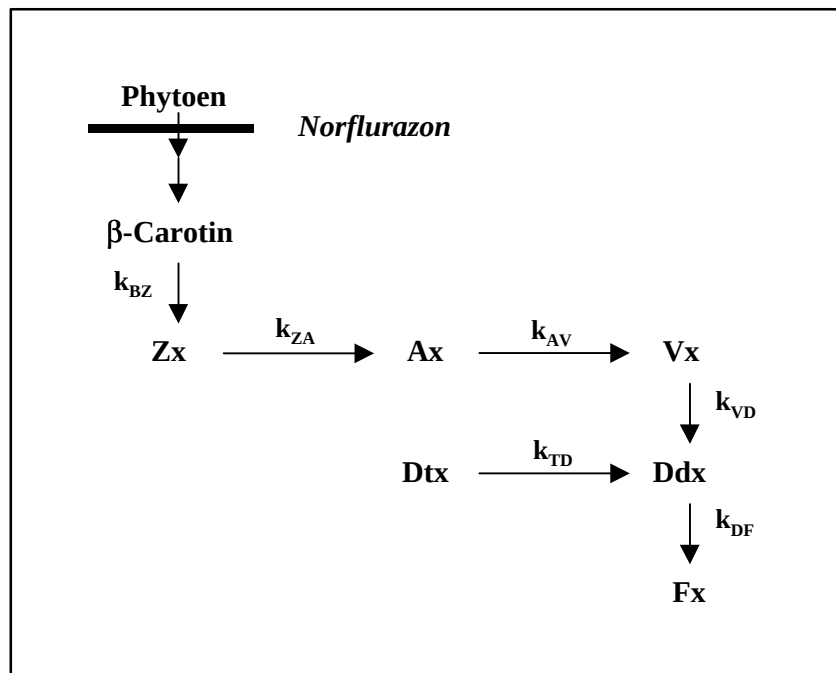


Abb. 3.21 Schema der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen, auf dessen Grundlage die Kinetiken der Umwandlung von Vx zu Ddx und von Ddx zu Fx analysiert wurden. Zur Beschreibung der Konzentrationsänderungen der Pigmente wurden die folgenden Differentialgleichungen verwendet (Car = *b*-Carotin):

$$\frac{d\text{Car}}{dt} = -k_{BZ} \cdot \text{Car} \quad (3.13)$$

$$\frac{dZx}{dt} = k_{BZ} \cdot \text{Car} - k_{ZA} \cdot Zx \quad (3.14)$$

$$\frac{dAx}{dt} = k_{ZA} \cdot Zx - k_{AV} \cdot Ax \quad (3.15)$$

$$\frac{dVx}{dt} = k_{AV} \cdot Ax - k_{VD} \cdot Vx \quad (3.16)$$

$$\frac{dDdx}{dt} = k_{VD} \cdot Vx + k_{TD} \cdot Dtx - k_{DF} \cdot Ddx \quad (3.17)$$

$$\frac{dFx}{dt} = k_{DF} \cdot Ddx \quad (3.18)$$

Die Analyse der Kinetiken erfolgte auf der Grundlage des bereits in Abb. 3.14 postulierten Biosyntheseschemas von Xanthophyllen in *P. tricornutum*. Abb. 3.21 weist jedem der Reaktionsschritte eine Ratenkonstante zu. Unter der Annahme, daß sich alle Pigmentumwandlungen in erster Näherung als Reaktionen erster Ordnung beschreiben lassen, können die zeitabhängigen Konzentrationsänderungen der Xanthophylle durch den Satz an Differentialgleichungen ausgedrückt werden, der in der Legende zu Abb. 3.21 angegeben ist. Die Ermittlung der Ratenkonstanten aus den einzelnen Experimenten erfolgte durch numerische Iteration der Pigmentänderungen mittels des Differentialgleichungssystems bei einer Schrittweite von 1 min (für die Berechnungen wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 von MICROSOFT verwendet).

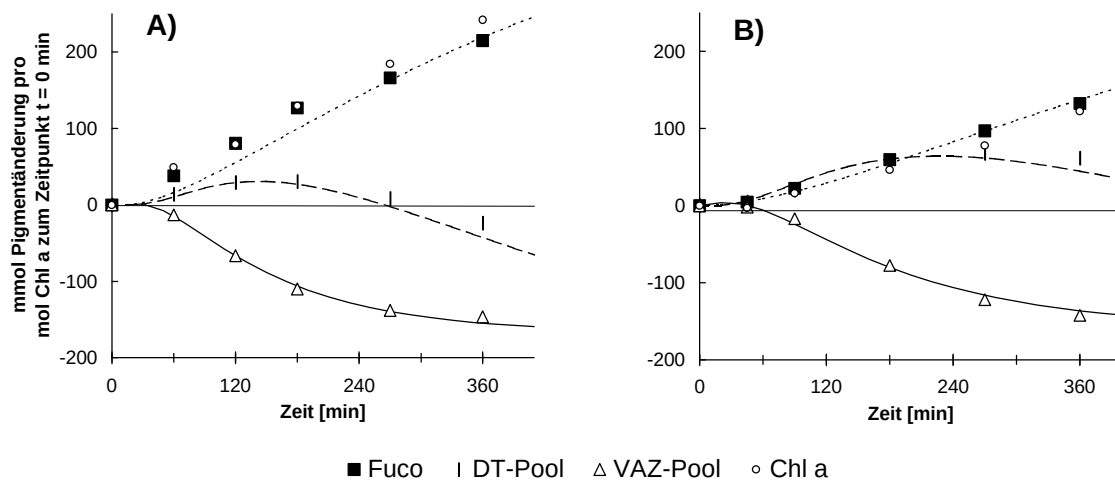


Abb. 3.22 Kinetik der Pigmentänderungen von VAZ- und DT-Pool sowie von Fx in *P. tricornutum* im LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) nach 6 h Inkubation (A) mit HL1 ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) oder (B) mit HL2 ($1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). In beiden Fällen wurde unmittelbar nach Ende der HL-Phase Norflurazon (Endkonzentration $5 \mu\text{M}$) zugegeben. Alle Pigmentänderungen sind auf den Chl a-Gehalt der Algen zu Beginn der LL-Inkubation bezogen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die Summen der Pigmente jedes der beiden Xanthophyllzyklen dargestellt. Auch die Änderungen von b-Carotin sind nicht dargestellt, da dieses während des Meßzeitraumes nur eine geringe Abnahme zeigte. Die Gesamtmenge an Carotinoiden blieb während des Experimentes ebenfalls praktisch unverändert (nicht gezeigt). Die Kurven der Änderungen von VAZ-Pool (durchgezogen), DT-Pool (gestrichelt) und Fx (gepunktet) sind das Ergebnis einer numerischen Iteration mittels der Differentialgleichungen 3.13 bis 3.18.

Repräsentative Messungen der Pigmentänderungen in *P. tricornutum* im Anschluß an 6 h Starklicht gibt Abb. 3.22 wieder. In der Grafik sind die Pigmente des DT- und des VAZ-Zyklus der besseren Übersichtlichkeit halber jeweils zusammengefaßt. Wie bereits in Abb. 3.16 gezeigt wurde, setzt mit Beginn der Schwachlichtinkubation eine schnelle Epoxidierung von Zx zu Ax und Vx ein, so daß der Wechsel der Pigmente des VAZ-Zyklus in den DT-Zyklus praktisch ausschließlich über Vx erfolgt. Ebenfalls in Abb. 3.22 grafisch dargestellt sind die Ergebnisse der numerischen Iterationen; die daraus resultierenden Ratenkonstanten k_{VD} und k_{DF} finden sich in Tab. 3.11. Untersucht wurden zwei Turbidostatkulturen bei einem täglichen Belichtungsprogramm von 6 h Starklicht und 18 h Schwachlicht, wobei die eine Kultur (Abb. 3.22.A) während der Starklichtphase bei einer PFD von $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL1) inkubiert wurde, die andere (Abb. 3.22.B) bei $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL2). Die unter HL1 inkubierte Kultur zeigte während der Starklichtphase eine stärkere Akkumulation des DT-Pools (Tab. 3.11) und im nachfolgenden Schwachlicht eine größere Zunahme an Chl a und an Fx (Abb. 3.22). Die Ratenkonstanten der Umwandlungen von Vx in Ddx und von Ddx zu Fx unterscheiden sich jedoch nur unwesentlich, da die höhere Fx-Zunahme nach HL1 aus einem entsprechend größeren DT-Pool gespeist wurde. Dadurch wird die Umwandlung von Ddx in Fx nach 6 h HL1

(Abb. 3.22.A) deutlicher sichtbar als nach HL2, während sich die Umwandlung von Vx zu Ddx besser nach Belichtung der Algen mit HL2 (Abb. 3.22.B) erkennen läßt.

Tab. 3.11 *Parameter der Umwandlung von Vx zu Ddx und von Ddx zu Fx in P. tricornutum nach 6 h Starklicht. Die Versuchsbedingungen entsprechen den Angaben zu Abb. 3.22. Die Ratenkonstanten sind in $[\text{min}^{-1}]$ angegeben. Die Pigmentkonzentrationen wurden am Ende der Starklichtphase bestimmt und sind in $[\text{mmol} \cdot \text{mol Chl a}^{-1}]$ angegeben. Exp. = Experiment.*

Exp.	Starklichtphase	k_{VD}	k_{DF}	VAZ-Pool	DT-Pool	Fx
1	HL1	0,011	0,0022	144	295	576
2	HL1	0,009	0,0024	167	281	566
3	HL2	0,008	0,0022	172	174	538
4	HL2	0,008	0,0020	168	187	547
Mittelwert:		0,009	0,0022			

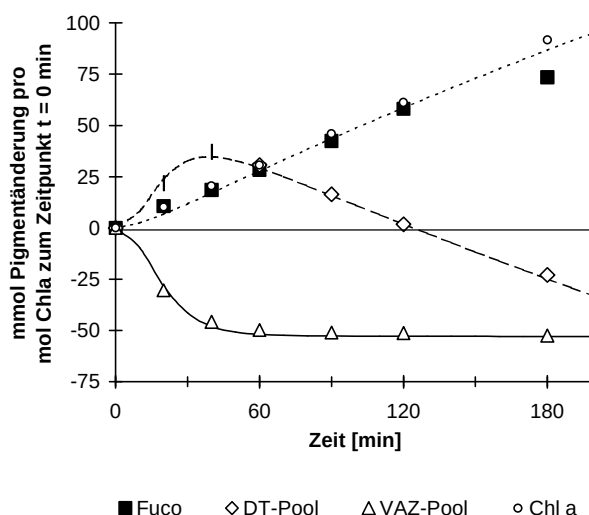


Abb. 3.23 *Kinetik der Pigmentänderungen von VAZ- und DT-Pool sowie von Fx in C. meneghiniana im LL ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) nach 6 h Inkubation mit HL2 ($1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Unmittelbar nach Ende der HL-Phase wurde Norflurazon (Endkonzentration $5 \mu\text{M}$) zugegeben (für weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 3.22). Die Pigmentmengen in mmol pro mol Chl a nach 6 h HL1 betrugen für den DT-Pool 332, den VAZ-Pool 59 und für Fx 509; für k_{VD} wurde ein Wert von $0,15 \text{ min}^{-1}$ ermittelt, k_{DF} betrug $0,0016 \text{ min}^{-1}$.*

In einem weiteren Experiment wurde eine zuvor im Schwachlicht angezogene Batchkultur von *C. meneghiniana* unter den gleichen Bedingungen wie die Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* einmalig für 6 h mit HL2 und weitere 6 h mit Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bestrahlt.

Während der Starklichtphase akkumulierte der VAZ-Pool in *C. meneghiniana* nur bis zu einer Konzentration von knapp 60 mmol·mol Chl a^{-1} . Wie Abb. 3.23 zeigt, ließ sich im nachfolgenden Schwachlicht die Umwandlung von Vx über Ddx zu Fx dennoch sehr gut verfolgen, da der erste Umwandlungsschritt mit einer Ratenkonstante k_{VD} von 0,15 min $^{-1}$ zwei Zehnerpotenzen schneller abläuft als die Synthese von Fx aus Ddx ($k_{DF} = 0,0016$ min $^{-1}$). Dadurch läßt sich deutlicher als bei den Versuchen mit *P. tricornutum* zwischen der anfänglichen Zunahme des DT-Pools auf Kosten des VAZ-Pools und dem fortgesetzten Anstieg von Fx unterscheiden, der sich nunmehr allein aus dem DT-Pool speist. Außerdem weist der Versuch mit *C. meneghiniana* bereits darauf hin, daß die Fähigkeit zur Akkumulation der Pigmente des VAZ-Zyklus nicht auf *P. tricornutum* beschränkt ist, sondern vielmehr ein Phänomen darstellt, das auch in anderen Algen mit DT-Zyklus anzutreffen ist (siehe hierzu auch die weiterführenden Untersuchungen in Kap. 3).

2.4 Ein kinetisches Modell der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen

Durch das Turbidostatverfahren im kontinuierlichen Schwachlicht standen Algenkulturen von *P. tricornutum* zur Verfügung, die sehr gleichmäßige Wachstumsraten aufwiesen, welche zudem leicht anhand der Messung der Überlaufvolumina ermittelt werden konnten (Abb. 3.1). Unter diesen konstanten Bedingungen befinden sich die Algenkulturen in einem Fließgleichgewicht (*steady state*), und die Rate der Pigmentzunahme entspricht direkt der Wachstumsrate der Zellen. Sofern die Wachstumsrate der Algen und die *steady-state*-Konzentrationen der Pigmente bekannt sind, läßt sich daraus für jedes Pigment die Neusyntheserate berechnen, die mindestens erforderlich ist, um seine zelluläre Konzentration während des Kulturwachstums konstant zu halten. Wenn weiterhin Informationen über die biosynthetische Verknüpfung zwischen Pigmenten vorliegen, lassen sich auch die theoretisch zu fordernden Ratenkonstanten der einzelnen Umwandlungsschritte berechnen.

Für die Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen ist bereits in Abb. 3.14 ein Modell vorgeschlagen worden, und für die meisten der darin postulierten Umwandlungsschritte wurden in Abb. 3.21 schon Ratenkonstanten definiert. Die Umwandlung von β -Carotin über Cx zu Zx wurde in Abb. 3.21 aber vereinfacht als nur ein Reaktionsschritt betrachtet, dem die Ratenkonstante k_{BZ} zugeordnet wurde. In den folgenden Betrachtungen wird der Teilreaktionen der Umwandlung von β -Carotin in Cx die Ratenkonstante k_{BC} und dem Folgeschritt der Bildung von Zx aus Cx die Ratenkonstante k_{CZ} zugeordnet. Die im weiteren vorgestellten Modellrechnungen basieren auf folgenden Voraussetzungen:

- a) Alle Pigmentumwandlungen werden als Reaktionen erster Ordnung behandelt,
- b) ein möglicher Pigmentabbau wird nicht berücksichtigt,
- c) Vx wird als obligatorische Zwischenverbindung bei der Synthese aller Xanthophylle mit alleninischer oder acetylenischer Gruppe (Ddx, Dtx und Fx) betrachtet, und
- d) es wird angenommen, daß Fx in Diatomeen immer über die Zwischenverbindung Ddx synthetisiert wird.

Bei der Biosynthese von Vx aus β -Carotin wird zunächst davon ausgegangen, daß Zx eine obligatorische Zwischenverbindung darstellt. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß die Pigmente β -Carotin und Ddx nicht nur Precursorfunktion bei der Synthese weiterer Pigmente haben, sondern auch Bestandteile der Pigment-Protein-Komplexe des Photosyntheseapparates sind. Daher wird angenommen, daß nur ein Teil dieser beiden Pigmentpools für die Biosynthese anderer Pigmente zur Verfügung steht (siehe hierzu auch die Diskussion in Kap. 2.2).

Die folgenden Berechnungen basieren auf der Überlegung, daß jedes neu synthetisierte Molekül eines bestimmten Pigmentpools zuvor alle Vorläuferpools durchlaufen haben muß. Für einen Vorläuferpool bedeutet dies, daß die ihn passierenden neu gebildeten Moleküle anteilmäßig dem Prozentanteil aller von ihm abgeleiteten Pigmentpools an der Carotinoidgesamtmenge entsprechen. Wird nun der Prozentanteil aller abgeleiteten Pools durch den Prozentanteil des Vorläuferpools am Carotinoidgesamtgehalt geteilt, so gibt der resultierende Wert an, wie oft die Moleküle des Vorläuferpools ausgetauscht werden müssen, um die angeschlossenen Pigmentpools zu versorgen. Durch Multiplikation dieses „Austauschfaktors“ mit der Wachstumsrate erhält man die Ratenkonstante der Umwandlung des entsprechenden Pigmentpools. Dabei handelt es sich um eine „apparente“ Ratenkonstante, die nicht die Kinetik eines bestimmten Enzyms, sondern eines Prozesses repräsentiert, der aus mehreren enzymatischen Schritten bestehen kann (dies ist höchst wahrscheinlich bei der Umwandlung von Vx zu Ddx und von Ddx zu Fx der Fall). Sie definiert die mindestens erforderliche Reaktionsgeschwindigkeit, mit der der Prozeß ablaufen muß, um die aus ihm gespeisten Pigmentpools mit der wachstumsbedingt erforderlichen Menge an neu gebildeten Carotinoiden zu versorgen.

Tab. 3.12 *Prozentuale Carotinoidgehalte in einer Turbidostatkultur von P. tricornutum im kontinuierlichen LL ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei einer mittleren Wachstumsrate μ von $0,70\cdot\text{d}^{-1}$. Der Carotinoidgesamtgehalt der Kultur betrug $944 \text{ mmol pro mol Chl } a$. CarE-like = b-Carotin-Epoxid-ähnliches Xanthophyll; % Caroid = Prozentualer Anteil am Carotinoidgesamtgehalt; s.e. = Standardfehler ($n = 3$ bis 6).*

Pigment	% Caroid $\pm$ s.e.	Pigment	% Caroid $\pm$ s.e.	Pigment	% Caroid $\pm$ s.e.
β -Carotin	$5,6 \pm 0,3$	Zx	$0,0020 \pm 0,0003$	Dtx	$0,342 \pm 0,012$
CarE-like	$0,017 \pm 0,001$	Ax	$0,136 \pm 0,002$	Ddx	$15,66 \pm 0,08$
Cx	$0,015 \pm 0,002$	Vx	$0,524 \pm 0,008$	Fx	$77,4 \pm 0,2$
CxE	$0,300 \pm 0,008$				

Tab. 3.12 gibt die prozentualen Gehalte der Carotinoide in *P. tricornutum* bei einer PFD von $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer mittleren Wachstumsrate μ von $0,70\cdot\text{d}^{-1}$ bzw. $0,0005\cdot\text{min}^{-1}$ an. Die daraus berechneten Austauschfaktoren aller Pigmentpools sowie Ratenkonstanten der einzelnen Umwandlungsschritte sind in Abb. 3.24 dem Schema der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen hinzugefügt. Die Berechnung soll am Beispiel der Umwandlung von Vx zu Ddx nochmals verdeutlicht werden.

Aus dem Vx-Pool leiten sich Ddx, Dtx und Fx ab, die zusammen einen Anteil von 93,44% am Carotinoidgesamtgehalt haben. Der Anteil des Vx-Pools beträgt aber lediglich 0,524%, also berechnet sich sein Austauschfaktor zu $93,44 / 0,524 = 178$. Die theoretische Ratenkonstante des Umwandlungsschrittes von Vx zu Ddx bei einem Wachstum der Zellen von $0,0005 \cdot \text{min}^{-1}$ ergibt sich demnach zu $178 \cdot 0,0005 \cdot \text{min}^{-1} = 0,089 \cdot \text{min}^{-1}$.

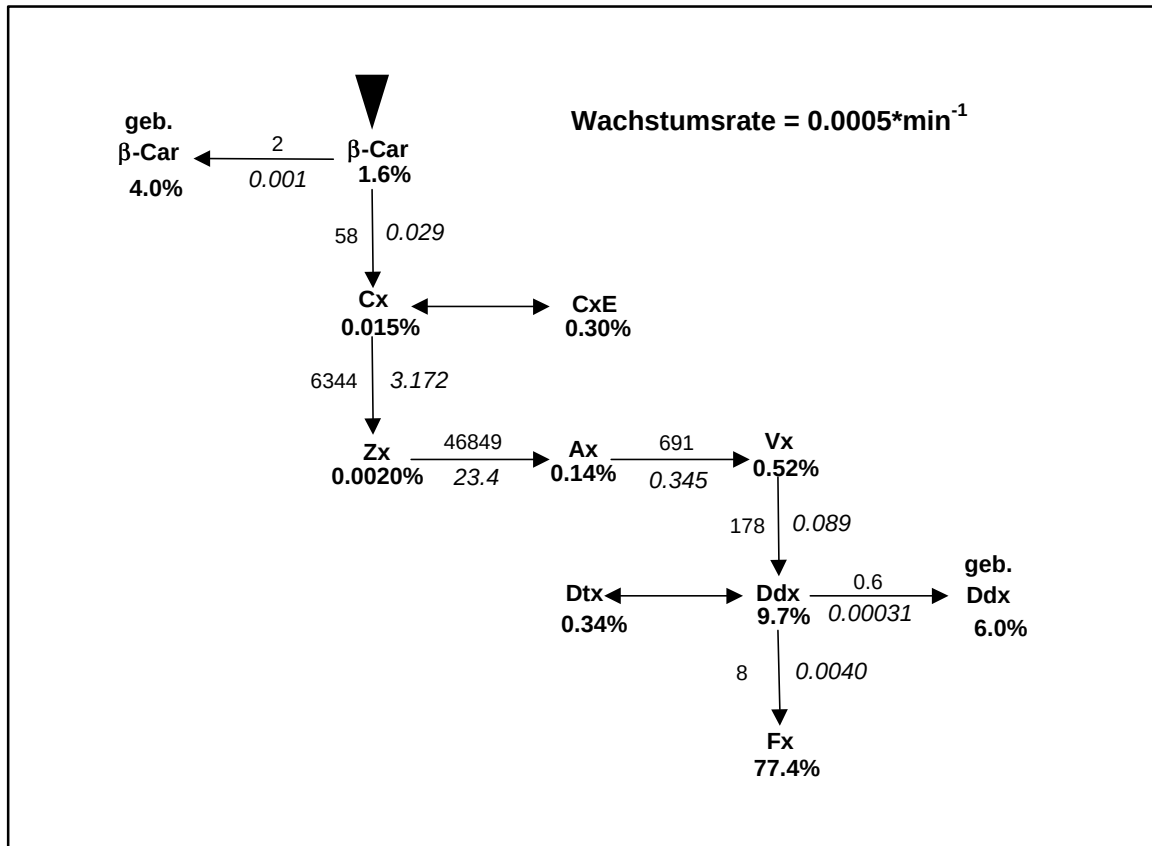


Abb. 3.24 Kinetische Modellierung der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen. Unter jedem Carotinoid ist sein prozentualer Anteil am Carotinoidgesamtgehalt in einer *P. tricornutum*-Kultur bei $40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ angegeben (vgl. Tab. 3.12). Zu jeder Umwandlungsreaktion ist der Austauschfaktor des reagierenden Pigmentpools sowie die Ratenkonstante der Reaktion ($[\text{min}^{-1}]$, kursiv gedruckt) angegeben. $\beta\text{-Car}$ = *b*-Carotin; geb. = in Pigment-Protein-Komplexen gebundener Pigmentanteil, der nicht für die Synthese anderer Pigmente zur Verfügung steht.

Die auf diese Weise berechneten theoretischen Ratenkonstanten können nun mit den experimentell ermittelten Daten verglichen werden. Sollte das der Berechnung zugrunde liegende Modell aus Abb. 3.24 den tatsächlichen Verhältnissen der Xanthophyllbiosynthese in Diatomeen entsprechen, so wäre eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und theoretischen Daten zu fordern. In Tab. 3.13 sind die Daten einander gegenübergestellt. Für einen Vergleich der Ergebnisse ist allerdings noch zu berücksichtigen, daß die theoretischen Raten für eine unter *steady-state*-Bedingungen im Schwachlicht wachsende Kultur von *P. tricornutum* berechnet wurden. Für die experimentelle

Bestimmung der Umwandlungsraten mußten die beteiligten Pigmentpools in den Algen aber zunächst durch mehrstündige Starklichtinkubation angereichert werden. Daher befanden sich die Algen während der Messungen nicht mehr im *steady state*, so daß moderate Unterschiede zwischen experimentellen und theoretischen Raten als Folge starklichtbedingter Stoffwechseländerungen in den Algen angesehen werden können. Im Falle der Epoxidierungsreaktionen lassen sich diese Änderungen unmittelbar nachweisen. So zeigt der Vergleich der Epoxidierungsraten von Dtx nach 15 min HL und nach 6 h HL in Tab. 3.13, daß die mehrstündige Starklichtbehandlung eine Verlangsamung der Reaktion um den Faktor 3,57 zur Folge hat (diskutiert in Kap. 2.2). Die Epoxidierungskinetiken von Zx und Ax lassen sich nach 15 min HL nicht experimentell ermitteln, da diese Pigmente nach so kurzer Starklichteinwirkung noch nicht in ausreichender Menge akkumuliert sind. Allerdings kann eine Abschätzung ihrer Epoxidierungsraten dadurch vorgenommen werden, daß die nach 6 h HL gemessenen Ratenkonstanten mit dem für Dtx ermittelten Faktor multipliziert werden.

Tab. 3.13 Vergleich der nach dem Modell in Abb. 3.22 berechneten Ratenkonstanten mit den experimentell an Kulturen von *P. tricornutum* und *C. meneghiniana* ermittelten Ratenkonstanten. Alle Ratenkonstanten sind in $[\text{min}^{-1}]$ angegeben.

	Theoretische Ratenkonstanten	<i>P. tricornutum</i> nach 6 h HL	<i>P. tricornutum</i> nach 15 min HL	<i>C. meneghiniana</i> nach 6 h HL
k_{TD} (Dtx→Ddx)	-	0,061 ^a	0,218 ^c	0,10
k_{ZA} (Zx→Ax)	23,4	0,068 ^a	0,243 ^d	0,10
k_{AV} (Ax→Vx)	0,345	0,074 ^a	0,264 ^d	0,12
k_{VD} (Vx→Ddx)	0,089	0,009 ^b	-	0,15
k_{DF} (Ddx→Fx)	0,0040	0,0022 ^b	-	0,0016

^a Mittelwerte aus Tab. 3.9

^b Mittelwerte aus Tab. 3.11

^c Mittelwert aus Tab. 3.8

^d Berechnung erfolgte durch Multiplikation der entsprechenden Epoxidierungsrate nach 6 h HL mit dem Steigerungsfaktor (3,574) von k_{TD} nach 15 min HL im Vergleich zu k_{TD} nach 6 h HL.

Aus Tab. 3.13 geht hervor, daß sich im Falle der Epoxidierung von Ax zu Vx sowie der Umwandlungen von Vx zu Ddx und Ddx in Fx die gemessenen und die theoretischen Ratenkonstanten in der gleichen Größenordnung bewegen. Die Ratenkonstante k_{VD} betrug in *P. tricornutum* nach 6 h Starklicht zwar nur ein Zehntel des aus dem Modell berechneten Wertes, dafür wies *C. meneghiniana*, eine fast doppelt so hohe Rate auf wie gefordert. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die theoretische Umwandlungsrate von den Algen prinzipiell realisiert werden kann. Die experimentell ermittelten Ratenkonstanten k_{ZA} der Epoxidierung von Zx zu Ax liegen jedoch in beiden Diatomeen um zwei

Zehnerpotenzen unter der theoretisch zu fordernden Rate. Die sehr hohe theoretische Rate ist in der extrem niedrigen *steady-state*-Konzentration von Zx in *P. tricornutum* begründet, welche eine hohe Umsatzgeschwindigkeit des Zx-Pools verlangt, sofern Zx tatsächlich eine obligatorische Zwischenstufe bei der Biosynthese von Ddx und Fx ist. Letzteres wird durch die große Diskrepanz zwischen gemessener und berechneter Rate allerdings in Frage gestellt. Potentielle Ursachen für diese Abweichung sowie alternative Biosynthesewege der Xanthophylle in Kieselalgen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

2.5 Diskussion der Modellierung der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen

Zunächst ist zu diskutieren, inwieweit fehlerhafte Grundannahmen bei der Modellierung zu den starken Diskrepanzen zwischen der gemessenen und der theoretisch zu fordernden Epoxidierung von Zx beigetragen haben könnten. Eine der Annahmen bei der Modellierung war, daß in den Algen praktisch kein Pigmentabbau stattfindet. Bisherige experimentelle Daten hierzu sind widersprüchlich. So berechneten Riper et al. (1979) aus Pigmentmarkierungsstudien in der Diatomee *Skeletonema costatum* für Chl a eine Lebenszeit τ von lediglich 3 bis 10 h (eine Lebenszeit τ von z.B. 5 h entspricht einer Abbauratenkonstante $k = 1/\tau$ von $0,0033 \cdot \text{min}^{-1}$). Goericke und Welschmeyer (1992a, 1992b) dagegen ermittelten ebenfalls anhand von Pigmentmarkierungskinetiken in der Kieselalge *Thalassiosira weissflogii* sowohl für Chl a als auch für Fx eine durchschnittliche Lebensdauer von mehreren Tagen bis hin zu Wochen. Der letztgenannte Befund stützt die hier getroffene Annahme; zudem hätte die Berücksichtigung eines möglichen Pigmentabbaus bei der Modellierung eine weitere Erhöhung der Ratenkonstanten und damit eine Verstärkung der Diskrepanzen zur Folge.

Bei der Erstellung des kinetischen Schemas (Abb. 3.24) wurde weiterhin vorausgesetzt, daß die allenische Gruppe in Fx sowie die acetylenische Gruppe in Ddx bzw. Dtx nur über eine 5,6-Epoxidgruppe gebildet werden können, also Vx eine obligatorische Zwischenverbindung bei der Biosynthese von Ddx, Dtx und Fx darstellt. Die Alternative wäre, daß die Synthesen von Ddx, Dtx und Fx unabhängig von der Bildung von Vx erfolgen. Doch belegen die in Abb. 3.12, 3.22 und 3.23 gezeigten Konzentrationsänderungen der Xanthophylle in *P. tricornutum* bzw. *C. meneghiniana* klar, daß die im Starklicht gebildeten Pigmente des VAZ-Zyklus in die Pigmente des DT-Zyklus umgewandelt werden können. Die Akkumulation des VAZ-Zyklus dagegen ist an eine *de-novo*-Synthese von Carotinoiden geknüpft und korreliert mit der Deepoxidaseaktivität (Kap. 1.6). Diese Beobachtungen stellen zwar keinen definitiven Beweis für die postulierte Precursorfunktion von Vx bei der Synthese der anderen Xanthophylle in Kieselalgen dar, legen sie jedoch nahe. Weiterhin spricht die massive Akkumulation von Zx in *P. tricornutum* während der Starklichtphase (Abb. 3.9 und 3.12) dafür, daß alle neu synthetisierten Xanthophylle den VAZ-Pool durchlaufen. Dabei liegen keine Anzeichen dafür vor, daß Zx direkt zu Dtx umgewandelt werden kann, da seine Epoxidierung zu Ax und Vx mit deutlich schnellerer Kinetik erfolgt als die Abnahme des VAZ-Pools (Abb. 3.16.B, Tab. 3.13). Offen bleibt jedoch, ob

die Umwandlung von Vx zu Ddx die einzige Verbindung zwischen dem VAZ-Pool und dem DT-Pool darstellt oder ob auch Ax direkt zu Dtx umgewandelt werden kann. Einen Hinweis auf die letztgenannte Möglichkeit liefern die bereits genannten Pigmentmarkierungsstudien von Goericke und Welschmeyer (1992b) an der Diatomee *Thalassiosira weissflogii*, die darauf hindeuten, daß Ddx und Dtx aus zwei unterschiedlichen Precursor-Pools gebildet werden. Die Möglichkeit einer direkten Umwandlung von Ax zu Dtx würde auch die sehr schnelle Deepoxidierungskinetik von Ax in *P. tricornutum* (Tab. 3.10) in einem anderen Licht erscheinen lassen. Wie Abb. 3.16.D-E zeigt, ist bei der Deepoxidierung von Ddx ein überproportionaler Anstieg von Dtx zu beobachten, während die Deepoxidierung von Vx in weniger Zx resultiert als erwartet. Möglicherweise unterbleibt bei der Umwandlung von Vx zu Zx die temporäre Anreicherung des Intermediates Ax auch deshalb, weil neben der weiteren Deepoxidierung zu Zx ein Teil des aus Vx gebildeten Ax direkt zu Dtx umgewandelt wird.

Schließlich wurde der Modellierung zugrunde gelegt, daß Ddx eine obligatorische Zwischenverbindung bei der Synthese von Fx darstellt. Diese Annahme wird zumindest durch die kinetischen Analysen an *P. tricornutum* (Abb. 3.22) und *C. meneghiniana* (Abb. 3.23) gestützt, die für eine sequentielle Umwandlung von Vx über Ddx zu Fx sprechen. Zudem belegen die längerfristigen Pigmentänderungen in *P. tricornutum* bei inhibierter Carotinoidbiosynthese (Abb. 3.12) klar, daß Fx aus Ddx gebildet werden kann. Zusammenfassend liegen somit keine Hinweise dafür vor, daß die Diskrepanzen, die hinsichtlich der Epoxidierungsrate von Zx festgestellt wurden, ihre Ursache in fehlerhaften Grundannahmen bei der Modellierung haben könnten.

Falls nun aber Zx eine obligatorische Zwischenverbindung bei der Synthese von Vx aus β -Carotin darstellen sollte, bliebe als Erklärung für die starken Unterschiede zwischen den modellierten und den im Rahmen des Xanthophyllzyklus gemessenen Epoxidierungsraten von Zx nur, daß das im Schwachlicht als Fx-Precursor dienende Zx nicht in der Thylakoidmembran, sondern schon in den Hüllmembranen der Plastiden zu Vx epoxidiert wird. Diese Reaktion müßte dann eine deutlich größere Ratenkonstante aufweisen als die Epoxidierung in der Thylakoidmembran. In der Tat schlossen Costes et al. (1979) aus Pigmentmarkierungsversuchen an Spinatchloroplasten, daß die Biosynthese von Vx aus Zx in den Hüllmembranen stattfindet, und parallele Untersuchungen von Siefermann-Harms et al. (1978) sprachen dafür, daß Vx anschließend in die Thylakoidmembran transportiert wird. Andererseits zeigten Linden et al. (1993) mittels Immunogoldmarkierung, daß das Enzym Phytoen-Desaturase (vgl. Abb. 1.6) sowohl in Spinat als auch in Tabak (*Nicotiana tabacum*) zum größten Teil in Assoziation mit der Thylakoidmembran vorliegt. Auch wiesen Hüllmembranen aus Spinat im Gegensatz zur Thylakoidmembran praktisch keine Desaturaseaktivität auf (Linden et al. 1993). Diesem Befund nach würde bereits die Synthese von β -Carotin in der Thylakoidmembran ablaufen. An Kieselalgen sind bisher keine entsprechenden Untersuchungen vorgenommen worden. Die in Abb. 3.8 und 3.16 dargestellten Ergebnisse zum CE-Zyklus zeigen jedoch, daß etwa ein Drittel des in *P. tricornutum* unter Starklicht akkumulierten CE-Pools an den Xanthophyllzyklusreaktionen

teilnimmt. Zumindest dieser Pigmentanteil sollte sich demnach bereits in der Thylakoidmembran befinden, um für die lumenale Deepoxidase zugänglich zu sein. Doch schließt diese Überlegung nicht aus, daß sich der Anteil an CxE, der auch nach längerer Starklichtinkubation verbleibt (Abb. 3.9 und 3.10), noch in den Hüllmembranen befindet. Der selbst bei hohen Lichtintensitäten relativ niedrige Deepoxidierungsstatus des CE-Pools in *P. tricornutum* (Tab. 3.5) spricht jedenfalls dafür, daß ein größerer Teil des CxE nicht für die Deepoxidase zugänglich ist. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, daß ein Teil der CxE-Moleküle ihren polaren 3-Hydroxy-5,6-Epoxy-Jononring auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran exponiert haben und die Polyenkette sowie der zweite Jononring aufgrund ihres hydrophoben Charakters in einem flachen Winkel in die Thylakoidmembran eintauchen, anstatt sie zu durchspannen. Auf diese Weise in der Thylakoidmembran lokalisierte CxE-Moleküle wären vermutlich für die lumenale Deepoxidase nicht erreichbar. Den gleichen Effekt hätte eine Bindung von CxE an Thylakoidmembranproteine. Eine andere Alternative wäre die schon erwähnte Lokalisation dieses CxE-Anteils in den Hüllmembranen.

Aus Abb. 3.24 wird deutlich, daß das dort dargestellte kinetische Modell aufgrund des sehr kleinen *steady-state*-Pools an Cx auch eine sehr große Ratenkonstante für die Hydroxylierung von Cx zu Zx fordert. Abb. 3.16.C spricht jedoch dafür, daß das in *P. tricornutum* während der Starklichtperiode akkumulierte Cx vollständig zu CxE epoxidiert wird. Es sind keine Anzeichen für eine Reaktion erkennbar, die mit der Epoxidierung um das Substrat Cx konkurrieren würde. Für die β -Carotin-Hydroxylase aus *A. thaliana* deuten Untersuchungen von Sun et al. (1996) darauf hin, daß das Enzym *in vivo* möglicherweise als Dimer vorliegt und auf diese Weise die beiden Jononringe eines β -Carotin-Moleküls gleichzeitig hydroxyliert werden könnten. Sollte die Hydroxylase in *P. tricornutum* nach diesem Prinzip arbeiten, so würde dies die niedrige *steady-state*-Konzentration an Cx (Tab. 3.12) erklären und zugleich würde sich das Problem der hohen Ratenkonstante für den zweiten Schritt nicht mehr stellen. In diesem Fall wäre CxE möglicherweise nur ein Nebenprodukt, das aus Cx-Molekülen gebildet wird, welche durch Abbruch der Hydroxylase-Reaktion nach der Hydroxylierung nur eines der beiden Jononringe von β -Carotin entstehen.

Alternativ könnte CxE aber auch anstelle von Zx als Zwischenprodukt bei der Synthese von Ax bzw. Vx fungieren. Auf diese Möglichkeit deuten sowohl die im Vergleich zu Zx um zwei Zehnerpotenzen höhere *steady-state*-Konzentration von CxE (Tab. 3.12) in *P. tricornutum*, die unter Norflurazon relativ schnell abnimmt (Abb. 3.11), als auch die schnelle Abnahme des CxE, das nach 6 h Starklicht durch die Epoxidierung von Cx gebildet wird (Abb. 3.16.C und 3.16.F). Ein dieser Alternative entsprechendes Schema der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen und die resultierenden Ratenkonstanten sind in Abb. 3.25 dargestellt.

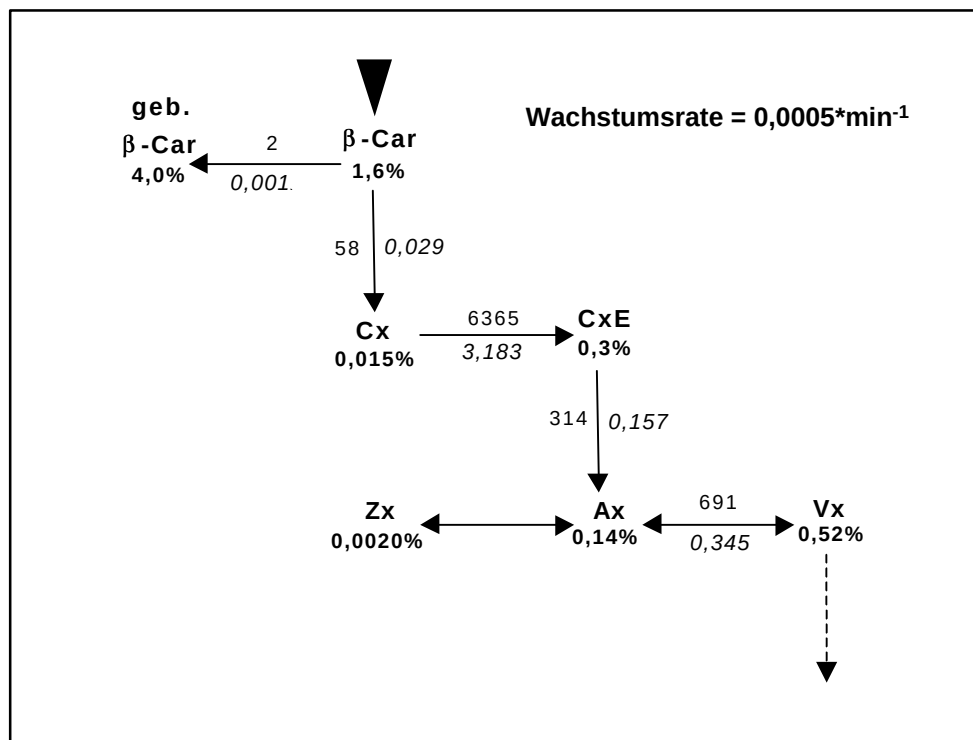


Abb. 3.25 Alternatives kinetisches Modell der Xanthophyllbiosynthese in Kieselalgen. Unter jedem Carotinoid ist sein prozentualer Anteil am Carotinoidgesamtgehalt in einer *P. tricornutum*-Kultur bei $40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ genannt (vgl. Tab. 3.12). Zu jeder Umwandlungsreaktion sind der Austauschfaktor des reagierenden Pigmentpools sowie die Ratenkonstante der Reaktion ($[\text{min}^{-1}]$, kursiv gedruckt) angegeben. Die der Vx-Bildung nachfolgenden Schritte und die dazugehörigen Ratenkonstanten sind mit denen in Abb. 3.24 identisch und deshalb nicht nochmals dargestellt. $\beta\text{-Car}$ = β -Carotin; geb. = in Pigment-Protein-Komplexen gebundener Pigmentanteil, der nicht für die Synthese anderer Pigmente zur Verfügung steht.

In diesem Schema stellt die Epoxidierung von Cx zu CxE den schnellsten zu fordernden Schritt dar. Die Kinetik dieser Reaktion in *P. tricornutum* nach 6 h Starklicht wurde in Kap. 2.1.2 untersucht, in Tab. 3.14 sind die Ergebnisse den theoretisch zu fordernden Ratenkonstanten aus Abb. 3.25 gegenübergestellt. Auch hier wurde wie schon in Tab. 3.13 angenommen, daß die sechsstündige Starklichtbehandlung zu einer Verlangsamung der Epoxidierungsreaktion im nachfolgenden Schwachlicht führt. Entsprechend wurden die Ratenkonstanten der Epoxidierung von Cx sowie der im Laufe der Schwachlichtinkubation einsetzenden Abnahme von CxE mit dem aus den unterschiedlichen Epoxidierungsraten von Dtx ermittelten Faktor 3,574 multipliziert. Dennoch ist die auf diese Weise ermittelte Ratenkonstante der Cx-Epoxidierung noch um den Faktor 30 kleiner als der theoretisch zu fordernde Wert. Im Modell der Abb. 3.24 betrug der Unterschied zwischen theoretischer und experimentell ermittelter Epoxidierungsrate von Zx zu Ax den Faktor 100, doch die hier vorliegende Diskrepanz um den Faktor 30 bleibt unbefriedigend.

Tab. 3.14 Vergleich der nach dem Modell in Abb. 3.25 berechneten Ratenkonstanten mit den experimentell an Kulturen von *P. tricornutum* ermittelten Ratenkonstanten. Alle Ratenkonstanten sind in $[\text{min}^{-1}]$ angegeben.

	Theoretische Ratenkonstanten	<i>P. tricornutum</i> nach 6 h HL	<i>P. tricornutum</i> nach 15 min HL
k_{TD} (Dtx→Ddx)	-	0,061 ^a	0,218 ^c
k_{CE} (Cx→CxE)	3,18	0,027 ^a	0,096 ^d
k_{EX} (CxE→Ax?)	0,157	0,01 ^a	0,036 ^d
k_{EX} (CxE→Ax?) HL	0,157	0,256 ^b	-

^a Mittelwerte aus Tab. 3.9

^b Mittelwert aus Tab. 3.10

^c Mittelwert aus Tab. 3.8

^d Berechnung erfolgte durch Multiplikation der entsprechenden Epoxidierungsrate nach 6 h HL mit dem Steigerungsfaktor (3,574) von k_{TD} nach 15 min HL im Vergleich zu k_{TD} nach 6 h HL.

Somit ist das Problem zunächst lediglich auf einen früheren Biosyntheseschritt vorverlegt worden. Dennoch bleibt CxE als Intermediat der Biosynthese von Vx aus β -Carotin denkbar, da die Ratenkonstanten seiner Abnahme in der gleichen Größenordnung liegen wie die laut Abb. 3.25 zu fordernde Rate der hypothetischen Umwandlung von CxE zu Ax (Tab. 3.14). Auch die deutliche Abnahme des CxE-Gehaltes in *P. tricornutum* nach Hemmung der Carotinoidneusynthese durch Norflurazon, die sowohl im Starklicht (Abb. 3.11.C) als auch im nachfolgenden Schwachlicht (Tab. 3.6) beobachtet werden kann, spricht für eine Precursorfunktion von CxE bei der Xanthophyllbiosynthese. Allerdings läßt sich eine mögliche Bildung von Ax aus CxE nicht direkt anhand der Änderungen der Ax-Gehalte in den Algen nachweisen, da auch nach 6 h Starklicht die Menge an CxE sehr gering ist. Zwar sind die Ax-Konzentrationen in *P. tricornutum* nach Starklicht zunächst ebenfalls sehr niedrig, doch wird ein möglicher Zustrom aus dem CxE-Pool durch die wesentlich größere Zunahme infolge der Epoxidierung von Zx sowie durch den Abfluß in Richtung Vx überlagert (Abb. 3.16.B-C).

Bemerkenswert ist die starke Beschleunigung der CxE-Abnahme in *P. tricornutum*-Zellen, die nach 6 h Starklicht und 45 min Schwachlichterholung erneut mit Starklicht inkubiert werden (Abb. 3.16.F). Wie aus Tab. 3.14 ersichtlich, erhöht sich der Abfluß aus dem CE-Pool beim Wechsel von Schwachlicht zu Starklicht etwa um den Faktor 25 und ist damit fast doppelt so hoch wie die theoretisch zu fordernde Schwachlicht-Ratenkonstante (Abb. 3.25). Sofern hinter der beschleunigten Abnahme von CxE im Starklicht tatsächlich ein schnellerer Übergang der Pigmente des CE-Pools in den VAZ-Pool steht, hätte diese Aktivierung eine Förderung des Umwandlungsschrittes von CxE zu Ax gegenüber der um das Substrat CxE konkurrierenden Deepoxidase-Reaktion zur Folge. Eigene Modellrechnungen auf Basis des Biosyntheseschemas in Abb. 3.25 (Daten nicht gezeigt) sprechen zwar dafür, daß die theoretische Schwachlicht-Ratenkonstante k_{EX} von 0,157 auch im Starklicht bei aktiver Deepoxidase

ausreichend groß wäre, um die experimentell zu beobachtende Neusynthese der Pigmente des DT-Zyklus während 6 h Starklicht (Abb. 3.9) zu ermöglichen. Doch würde eine beschleunigte Umwandlung von CxE zu Ax die Synthese von Ddx bzw. Dtx zusätzlich begünstigen. Eine alternative Strategie zur fortgesetzten Synthese der DT-Zyklus-Pigmente im Starklicht wäre, wie bereits erörtert, die Vermeidung der Deepoxidase-Reaktion infolge einer Lokalisation der entsprechenden Biosyntheseschritte in den Hüllmembranen.

Schließlich wäre noch eine Beteiligung des β -Car-Epoxid-ähnlichen Pigmentes in *P. tricornutum* an der Xanthophyllbiosynthese möglich. Seine *steady-state*-Konzentration im Schwachlicht liegt bei etwa 0,17 mmol pro mol Chl a; das entspricht einem Anteil von nicht ganz 0,02% am Carotinoidgesamtgehalt. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei diesem Pigment tatsächlich um β -Car-Epoxid handelt, wäre vorstellbar, daß in *P. tricornutum* β -Carotin bevorzugt zu β -Car-Epoxid umgewandelt und dieses anschließend zu CxE hydroxyliert wird. In diesem Fall wäre aber zu fordern, daß *P. tricornutum* über eine Epoxidase verfügt, die auch β -Carotin als Substrat akzeptiert. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Bouvier et al. (1996) an einer heterolog exprimierten Epoxidase aus Paprika (*Capsicum annuum*), die dafür sprechen, daß β -Carotin zumindest von dem in Höheren Pflanzen vorkommenden Enzym nicht epoxidiert werden kann. Zwar ist durchaus vorstellbar, daß Diatomeen über eine abgewandelte Epoxidase verfügen, doch wäre in diesem Fall zu erwarten, daß das Enzym auch CxE weiter zu β -Cryptoxanthin-Diepoxid umsetzt. Dieses Pigment sollte bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten HPLC-System etwa zwei Minuten vor CxE eluieren, also im Bereich der Retentionszeit von Zx (vgl. Tab. 2.3). Da β -Cryptoxanthin-Diepoxid den gleichen Chromophor wie Vx aufweist, sollte sein Absorptionsspektrum mit dem von Vx identisch sein (Britton 1995). Entsprechend müßte β -Cryptoxanthin-Diepoxid zumindest in den schwachlichtakklimatisierten Turbidostatkulturen von *P. tricornutum*, die praktisch kein Zx aufweisen, gut detektierbar sein. Es lagen jedoch in keinem Fall Anzeichen für seine Anwesenheit vor. In diesem Zusammenhang ist ferner anzufügen, daß sich die Konzentration des β -Car-Epoxid-ähnlichen Pigmentes in *P. tricornutum* unter 6 h Starklicht etwa verdreifacht; werden die Algen anschließend im Schwachlicht unter Norflurazon inkubiert, so hat sein Gehalt nach 18 h aber um lediglich 20% abgenommen. Diese Beobachtung schließt eine Beteiligung des Pigmentes an der Xanthophyllbiosynthese in *P. tricornutum* zwar nicht definitiv aus, spricht allerdings auch nicht für diese Annahme. Alternativ könnte das β -Car-Epoxid-ähnliche Pigment in *P. tricornutum* durch eine nicht-enzymatische Oxidation von β -Carotin entstehen. Young und Mitarbeiter (Young et al. 1989, Young und Britton 1990) zeigten, daß β -Car-Epoxid sowohl in Gerste (*Hordeum vulgare*) als auch in der Grünalge *Dunaliella parva* erst unter Starklicht bzw. oxidativem Streß gebildet wird. Da das unter diesen Bedingungen entstandene β -Car-Epoxid optisch inaktiv war, handelte es sich offensichtlich um ein racemisches Gemisch des 5R, 6S- und des 5S, 6R-Epoxides; dieser Umstand spricht für einen nicht-enzymatischen Bildungsmodus. Auch wenn das β -Car-Epoxid-ähnliche Pigment bereits in Schwachlichtkulturen von *P. tricornutum* detektierbar

ist, so deutet die im Starklicht zu beobachtende Verdreifachung seiner Konzentration auf die Möglichkeit hin, daß dieses Epoxid ebenfalls nicht-enzymatisch gebildet wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß durch den Vergleich von experimentell ermittelten und modellierten Ratenkonstanten das Schema der Xanthophyllbiosynthese, das jeweils der Modellierung zugrunde liegt, zwar nicht abschließend verifiziert werden kann. Die Modellierung zeigt jedoch auf, welche der jeweils postulierten Biosyntheseschritte durch experimentelle Daten noch nicht bzw. unzureichend gesichert sind und identifiziert somit Schwachstellen, die weiterer Untersuchung bedürfen. Im Fall von *P. tricornutum* betrifft dies in erster Linie die Biosynthese von Vx aus β -Carotin. So bleibt zu untersuchen, ob die beteiligten Reaktionen in den Thylakoid- oder den Hüllmembranen der Plastiden stattfinden. Außerdem ist zu klären, ob in Kieselalgen neu synthetisierte Xanthophylle über Zx, Ax oder Vx in den VAZ-Pool gelangen. Damit in direktem Zusammenhang steht die Frage, ob CxE dabei ein Intermediat darstellt.

Die hier vorgestellte Modellierungsmethode ist auch auf andere einzellige Algen anwendbar. Eine Voraussetzung hierfür ist die Bestimmung des Wachstums und der *steady-state*-Pigmentgehalte von kontinuierlichen Kulturen der betreffenden Algen. Die Evaluation eines hypothetischen Biosyntheseschemas anhand von experimentell ermittelten Ratenkonstanten ist jedoch nur möglich, wenn sich postulierte Intermediate z.B. durch temporäre Starklichtinkubation akkumulieren lassen und anschließend mit einer meßbaren Rate wieder abgebaut werden. Sollte dies nicht möglich sein, bietet die Methode dennoch die Möglichkeit, Ergebnisse aus *in-vitro*-Messungen einzelner Umwandlungsschritte mit den anhand des Modells abgeschätzten *in-vivo*-Ratenkonstanten zu vergleichen.

3. Untersuchung der Pigmente und der Xanthophyllzyklen weiterer Algenarten aus der Gruppe der Chromophyten

Im folgenden wurden die Untersuchungen zur Verbreitung von VAZ- und DT-Zyklus sowie zum Zusammenhang zwischen den Xanthophyllzykluspigmenten und der Biosynthese der Lichtsammel-xanthophylle auf eine Reihe weiterer Algen aus der Gruppe der Chromophyten ausgedehnt. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, inwieweit die Beobachtungen an *P. tricornutum* verallgemeinert werden können. Alle folgenden Experimente wurden an Algen durchgeführt, die vor Beginn der eigentlichen Versuche als Batchkulturen angezogen worden waren. Die Belichtungsexperimente erfolgten in der gleichen Versuchsanordnung wie schon im Fall der Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* (für weitere Details siehe Material und Methoden, Kap. 2.2 und Kap. 3.1).

3.1 Vorkommen von VAZ-Zyklus und DT-Zyklus in Chromophyten sowie der Chl a/b-haltigen Alge *Euglena gracilis*

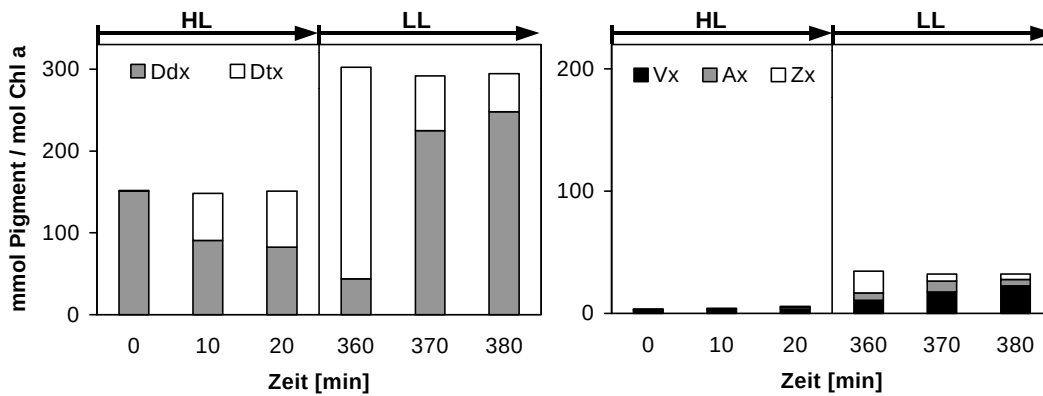
Zunächst wurde die Verbreitung von DT-Zyklus und VAZ-Zyklus anhand einer Reihe von Algen aus verschiedenen Klassen bzw. Abteilungen der Chromophyten genauer untersucht. Sofern Xanthophylle mit einer acetylenischen Gruppe wie z.B. in Ddx oder einer allenischen Gruppe wie in Fx grundsätzlich über eine intermediäre 5,6-Epoxidgruppe gebildet werden, sollten sich die Pigmente des VAZ-Zyklus in allen Algen mit DT-Zyklus durch eine Starklichtstimulation der Deepoxidase akkumulieren lassen. Außerdem wurden Algen mit VAZ-Zyklus daraufhin untersucht, ob sie umgekehrt unter länger andauerndem Starklicht auch die Pigmente des DT-Zyklus bilden können.

3.1.1 Diadinoxanthinhaltige Algen: Bacillariophyceae, Xanthophyceae, Haptophyta, Dinophyta, Euglenophyta

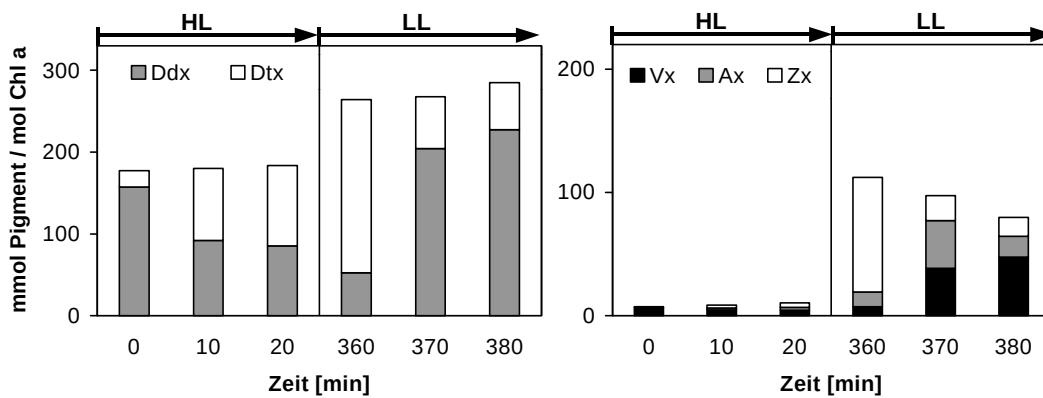
In die folgenden Experimente wurden auch die beiden bereits zuvor untersuchten Kieselalgen *P. tricornutum* und *C. meneghiniana* mit einbezogen. Im Fall von *P. tricornutum* ergibt sich dadurch die Möglichkeit, das Verhalten der an periodische Starklichtbestrahlung akklimatisierten Turbidostatkulturen mit dem einer Batchkultur zu vergleichen, die im Schwachlicht angezogen wurde. Darüber hinaus wurde mit *Euglena gracilis* auch eine Chl a/b-haltige Alge untersucht. Diese Alge enthält neben *cis*-Neoxanthin, das in praktisch allen Chl b-haltigen Organismen vorkommt, erhebliche Mengen an Ddx; dagegen wurde Vx als potentieller Precursor der Ddx-Biosynthese bisher nicht in *E. gracilis* nachgewiesen.

Wie die Zusammenstellung der Ergebnisse in Abb. 3.26 zeigt, akkumulierten alle untersuchten Algen, die einen DT-Zyklus aufweisen, während der sechsstündigen Starklichtinkubation auch die Pigmente des VAZ-Zyklus. Somit ist dieses Phänomen nicht auf Kieselalgen beschränkt; vielmehr kann davon ausgegangen werden, daß es bei Algen mit DT-Zyklus generell anzutreffen ist. Dieser Befund stützt zugleich die Hypothese, daß die Biogenese der acetylenischen Gruppe in Ddx bzw. Dtx generell über eine 5,6-Epoxidgruppe als Intermediat erfolgt. Bei oberflächlicher Betrachtung scheinen

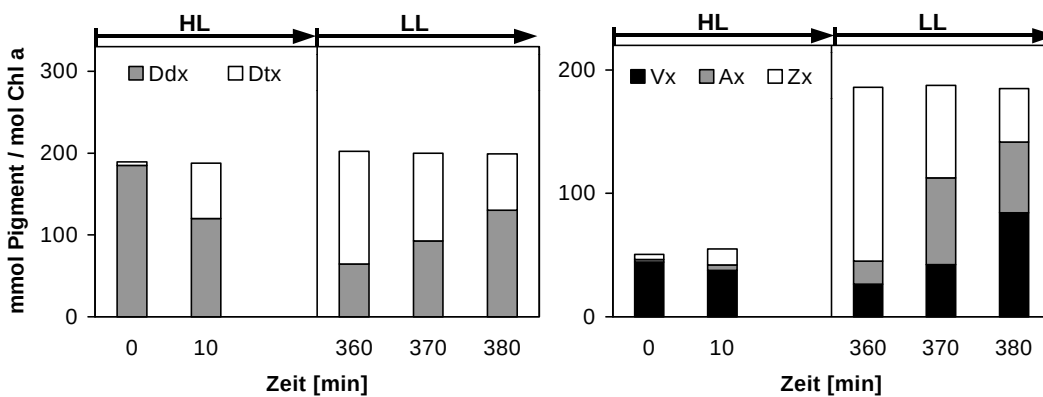
A) Bacillariophyceae: *Phaeodactylum tricornutum*



B) Bacillariophyceae: *Cyclotella meneghiniana*



C) Xanthophyceae: *Mischococcus sphaerocephalus*



D) Xanthophyceae: *Pleurochloris meiringensis*

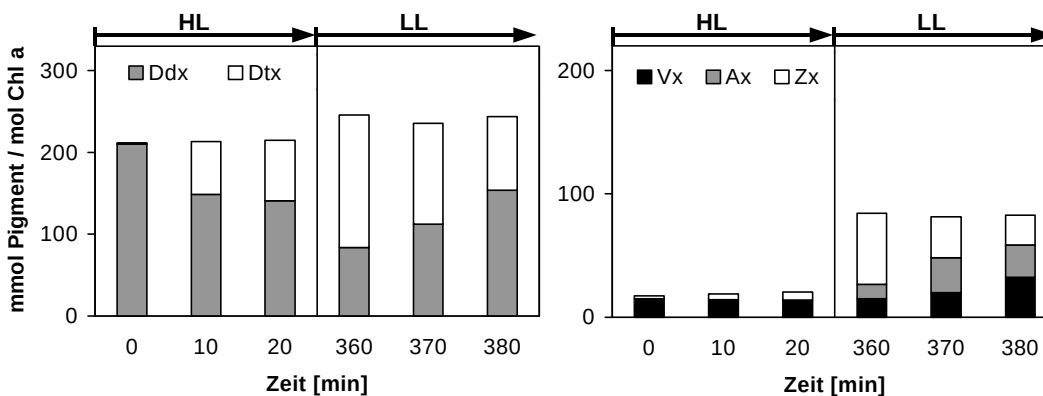
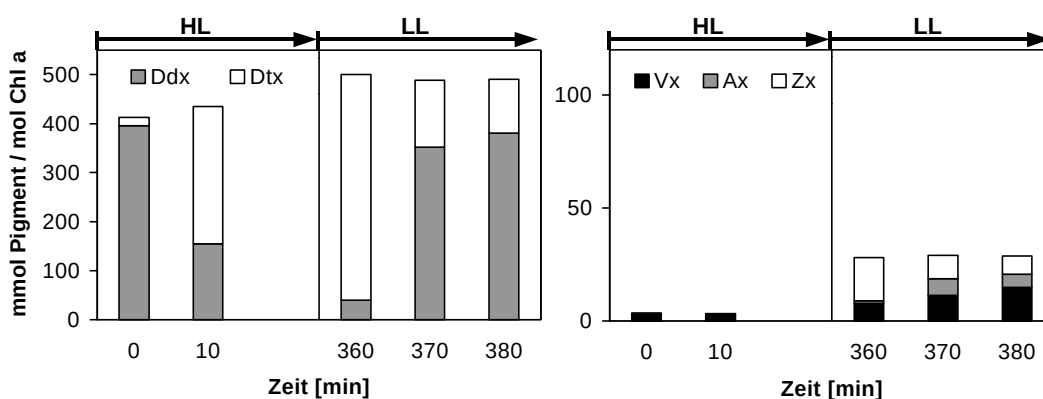
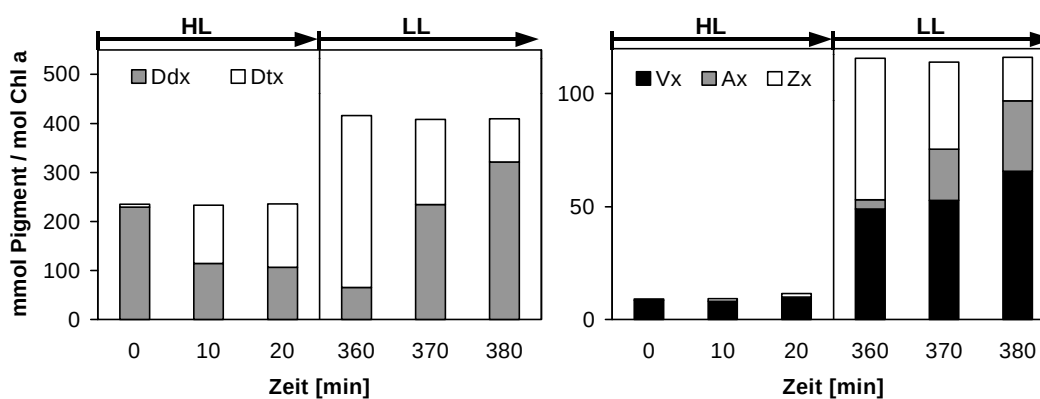


Abb. 3.26 Teil 1

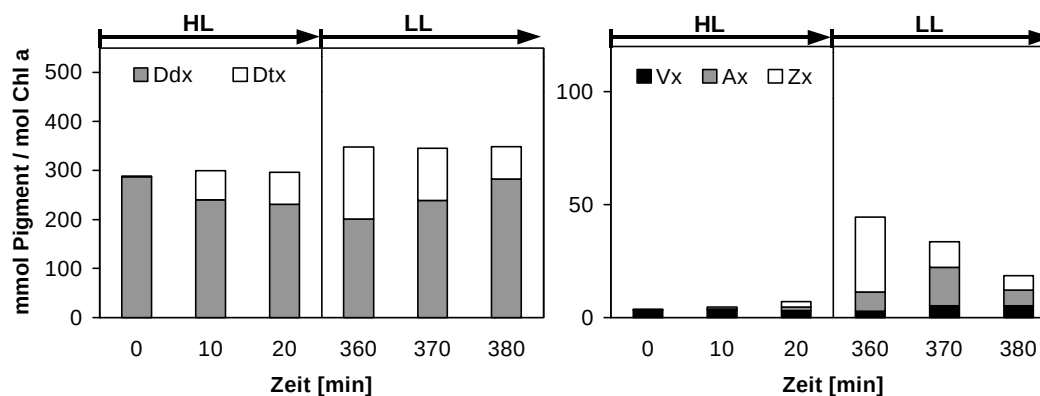
E) Haptophyta: *Pavlova lutheri*



F) Haptophyta: *Prymnesium parvum*



G) Dinophyta: *Amphidinium carterae*



H) Euglenophyta: *Euglena gracilis*

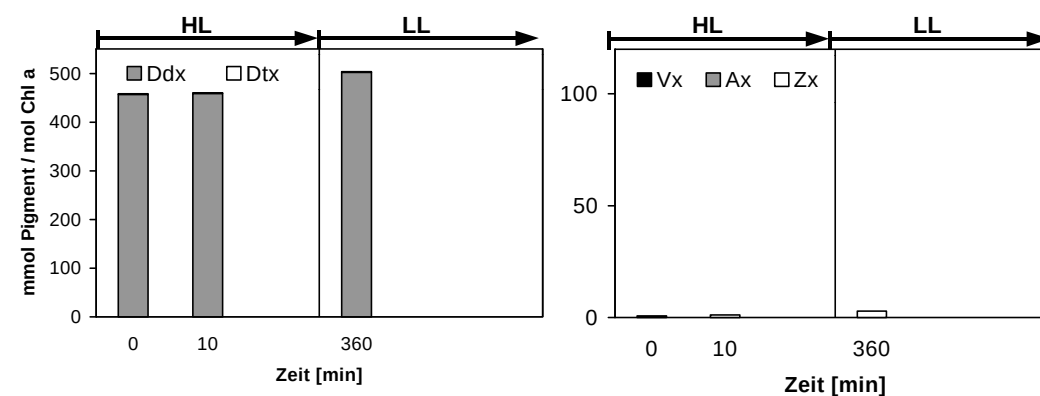


Abb. 3.26 Vorkommen von DT-Zyklus und VAZ-Zyklus in Ddx-haltigen Algen. Alle untersuchten Algen stammten aus Batchkulturen. Sie wurden 1 h vor Versuchsbeginn in Turbidostatanzuchtgefäße überführt und als Airliftkulturen zunächst im Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vorinkubiert (für weitere Details siehe Material und Methoden, Kap. 2.2 und Kap. 3.1). Dann wurden die Algen 6 h mit Starklicht (*P. tricornutum* bei $500 \mu\text{mol}$, *P. parvum* und *A. carterae* bei $1000 \mu\text{mol}$, alle weiteren Algen bei $700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und anschließend erneut mit Schwachlicht bestrahlt. Dabei wurden die Änderungen der Xanthophyllzykluspigmente während der ersten 20 min der Starklichtphase (0, 10 und 20 min nach Versuchsbeginn) sowie der nachfolgenden Schwachlichtinkubation (360, 370 und 380 min nach Versuchsbeginn) verfolgt. Die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen in den Teilen 1 und 2 der Abbildung ist zu beachten.

die für *E. gracilis* erhaltenen Daten (Abb. 3.26.H) dieser Aussage zu widersprechen, da diese Alge auch nach 6 h Starklicht nur verschwindend geringe Mengen eines Zx-ähnlichen Pigmentes angereichert hatte. *E. gracilis* zeigte unter den hier gewählten Bedingungen jedoch auch keine Deepoxidierung von Ddx zu Dtx. Diese Beobachtung spricht für eine inaktive, defekte oder völlig fehlende Deepoxidase in *E. gracilis*. Unter diesen Umständen ist eine Akkumulation von Zx im Starklicht auch nicht zu erwarten, da die in Kap. 1.6 dargestellten Untersuchungen an *P. tricornutum* für eine essentielle Rolle der Deepoxidase-Aktivität bei der Zx-Akkumulation sprechen.

Krinsky (1964) beobachtete beim auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stamm von *E. gracilis* erst unter anaeroben Verhältnissen (N_2 -Atmosphäre) eine Umwandlung von Ddx zu Dtx. Deshalb wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Algensuspension während der Belichtung mit Stickstoff anstelle von Druckluft durchsprudelt wurde. Doch auch unter diesen Bedingungen war keine Deepoxidierung von Ddx meßbar. Im Gegensatz zu den hier untersuchten, logarithmisch wachsenden Algen verwendete Krinsky für seine Versuche Zellen, die sich bereits in der stationären Phase befanden. Dies mag eine Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen sein. Als Konsequenz gelang die Akkumulation der Pigmente des VAZ-Zyklus in *E. gracilis* in der vorliegenden Arbeit nicht. Dennoch wurden sehr geringe Mengen an Pigmenten gefunden, die die gleichen Retentionszeiten sowie Online-Spektren aufwiesen wie die Referenzpigmente Vx, Ax und Zx aus Spinat. Allerdings reichten die vorgefundenen Konzentrationen nicht aus, um die Pigmentidentitäten durch den Nachweis von Epoxidgruppen mittels Furanoidumlagerung abzusichern (siehe Material und Methoden, Kap. 6.2.3). Entsprechend ist das Vorliegen von Vx, Ax und Zx in *E. gracilis* durch weitere Untersuchungen zu bestätigen. Doch deuten die vorläufigen Ergebnisse bereits auf die Möglichkeit hin, daß Ddx in *E. gracilis* ebenfalls über Vx als Zwischenverbindung synthetisiert wird.

Abgesehen von der grundsätzlichen Gemeinsamkeit, daß neben den Pigmenten des DT-Zyklus auch die des VAZ-Zyklus akkumuliert werden können, zeigten die untersuchten Algen eine Reihe individueller Besonderheiten, auf die an dieser Stelle noch etwas näher eingegangen wird. Zunächst fällt bei der im Batchverfahren angezogenen Kultur von *P. tricornutum* auf, daß sie während der sechsständigen Starklichtperiode deutlich weniger Zx akkumulierte als eine an periodisches Starklicht akklimatisierte Turbidostatkultur (vgl. Abb. 3.26.A mit Abb. 3.8). Allerdings betrug die PFD während der

Starklichtphase im vorliegenden Experiment lediglich $500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Als Ursache hierfür stellte sich erst im Anschluß an den Versuch eine alterungsbedingte Intensitätsminderung der verwendeten Starklichtquelle heraus. Die verminderte Starklichtintensität führte in Einklang mit den Untersuchungen in Kap. 1.6.1 zu einer geringeren Akkumulation von Zx. Die dort bei sechsstündiger Belichtung von *P. tricornutum* mit $500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ beobachtete Relation der Zuwächse von DT- und VAZ-Pool (Abb. 3.9) zeigt gute Übereinstimmung mit den Verhältnissen im vorliegenden Experiment. Die in Abb. 3.26.A gezeigten Daten der Epoxidierung von Dtx in *P. tricornutum* nach der Starklichtperiode können auch für eine vorsichtige Abschätzung des Einflusses der Starklichtintensität auf die Epoxidase-Aktivität herangezogen werden. Zwar ist bei lediglich drei Meßpunkten in Abb. 3.26.A (360, 370 und 380 min) die Analyse der zugehörigen Epoxidierungskinetik nur von bedingter Aussagekraft; doch ergibt eine Abschätzung der Epoxidierungsrate k_{TD} anhand dieser Daten einen Wert von etwa $0,2 \cdot \text{min}^{-1}$ und ist somit um den Faktor 3,3 größer als in den Turbidostatkulturen, die einer Starklichtintensität von $700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ausgesetzt waren (Tab. 3.9). Bei Zugrundelegen einer parallelen Aktivität von Deepoxidase und Epoxidase im Starklicht, wie sie in Kap. 2.2 diskutiert wurde, fordert die vorliegende Beobachtung eine Erweiterung der in Kap. 1.8 aufgeführten Ursachen für die Zx-Akkumulation im Starklicht. Demnach ist nicht allein die Aktivität der Deepoxidase, sondern das Verhältnis von Deepoxidase- und Epoxidase-Reaktion für die Zunahme von Zx maßgeblich. Eine Verlagerung der Carotinoidbiosynthese in Richtung Zx kann folglich nicht nur durch eine erhöhten Deepoxidase-Aktivität, sondern auch durch eine verminderte Epoxidierungsrate verursacht sein.

Die andere untersuchte Kieselalge *C. meneghiniana* zeigte im Starklicht etwa den gleichen Zuwachs an Xanthophyllzykluspigmenten wie *P. tricornutum*, doch akkumulierte sie deutlich größere Mengen an Zx auf Kosten der Dtx-Zunahme (Abb. 3.26.B). Da die Starklichtintensität im Fall von *C. meneghiniana* aber $700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ betrug, entspricht dieser Befund den Erwartungen. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den zuvor dargestellten Ergebnissen (Abb. 3.23) war im Anschluß an die Starklichtphase eine rasche Abnahme des VAZ-Pools bei gleichzeitiger Zunahme des DT-Pools (Abb. 3.26.B) zu beobachten. Dabei zeigte die Epoxidierung in beiden Xanthophyllzyklen etwa den gleichen zeitlichen Verlauf wie bei *P. tricornutum* (Abb. 3.26.A).

Die beiden untersuchten Xanthophyceen wiesen bereits vor der Starklichtphase ein merkliche Menge an Vx auf (Abb. 3.26.C-D). Besonders auffällig ist dies bei *Mischococcus sphaerocephalus*; hier war im Zuge der Starklichtinkubation auch die stärkste Zx-Akkumulation zu beobachten. Sowohl *M. sphaerocephalus* als auch *Pleurochloris meiringensis* zeigten im Starklicht eine geringere Zunahme des DT-Pools als die beiden untersuchten Diatomeen, obwohl alle vier Algenarten zu Beginn der Starklichtphase vergleichbare Mengen an Ddx aufwiesen. Allerdings wurde die minimale Zunahme des DT-Pools in *M. sphaerocephalus* durch eine entsprechend große Zunahme des VAZ-Pools kompensiert. Die nach 6 h Starklicht verbliebene Menge an Ddx betrug in beiden Algen wie schon bei den Diatomeen etwa $50 \text{ mmol pro mol Chl a}$.

Die beiden Haptophyten (Abb. 3.26.E-F) hatten nach 6 h Starklicht bezogen auf ihren Chl a-Gehalt die mit Abstand größten Mengen an Xanthophyllzykluspigmenten akkumuliert; ihre Konzentration lag bei über 500 mmol pro mol Chl a. *Pavlova lutheri* wies jedoch schon vor der Starklichtinkubation mit 400 mmol Ddx pro mol Chl a einen sehr hohen Gehalt dieses Pigmentes auf. In beiden Haptophyten betrug der Restgehalt an Ddx nach 6 h Starklicht wie bei den zuvor genannten Algen etwa 50 mmol pro mol Chl a. Auffällig war, daß *Prymnesium parvum* am Ende der Starklichtphase einen ebenso große Menge an Vx aufwies und der Deepoxidierungsgrad des VAZ-Pools infolgedessen bei lediglich 50% lag. Wie bereits in Kap. 2.5 beim analogen Fall des CE-Pools in *P. tricornutum* diskutiert, könnte das im Starklicht in *P. parvum* vorliegende Vx entweder an Thylakoidmembranproteine gebunden oder in den Hüllmembranen lokalisiert sein; in beiden Fällen wäre es für die Deepoxidase nicht zugänglich.

Beim Dinoflagellat *Amphidinium carterae* schließlich fällt auf, daß mit einsetzendem Starklicht nur ein geringer Anteil des vorhandenen Ddx deepoxidiert wurde und auch nach 6 h Starklicht noch fast 200 mmol Ddx pro mol Chl a vorlagen; der Deepoxidierungsgrad des DT-Pools betrug zu diesem Zeitpunkt lediglich 40%. Da auch die Epoxidierung von Dtx im nachfolgenden Schwachlicht relativ langsam verlief, sollte der hohe Ddx-Anteil im Starklicht nicht durch eine höhere Starklichtaktivität der Epoxidase im Vergleich zu den anderen Algen verursacht sein. Demnach scheint ein großer Teil des Ddx in *A. carterae* für die Deepoxidierung nicht verfügbar zu sein. Vergleichbare Beobachtungen machten Demers et al. (1991) am Dinoflagellaten *Alexandrium excavatum*. Auch hier erreichte der DT-Pool bei einem Lichtintensitätswechsel von $50 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ zu $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ einen Deepoxidierungsgrad von lediglich 40%, wobei im Starklicht etwa 200 mmol Ddx pro mol Chl a verblieben; allerdings betrug die Starklichtperiode nur 1 h. Ebenso wurde in Freilandexperimenten für den DT-Pool von Dinoflagellaten, die symbiotisch in Korallen leben, selbst bei Lichtintensitäten von über $2000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ein Deepoxidierungsgrad von maximal 40% ermittelt; auch in diesem Fall verblieben mehr als 200 mmol Ddx pro mol Chl a (Ambarsari et al. 1997, Brown et al. 1999). Weitere Untersuchungen der DT-Zyklus-Pigmente in Dinophyten beschränkten sich darauf, die Pigmentgehalte von Schwachlicht- und Starklichtkulturen miteinander zu vergleichen (Johnsen und Sakshaug 1993, Latasa 1995, Jovine et al. 1995, Johnsen et al. 1997). Dabei wies der DT-Pool in allen untersuchten Algen, solange sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, auch unter Starklicht (150 bis $500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) einen maximalen Deepoxidierungsgrad von nur 10% auf. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden sowohl aus *Prorocentrum minimum* als auch aus *Heterocapsa pygmaeae* zwei Formen des membranintrinsic Chl a-Chl c_2 -Peridinin-Proteins (iPCP bzw. ACP) isoliert, die unterschiedliche Mengen an Ddx binden (Jovine et al. 1995, Johnsen et al. 1997). Die auf Starklichtkulturen beschränkte Isoform weist einen deutlich höheren Ddx-Anteil auf als die konstitutive Isoform, wobei Ddx in beiden LHC-Typen nicht an der Lichtsammlung beteiligt zu sein scheint (Johnsen et al. 1997). Diese Befunde deuten darauf hin, daß in Dinoflagellaten möglicherweise bereits Ddx eine photoprotektive Funktion ausübt (Johnsen et

al. 1994, 1997) und der DT-Zyklus in diesem Zusammenhang möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielt. Zur Klärung dieses Sachverhaltes bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen an Schwachlichtkulturen unter mehrstündiger Starklichtinkubation. Abschließend ist noch zu bemerken, daß der VAZ-Pool in *A. carterae* im Anschluß an die Starklichtphase sehr rasch abnahm (Abb. 3.26.G). Eine vergleichbare Abnahme wurde auch bei der Diatomee *C. meneghiniana* beobachtet (Abb. 3.26.B). Im Gegensatz zu *A. carterae* war dort jedoch auch eine entsprechende Zunahme des DT-Pools feststellbar. Das Ausbleiben eines vergleichbaren Anstiegs des DT-Pools in *A. carterae* beruht nicht auf Meßungenauigkeiten. Vielmehr werden die Pigmente des VAZ-Pools in das Xanthophyll Dincoxanthin umgewandelt. Die experimentellen Daten hierzu werden in Kap. 3.2.7 im Rahmen einer genaueren Untersuchung der Biosyntheseverknüpfungen der Xanthophylle in Dinoflagellaten dargestellt.

3.1.2 Violaxanthinhaltige Algen: Raphidophyceae, Chrysophyceae, Eustigmatophyceae

Auch die drei ausgewählten Vx-haltigen Algen zeigten Xanthophyllzyklusaktivität (Abb. 3.27). Allerdings waren nur die Pigmente des VAZ-Zyklus nachweisbar, Ddx und Dtx wurden weder zu Beginn noch nach der Starklichtinkubation detektiert (Nachweisgrenze der Messungen bei 0,1 mmol pro mol Chl a). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen, wonach die untersuchten Algen nicht dazu in der Lage sind, Xanthophylle mit acetylenischer Gruppe zu synthetisieren (Norgård et al. 1974, Antia und Cheng 1982, Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989, Mostaert et al. 1998).

Weiterhin fällt auf, daß alle drei Algen mit einsetzendem Starklicht zunächst nur sehr geringe Mengen an Zx bilden; entsprechend langsam sinkt die Vx-Konzentration. Bei der Chrysophycee *Ochromonas danica* nehmen Ax und Zx sogar ohne eine entsprechende Abnahme von Vx zu. Nach 6 h Starklicht hat die Raphidophycee *Olisthodiscus luteus* große Mengen an Zx akkumuliert. *O. danica* dagegen zeigt einen starken Zuwachs an Vx, während die Eustigmatophycee *Nannochloropsis salina* ihren VAZ-Pool kaum vergrößert hat. Zudem weist *N. salina* auch nach der Starklichtphase noch einen sehr hohen Vx-Gehalt von etwa 200 mmol pro mol Chl a auf, sein Anteil am VAZ-Pool lag bei 60%. Dieser Befund steht in Einklang mit Beobachtungen von Lubian und Montero (1998) an der Eustigmatophycee *Nannochloropsis gaditana*. Auch *N. gaditana* enthielt nach einer vierstündigen Starklichtphase ($2000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) noch 240 mmol Vx pro mol Chl a, und der Anteil von Vx am VAZ-Pool betrug 84%. In Eustigmatophyceen stellt Vx – im Gegensatz zu den anderen Vx-haltigen Chromophyten – mehr als 50% der Gesamtcarotinoide (Owens et al. 1987, Brown 1987, Aarslane et al. 1992; siehe auch Kap. 3.2). Dieser hohe Vx-Gehalt ist dadurch erklärbar, daß Vx in dieser Algenklasse nachweislich Lichtsammelfunktion hat (Owens et al. 1987, Trautman et al. 1990). Der auch im Starklicht unverändert hohe Vx-Gehalt ist demnach höchstwahrscheinlich auf eine feste Bindung dieser Pigmentmoleküle an die LHC-Komplexe zurückzuführen, die ihrer Deepoxidierung entgegensteht. Hierfür spricht auch die Beobachtung von Lubian und Montero (1998), daß durch Starklichtinkubation bei 40 °C bis zu 75% des Vx in *N. gaditana* deepoxidierbar werden. Bei dieser unphysiologisch hohen Temperatur ist eine Destabilisierung der Pigment-Protein-Komplexe

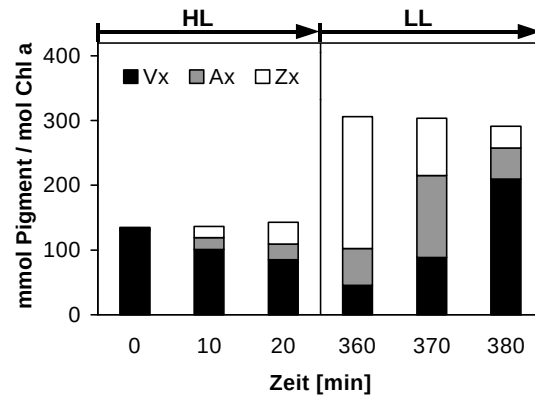
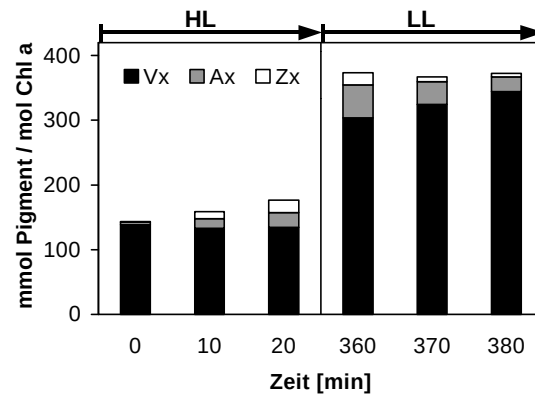
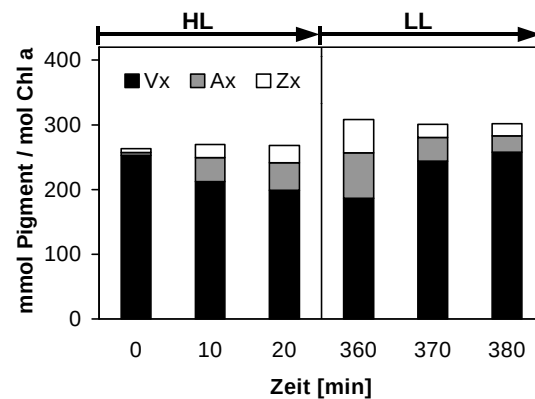
A) Raphidophyceae: *Olisthodiscus luteus*

B) Chrysophyceae: *Ochromonas danica*

C) Eustigmatophyceae: *Nannochloropsis salina*


Abb. 3.27 Vorkommen des VAZ-Zyklus in Vx-haltigen Algen. Alle untersuchten Algen stammten aus Batchkulturen. Sie wurden 1 h vor Versuchsbeginn in Turbidostatanzuchtgefäße überführt und als Airliftkulturen zunächst im Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) vorinkubiert (für weitere Details siehe Material und Methoden, Kap. 2.2 und Kap. 3.1). Dann wurden die Algen 6 h mit Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und anschließend erneut mit Schwachlicht bestrahlt und dabei die Änderungen der Xanthophyllzyklus-pigmente während der ersten 20 min der Starklichtphase (0, 10 und 20 min nach Versuchsbeginn) sowie der nachfolgenden Schwachlichtinkubation (360, 370 und 380 min nach Versuchsbeginn) verfolgt.

unter Dissoziation von Vx sehr wahrscheinlich, wie z.B. Untersuchungen zur Thermostabilität von FCP-Komplexen aus Braunalgen (Kirk 1977) oder dem LHC II der Höheren Pflanzen (Hobe et al. 2000) zeigen.

Die hohe Starklichtkonzentration von Vx in der Chrysophyce *O. danica* könnte ebenfalls durch eine statische Bindung von Vx an Thylakoidmembranproteine hervorgerufen sein. *O. danica* besitzt neben einem Chl a-Chl c-Fx-Protein einen weiteren intrinsischen LHC-Komplex mit einer apparenten Molekularmasse von 31 kDa, der nur Chl a und ein Carotinoid bindet (Gibbs und Biggins 1991). Zwar steht eine genaue Pigmentanalyse dieses Komplexes noch aus, doch handelt es sich bei dem Carotinoid höchstwahrscheinlich nicht um Fx (Gibbs und Biggins 1991). Da andererseits der β -Carotin-Gehalt von *O. danica* nicht signifikant größer ist als in anderen Algen (vgl. auch Kap. 3.2) und dieses Pigment analog zu den Verhältnissen in Höheren Pflanzen in erster Linie an die Core-Komplexe von PS I und PS II gebunden sein sollte (Yamamoto und Bassi 1996), könnte es sich bei dem Carotinoid des 31-kDa-LHC-Komplexes um Vx handeln. Weitere Versuche von Gibbs und Biggins (1991) sprechen für eine strukturelle Bindung der Pigmente an den Komplex, wobei jedoch aus Fluoreszenz-Excitationsspektren hervorging, daß das Carotinoid keine Energie auf Chl a überträgt. Sollte es sich bei diesem Carotinoid tatsächlich um Vx handeln, könnte es möglicherweise eine ähnliche Lichtschutzfunktion innehaben, wie sie für Ddx im Falle der Dinoflagellaten diskutiert wird (siehe Kap. 3.1.1). Doch ist diese Interpretationsmöglichkeit bis zu einer detaillierten Charakterisierung des 31-kDa-Pigment-Protein-Komplexes in *O. danica* als rein spekulativ zu betrachten. Schließlich könnte der geringe Deepoxidierungsgrad des VAZ-Pools in *O. danica* auch mit der photoheterotrophen Anzucht dieser Alge in Zusammenhang stehen. *O. danica* wurde als einzige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Algen in einem komplexen Medium kultiviert, das Glucose, Trypton, Leberkonzentrat und Hefeextrakt enthielt (siehe Anhang A.6). Wie im nachfolgenden Kapitel dargestellt wird, zeigte die *O. danica*-Kultur sowohl im Schwachlicht als auch unter Starklicht die mit Abstand höchsten Pigmentzuwachsraten aller untersuchten Algen. Dies deutet auf eine für Schwachlichtbedingungen ungewöhnlich hohe Wachstumsrate der Algen, die sich wahrscheinlich über die zusätzliche mitochondriale Energiegewinnung bei mixotropher Ernährungsweise erklärt. Zugleich wies *O. danica* von allen Fx-haltigen Algen die niedrigste Fx/Chl a-Stöchiometrie auf. Möglicherweise bildet die Alge unter mixotrophen Wachstumsbedingungen einen reduzierten Lichtsammelapparat aus, da die Chloroplasten einen geringeren Beitrag zur Energiegewinnung der Zellen leisten müssen. So erscheint denkbar, daß die hier verwendeten Starklichtbedingungen bei *O. danica* einen geringeren Starklichtstreß induzierten als in den weiteren untersuchten Algen und daß *O. danica* eine entsprechend geringere Xanthophyllzyklusaktivität aufwies. Auch diese Möglichkeit bedarf einer weiteren Untersuchung.

3.2 Biosyntheseverknüpfung zwischen den Xanthophyllzykluspigmenten und den Lichtsammelxanthophyllen in Chromophyten

Für die folgenden Experimente wurde aus jeder der bereits im vorigen Kapitel untersuchten Algengruppen ein Vertreter ausgewählt, wobei auch die beiden Diatomeen *P. tricornutum* und *C. meneghiniana* wieder in die Untersuchungen einbezogen waren. Dabei standen zwei Schwerpunkte im Vordergrund. Zum einen wurde die Biosyntheseverknüpfung der in der jeweiligen Alge vorkommenden Xanthophylle untersucht. Dies geschah durch sechsstündige Schwachlichtinkubation der Algen unter Hemmung der Carotinoidbiosynthese mittels Norflurazon. Durch einen Vergleich der Pigmentkonzentrationen der Kulturen zu Beginn der Versuche und nach 6 h Schwachlicht wurde – wie schon im Falle der Turbidostatkulturen (Kap. 1.7) – ermittelt, welche Carotinoide als Precursor für die Biosynthese der jeweiligen Lichtsammelxanthophylle dienen können. Dabei wurden neben Schwachlichtkulturen auch Algen verwendet, die zuvor für 6 h im Starklicht inkubiert worden waren. Hierdurch ließ sich in Algen, die unter Starklicht sowohl die Pigmente des DT- als auch die des VAZ-Zyklus akkumulieren, auch die Biosyntheseverknüpfung zwischen diesen beiden Pools studieren. In beiden Fällen wurde als Kontrolle ein Aliquot der jeweiligen Kultur ohne Norflurazon bei ansonsten identischen Bedingungen kultiviert.

Zum anderen sollte geklärt werden, ob sich die bereits an den Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* gemachte Beobachtung verallgemeinern läßt, daß Algen beim Wechsel von Schwachlicht zu Starklicht zunächst einen unverändert hohen Carotinoidzuwachs bei stagnierendem Chlorophyllgehalt aufweisen, während im nachfolgenden Schwachlicht die Carotinoidbiosynthese zugunsten der Chlorophyllbildung gedrosselt wird (Kap. 1.1 und 1.7). Hierzu wurde jede Algenkultur zu Versuchsbeginn in zwei Aliquots aufgeteilt und die eine Hälfte 6 h im Starklicht und anschließend weitere 6 h im Schwachlicht inkubiert. Die andere Hälfte wurde während der gesamten Zeit unter Schwachlichtbedingungen gehalten und diente als Kontrolle.

Im folgenden werden die Ergebnisse für jede der ausgewählten Algen einzeln dargestellt und diskutiert. Zunächst werden die Fx-haltigen Algen betrachtet, dann folgen die Arten, die Vaucheriaxanthin-Ester enthalten und schließlich die peridininhaltigen Dinoflagellaten. An diese Ausführungen schließt sich eine Zusammenfassung der wichtigsten Gemeinsamkeiten der untersuchten Algengruppen an.

3.2.1 Heterokontophyta, Bacillariophyceae: *Phaeodactylum tricornutum* und *Cyclotella meneghiniana*

Die nachfolgende ausführliche Erläuterung der Daten der Diatomee *P. tricornutum* dient als exemplarische Einführung in die Darstellungsform, die auch für die Ergebnisse aller weiteren Algenarten beibehalten wurde. Auf dieser Grundlage beschränkt sich die Beschreibung der an den weiteren Algen gesammelten Daten auf die wesentlichen Resultate.

Die für die grafische Darstellung aller Pigmentänderungen gewählte Form wurde aus den experimentellen Daten folgendermaßen erstellt. Zunächst wurde die Konzentration aller Pigmente zu

Versuchsbeginn (t_0) auf den Chl a-Gehalt bezogen, wobei die Berechnung des normierten Gehaltes N_P eines Pigmentes nach der folgenden Formel erfolgte:

$$N_P(t_0) = P(t_0) / \text{Chl a}(t_0) \cdot 1000 \quad [\text{mmol} \cdot \text{mol Chl a}(t_0)^{-1}] \quad (3.19)$$

mit $N_P(t_0)$ = auf Chl a normierter Gehalt des Pigmentes P zum Zeitpunkt t_0
 $P(t_0)$ = absoluter Gehalt des Pigmentes P zu Zeitpunkt t_0 in $[\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$
 $\text{Chl a}(t_0)$ = absoluter Gehalt an Chl a zum Zeitpunkt t_0 in $[\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$

Die nach einer Inkubationszeit t gemessene Chl a-Konzentration wurde ebenfalls auf den Ausgangsgehalt an Chl a zum Zeitpunkt t_0 bezogen:

$$N_{\text{Chl a}}(t) = \text{Chl a}(t) / \text{Chl a}(t_0) \cdot 1000 \quad [\text{mmol} \cdot \text{mol Chl a}(t_0)^{-1}] \quad (3.20)$$

mit $N_{\text{Chl a}}(t)$ = Chl a-Gehalt zum Zeitpunkt t , normiert auf den Chl a-Gehalt zum Zeitpunkt t_0
 $\text{Chl a}(t)$ = absoluter Gehalt an Chl a zum Zeitpunkt t in $[\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$

Mit den Konzentrationen der anderen Pigmente zum Zeitpunkt t wurde ebenso verfahren:

$$N_P(t) = N_{\text{Chl a}}(t) \cdot P(t) / \text{Chl a}(t) \quad [\text{mmol} \cdot \text{mol Chl a}(t_0)^{-1}] \quad (3.21)$$

mit $N_P(t)$ = Gehalt des Pigmentes P zum Zeitpunkt t , normiert auf Chl a zum Zeitpunkt t_0
 $P(t)$ = absoluter Gehalt an Pigment P zum Zeitpunkt t in $[\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$

Die Konzentrationsänderung jedes Pigmentes im Versuchsverlauf wird in den nachfolgenden Abbildungen stets als Differenz zwischen den normierten Werten des Anfangsgehaltes $N_P(t_0)$ und des Gehaltes $N_P(t)$ zum Zeitpunkt t angegeben; dies gilt auch für die Änderung des Chl a-Gehaltes.

Wurde eine *P. tricornutum*-Kultur mit Norflurazon versetzt und dann für 6 h unter Schwachlichtbedingungen inkubiert, so war zunächst zu beobachten, daß der Zuwachs an Chl a im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne Norflurazon nur noch etwa halb so hoch ausfiel (Abb. 3.28.A; die Pigmentstöchiometrien zu Versuchsbeginn sind in Tab. 3.15 angegeben). Der Gesamtgehalt an Carotinoiden nahm sogar leicht ab, doch akkumulierten infolge der Norflurazon-bedingten Hemmung der Phytoen-Desaturase große Mengen an Phytoen. Dabei entsprach die Menge an gebildetem Phytoen in etwa dem Zuwachs der Carotinoide in der Kontrollkultur. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die frühen Schritte der Carotinoidbiosynthese in den Norflurazon-behandelten Algen mit unverminderter Rate ablaufen.

Eine detailliertere Analyse der Carotinoidänderungen ergab, daß der DT-Pool – bezogen auf den Chl a-Gehalt zu Versuchsbeginn – um gut 50 mmol pro mol Chl a abnahm, das entspricht 33% der Ausgangsmenge von 151 mmol pro mol Chl a (vgl. Abb. 3.28.A und Tab. 3.15). Währenddessen

zeigte das Lichtsammelxanthophyll Fx einen Anstieg um 30 mmol; die Änderungen der weiteren Carotinoide waren vernachlässigbar klein. Hieraus läßt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kap. 1.7 folgern, daß Ddx in *P. tricornutum* als Vorstufe für Fx dient. Da der Fx-Zuwachs aber nur etwa zwei Dritteln der Abnahme des DT-Pools entspricht, wird offensichtlich ein Teil des DT-Pools unter Norflurazon abgebaut. Anhand der vorliegenden Daten läßt sich jedoch nicht entscheiden, ob dieser Abbau von einem regulären Pigment-Turnover herrührt oder durch erhöhten oxidativen Streß infolge der Hemmung der Carotinoidbiosynthese verursacht wird. Auch die Halbierung des Zuwachses an Chl a unter Norflurazon könnte als Anzeichen für oxidativen Streß gewertet werden. Alternativ besteht aber die bereits in Kap. 1.8 diskutierte Möglichkeit, daß die unter Hemmung der Carotinoidbiosynthese limitierte Neusynthese von Fx auch eine weitere Akkumulation von Chl a verhindert.

Tab. 3.15 *Pigmentstöchiometrien in P. tricornutum und in C. meneghiniana im Schwachlicht bzw. nach 6 h Starklicht (500 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils drei (LL) bzw. zwei (nach HL) Meßproben derselben Kultur dar; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug maximal 10 mmol pro mol Chl a für Fx, 5 mmol für Ddx und Dtx, 3 mmol für Chl c und b-Carotin und höchstens 1 mmol pro mol Chl a für die anderen Pigmente. Neben den in der Tabelle aufgeführten Carotinoiden wurden in beiden Algen geringe Mengen an Cx, CxE, dem b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll, Dinoxanthin sowie trans-Neoxanthin detektiert (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide.*

	Chl c	Fx	Ddx	Dtx	β -Car	Vx	Ax	Zx	Caroide
<i>P. tricornutum</i>									
LL	150	720	151	1	57	3	1	0	933
nach HL	148	664	44	259	60	10	6	18	1061
<i>C. meneghiniana</i>									
LL	121	543	145	4	46	1	1	0	740
Nach HL	117	529	78	227	49	2	2	7	894

Eine sechsstündige Vorbelichtung von *P. tricornutum* mit Starklicht bei einer PFD von 500 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ führte, wie bereits in Kap. 3.1.1 diskutiert worden ist, zu einer relativ geringen Akkumulation der Pigmente des VAZ-Pools und einer deutlichen Zunahme des DT-Pools (Tab. 3.15). Während der anschließenden Schwachlichtperiode verhielten sich die Algen unter Norflurazon und die Kontrollkultur nahezu identisch (Abb. 3.28.B). Beide Ansätze zeigten vergleichbare Zuwächse an Chl a, wobei nicht nur in der inhibierten Kultur, sondern auch in der Kontrolle praktisch kein Anstieg

der Carotinoide mehr zu beobachten war. Offensichtlich resultierte der Wechsel von Stark- zu Schwachlicht in einer drastischen Reduktion der Carotinoidbiosynthese, wie auch die geringe Phytoen-Akkumulation in der mit Norflurazon versetzten Kultur belegt. Eine detailliertere Analyse der Carotinoide ergab, daß der VAZ-Pool in den Algen nahezu vollständig umgesetzt wurde und auch der DT-Pool deutlich abnahm, während der Fx-Gehalt wieder eine entsprechende Zunahme zeigte (Abb. 3.28.B). Allerdings ist anhand der in Abb. 3.28 dargestellten Daten nicht erkennbar, daß der VAZ-Pool in *P. tricornutum* als Vorläufer des DT-Pools fungiert. Wie auch aus Abb. 3.22 in Kap. 2.3 deutlich wird, hätten für diesen Nachweis bereits während der ersten 2-3 h der Schwachlichtphase Pigmentanalysen durchgeführt werden müssen, denn aufgrund der relativ niedrigen PFD während der Starklichtphase und der damit verbundenen geringen Akkumulation des VAZ-Pools setzt unter Norflurazon die Abnahme des DT-Pools deutlich früher ein als nach Inkubation bei einer hohen Starklichtintensität. Somit läßt sich anhand der Daten in Abb. 3.28 die Aussage treffen, daß in *P. tricornutum* die Pigmente der Xanthophyllzyklus-Pools als Precursor für die Biosynthese des Lichtsammelxanthophylls Fx mobilisiert werden können.

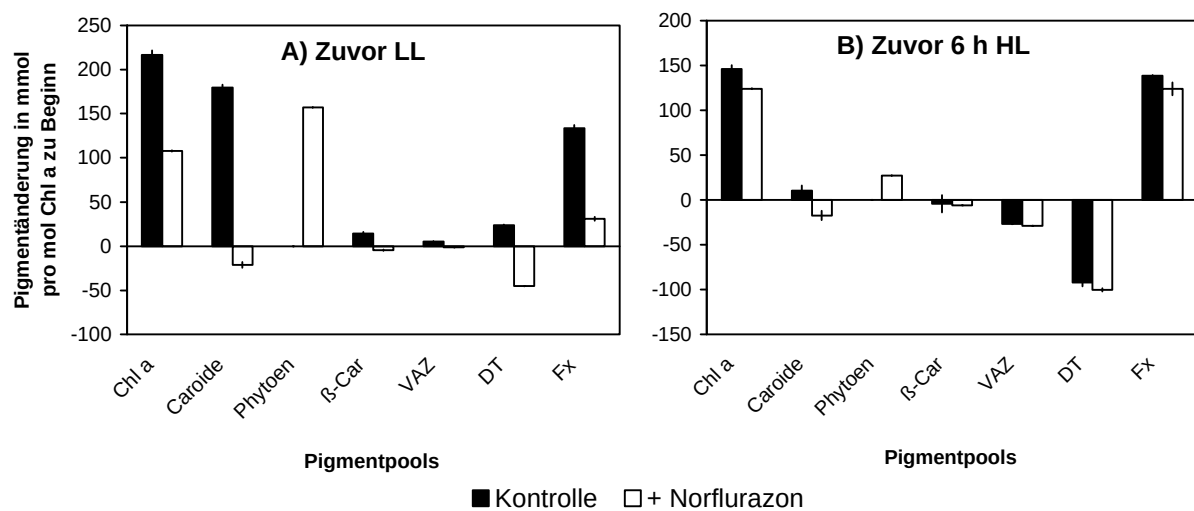


Abb. 3.28 Änderungen der Pigmentgehalte in *P. tricornutum* nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. Die Algen stammten aus Batchkulturen und wurden für die Versuche in Turbidostatanzuchtgefäße überführt (für weitere Details siehe Material und Methoden, Kap. 2.2 und Kap. 3.1). In (A) wurde die Kultur vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert, in (B) wurden die Algen vor der Zugabe von Norflurazon 6 h mit Starklicht ($500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Alle Pigmentänderungen beziehen sich auf den Chl a-Gehalt der jeweiligen Kultur bei Zugabe von Norflurazon, also zu Beginn der sechsstündigen Schwachlichtperiode. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Messungen von zwei unmittelbar hintereinander genommenen Proben derselben Kultur; die Fehlerbalken geben die Differenz der beiden Meßwerte des jeweiligen Pigmentes an. Car = Carotin, Carotide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

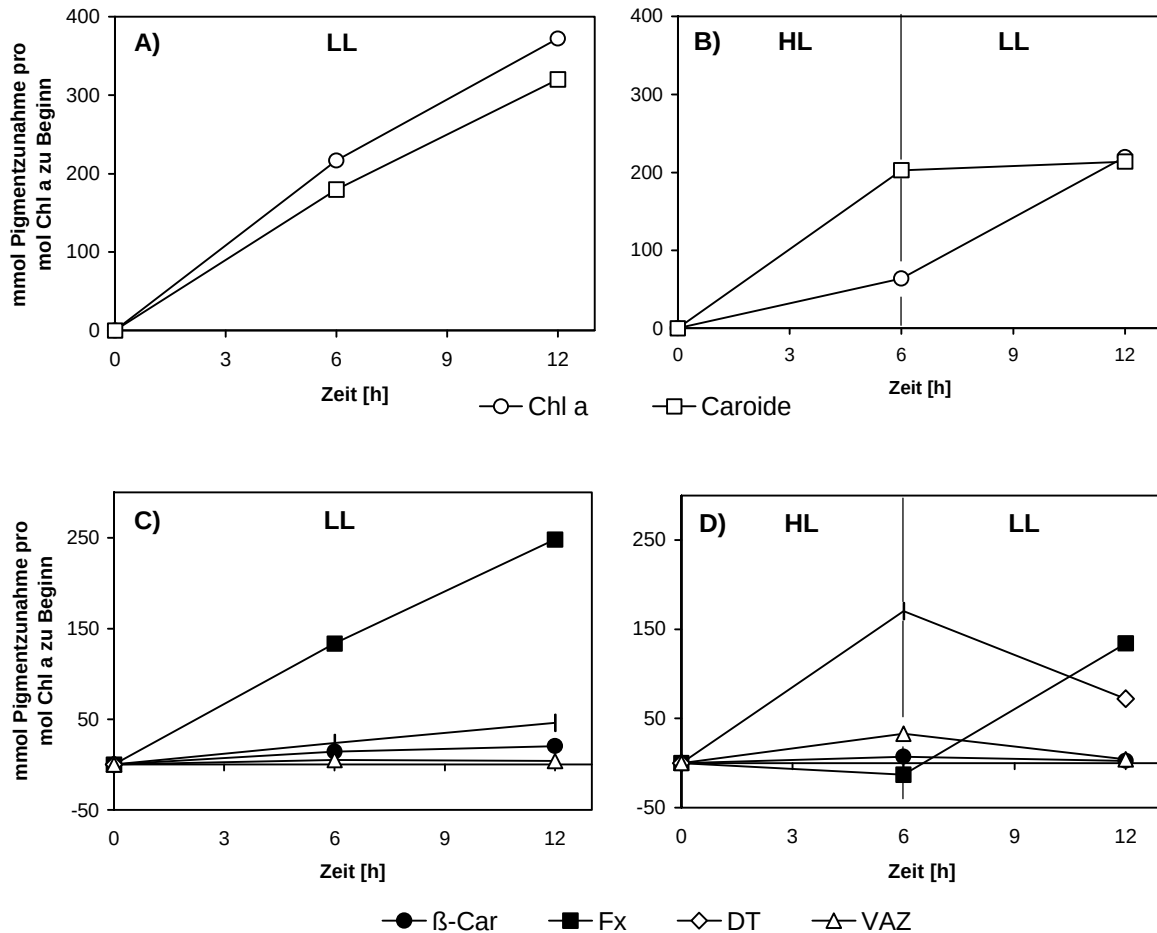


Abb. 3.29 Änderungen der Pigmentgehalte in *P. tricornutum* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Die untersuchten Algen stammten aus Batchkulturen. Sie wurden 1 h vor Versuchsbeginn in Turbidostatanzuchtgefäße überführt und als Airliftkulturen zunächst im Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vorinkubiert (für weitere Details siehe Material und Methoden, Kap. 2.2 und Kap. 3.1). Alle Pigmentänderungen beziehen sich auf den Chl a-Gehalt der jeweiligen Kultur bei Versuchsbeginn ($t = 0 \text{ h}$). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen von zwei unmittelbar hintereinander genommenen Proben derselben Kultur; die Differenz der beiden Meßwerte eines Probenpaars ist wie schon bei den Daten in Abb. 3.28 praktisch vernachlässigbar klein und deshalb nicht dargestellt. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

Die Bedeutung dieser Biosyntheseverknüpfung für die Xanthophyllbiosynthese unter wechselnden Lichtintensitäten wird in Abb. 3.29 erkennbar. Als Kontrollkultur dienende Algen, die während der 12stündigen Versuchsdauer permanentem Schwachlicht ausgesetzt waren, zeigten in dieser Zeit erwartungsgemäß eine kontinuierliche Zunahme aller Photosynthesepigmente (Abb. 3.29.A und C). Dabei korrelierte der absolute Zuwachs der einzelnen Pigmente mit ihrem stöchiometrischen Anteil

am Gesamtpigment in *P. tricornutum* (siehe Tab. 3.15). Entsprechend betrug der Anstieg der Carotinoide etwa 90% des Zugewinns an Chl a (Abb. 3.29.A), wobei innerhalb der Carotinoide in erster Linie Fx zunahm (Abb. 3.29.C). Wurden die Algen dagegen zunächst für 6 h im Starklicht inkubiert, so entsprach der Zuwachs der Carotinoide zwar noch dem der Kontrollkultur, doch der Chl a-Gehalt stieg deutlich langsamer an als im Schwachlicht (Abb. 3.29.B). Die Aufschlüsselung des Carotinoidzuwachses (Abb. 3.29.D) zeigt, daß der Fx-Gehalt stagnierte und der Anstieg der Carotinoide allein auf die Zunahme der Xanthophyllzykluspigmente zurückzuführen war. Während der an die Starklichtperiode anschließenden sechsstündigen Schwachlichtphase ergab sich eine Umkehrung der Verhältnisse: Nun war kein weiterer Carotinoidzuwachs mehr zu verzeichnen, während der Chl a-Gehalt in der Algensuspension stark zunahm (Abb. 3.29.B). Parallel zur Chl a-Zunahme stieg die Fx-Konzentration an, dagegen zeigten die Xanthophyllzykluspigmente eine entsprechende Abnahme (Abb. 3.29.D); die Konzentration an β -Carotin blieb während der gesamten Zeit nahezu unverändert.

Zusammenfassend wird aus den in Abb. 3.28 und 3.29 dargestellten Messungen deutlich, daß *P. tricornutum* die im Starklicht akkumulierten Lichtschutzpigmente der Xanthophyllzyklen (DT-Pool und VAZ-Pool) während der anschließenden Schwachlichtphase zur Synthese des Lichtsammelxanthophylls Fx weiterverwendet; die Algen betreiben also gewissermaßen eine Art von „Xanthophyll-Recycling“. Daraus möglicherweise erwachsende Vorteile für die Algen werden in Kap. 3.3.3 ausführlich diskutiert.

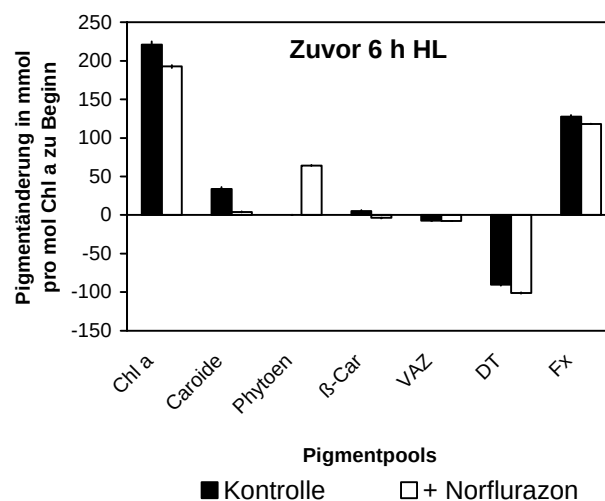


Abb. 3.30 Änderungen der Pigmentgehalte in *C. meneghiniana* nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. Vor Versuchsbeginn wurden die Algen 6 h mit Starklicht ($500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Alle Pigmentänderungen beziehen sich auf den Chl a-Gehalt der Kultur bei Zugabe von Norflurazon, also zu Beginn der sechsstündigen Schwachlichtperiode. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Carotin, Carotide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

Eine Durchführung der für *P. tricornutum* geschilderten Experimente mit der Kieselalge *C. meneghiniana* bestätigte die Erwartung, daß die an *P. tricornutum* gewonnenen Befunde auf andere Diatomeen übertragbar sind. Wurde eine Kultur von *C. meneghiniana* nach sechsstündiger Vorinkubation im Starklicht ($500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) mit Norflurazon versetzt und weitere 6 h unter Schwachlichtbedingungen kultiviert, so zeigte sich wie schon bei *P. tricornutum* ein starker Zuwachs an Chl a, während der Carotinoidgehalt kaum noch anstieg (Abb. 3.30). Dabei korrelierte der Zuegewinn an Chl a mit einer deutlichen Zunahme an Fx, welche wiederum mit einer entsprechenden Abnahme an Xanthophyllzykluspigmenten einher ging. Wie zuvor *P. tricornutum* akkumulierte auch *C. meneghiniana* unter einer Starklichtintensität von $500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ die Pigmente des VAZ-Pools in zu geringer Menge, um deren weitere Umwandlung im Schwachlicht verfolgen zu können (Tab. 3.15); die Funktion des DT-Pools als Reservoir für die Synthese von Fx wird jedoch durch die Daten in Abb. 3.30 klar belegt.

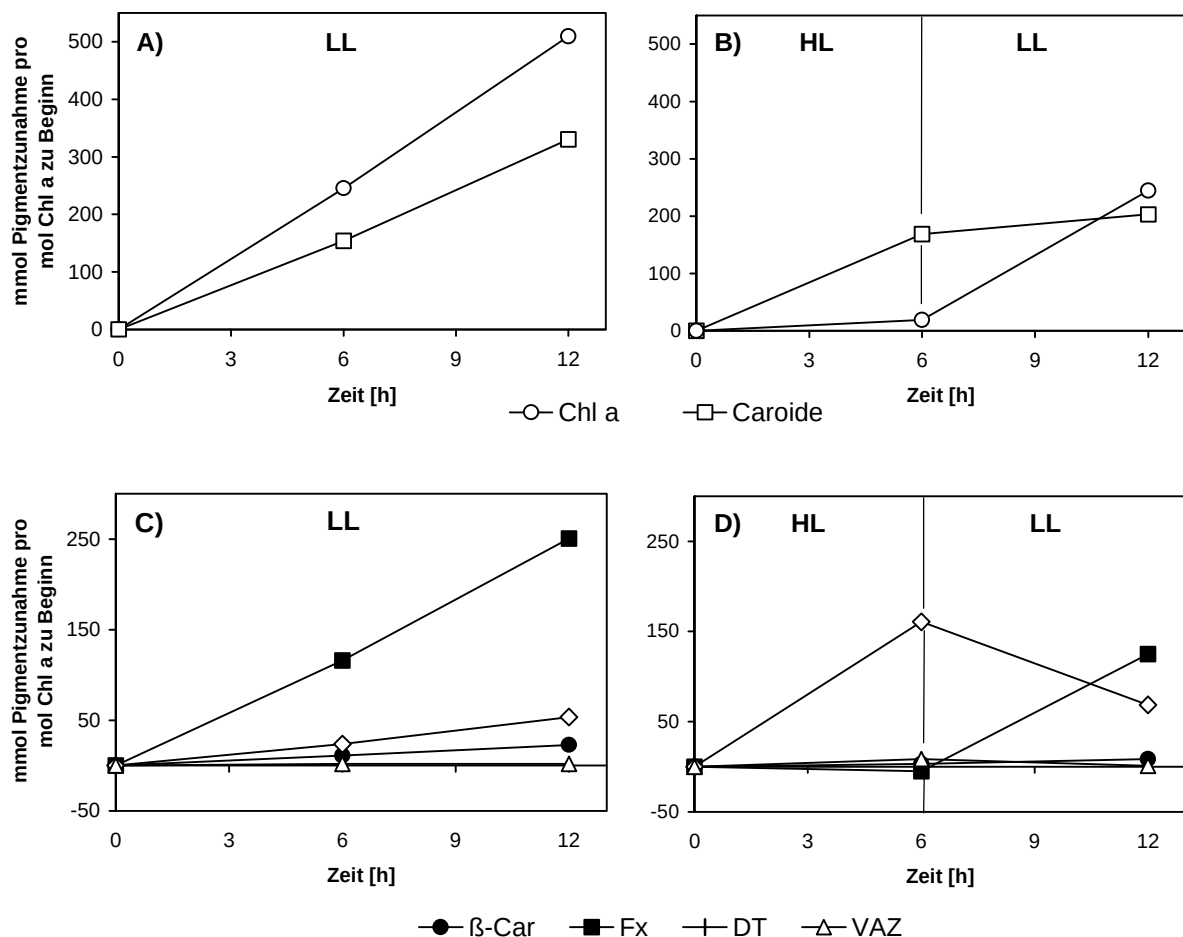


Abb. 3.31 Änderungen der Pigmentgehalte in *C. meneghiniana* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

Die Daten in Abb. 3.31 bestätigen, daß auch *C. meneghiniana* unter einem Lichtintensitätswechsel eine differentielle Regulation von Chlorophyll- und Carotinoidbiosynthese aufweist. Wieder stagniert der Zuwachs an Chl a im Starklicht, während der Anstieg des Carotinoidgehaltes dem einer Kontrollkultur unter Schwachlichtbedingungen entspricht (Abb. 3.31.A-B). Ebenso werden im Starklicht die Xanthophyllzykluspigmente anstelle von Fx akkumuliert (Abb. 3.31.C-D). Auch während der nachfolgenden Schwachlichtphase zeigt die Pigmententwicklung in *C. meneghiniana* das gleiche Muster wie in *P. tricornutum*: Die Konzentration an Chl a und Fx steigt nun wieder an, wobei sich der Carotinoidgesamtgehalt jedoch kaum ändert, da die Fx-Zunahme mit einem entsprechenden Rückgang der Xanthophyllzykluspigmente verbunden ist. Dies bestätigt, daß *C. meneghiniana* ebenso wie *P. tricornutum* die im Starklicht akkumulierten Xanthophyllzykluspigmente während der anschließenden Schwachlichtphase zur Bildung des Lichtsammelxanthophylls Fx weiterverwendet.

3.2.2 Heterokontophyta, Raphidophyceae: *Olisthodiscus luteus*

Wie schon in Kap. 3.1.2 angesprochen wurde, besitzen die Raphidophyceen den VAZ-Zyklus anstelle des DT-Zyklus, ansonsten finden sich jedoch die gleichen Pigmente wie in Kieselalgen. In Tab. 3.16 sind die Pigmentstöchiometrien in den für die Versuche eingesetzten Kulturen von *O. luteus* angegeben.

Tab. 3.16 *Pigmentstöchiometrien in O. luteus im Schwachlicht bzw. nach 6 h Starklicht bei einer PFD von 700 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils drei (LL) bzw. zwei (nach HL) Meßproben derselben Kultur da; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug für Chl c, Fx und b-Carotin maximal 3 mmol, für die anderen Pigmente 1 mmol pro mol Chl a. Neben den aufgeführten Pigmenten fanden sich noch geringe Mengen an Cx, CxE, dem b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll sowie trans-Neoxanthin (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, Dx = Dincoxanthin.*

	Chl c	Fx	β -Car	Vx	Ax	Zx	Dx	Caroide
LL	143	587	69	130	3	3	8	792
Nach HL	141	575	72	46	57	203	2	953

Eine sechsstündige Schwachlichtinkubation von *O. luteus* unter Norflurazon führte wie schon bei *P. tricornutum* zu einer Reduktion des Zuwachses an Chl a (Abb. 3.32.A). Entsprechend fiel auch die Zunahme an Fx geringer aus als bei der Kontrollkultur. Gleichzeitig war eine leichte Abnahme von β -Carotin und eine deutlich stärkere Reduktion des VAZ-Pools zu beobachten, welche in etwa der Fx-Zunahme entsprach. Daneben verringerte sich auch die Dincoxanthin-Konzentration, doch spielt dieses Pigment aufgrund seiner geringen Poolgröße (Tab. 3.16) für die weiteren Betrachtungen keine Rolle. Die Vorläuferfunktion des VAZ-Pools bei der Biosynthese von Fx in *O. luteus* wird deutlicher

erkennbar, wenn die Algen vor der Norflurazon-Zugabe für 6 h mit Starklicht inkubiert wurden (Abb. 3.32.B). Der Zuwachs an Fx während der anschließenden Schwachlichtphase speist sich eindeutig aus dem VAZ-Pool. Dabei fällt auf, daß nun unter Norflurazon Fx gebildet wird, ohne daß eine entsprechende Zunahme an Chl a erfolgt. Möglicherweise ist die Kopplung der Biosynthese dieser beiden Pigmente nicht so eng, wie zunächst die Ergebnisse der beiden Kieselalgen nahelegten.

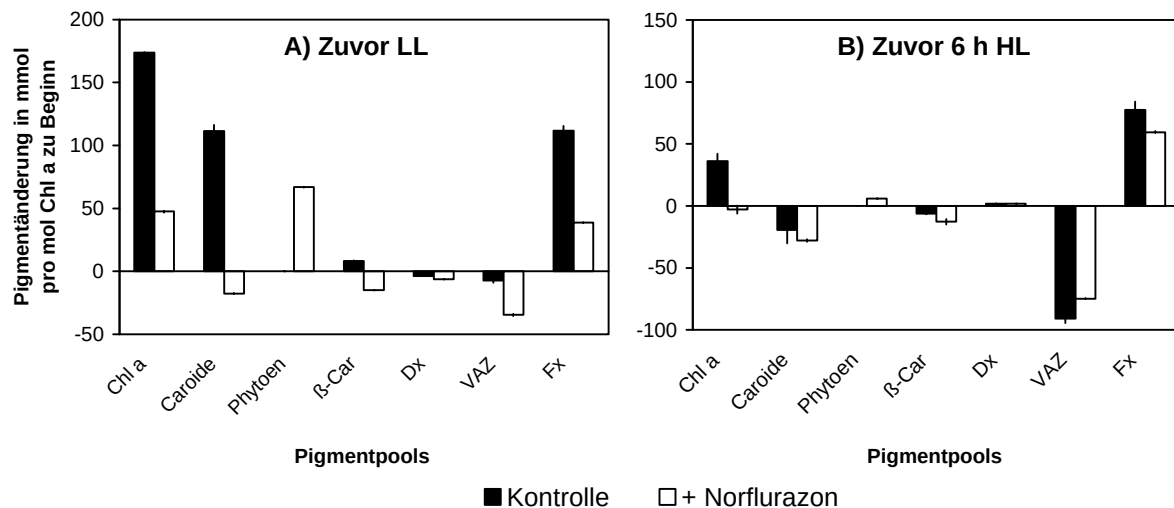


Abb. 3.32 Änderungen der Pigmentgehalte in *O. luteus* nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. In (A) wurde die Kultur vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert, in (B) wurden die Algen vor der Zugabe von Norflurazon 6 h mit Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Carotin, Carote = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

O. luteus zeigte auch unter wechselnden Lichtintensitäten ein von den Diatomeen leicht abweichendes Verhalten (Abb. 3.33). So war während der Starklichtphase immer noch ein deutlicher Chl a-Zuwachs festzustellen. Der Zugewinn an Chl a betrug gut zwei Drittel des Wertes der Schwachlichtkontrolle (Abb. 3.33.A-B), und auch die Fx-Konzentration zeigte einen Anstieg, der immerhin noch 50% des Kontrollwertes betrug (Abb. 3.22.C-D). Der VAZ-Pool nahm im Starklicht jedoch besonders drastisch zu, so daß auch der Carotinoidgesamtzuwachs fast dreimal so hoch war wie unter Schwachlichtbedingungen. Nach 6 h Starklicht wies *O. luteus* während der anschließenden Schwachlichtphase eine deutlich reduzierte Chl a-Synthese auf, und der Carotinoidgehalt in der Kultur nahm sogar leicht ab (Abb. 3.33.B). Gleichzeitig fand jedoch eine verstärkte Bildung von Fx auf Kosten der Pigmente des VAZ-Pools statt (Abb. 3.33.D). Eine solche gegenläufige Entwicklung der zellulären Konzentrationen von Vx und Fx beobachteten bereits Kohata und Watanabe (1988) in *O. luteus* sowie einer weiteren Raphidophyceen bei Belichtung der Algen nach einer 12stündigen Dunkelperiode, doch erkannten sie nicht die Biosyntheseverknüpfung zwischen Vx und Fx.

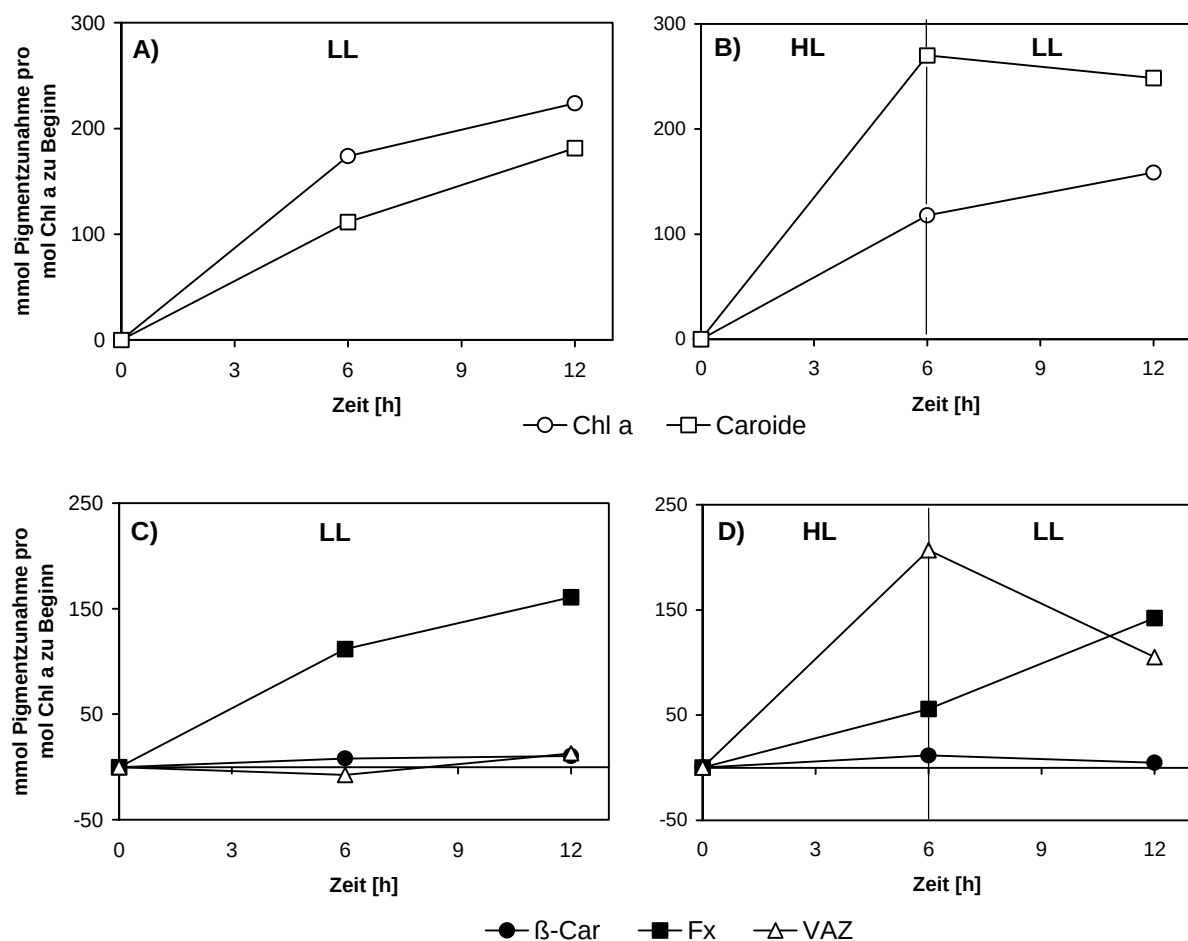


Abb. 3.33 Änderungen der Pigmentgehalte in *O. luteus* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, VAZ = VAZ-Pool.

Demnach verhält sich *O. luteus* in dieser Hinsicht wie die zuvor untersuchten Diatomeen, indem sie die im Starklicht angereicherten Xanthophyllzykluspigmente unter Schwachlichtbedingungen zur Biosynthese von Fx nutzt. Der gebremste Zuwachs an Chl a zwischen der sechsten und der zwölften Stunde des Versuchs dagegen könnte möglicherweise von einer negativen Beeinflussung der Algen durch die Airliftbedingungen während des Experimentes herrühren, denn auch die Kontrollkultur zeigte in dieser Zeit eine nachlassende Pigmentsynthese. *O. luteus* besitzt keine Zellwand und reagiert daher sehr empfindlich auf mechanische Turbulenzen, wie sie durch Schütteln oder bei Durchsprudlung einer Algenkultur mit Luft entstehen (Cattolico et al. 1976). Deshalb scheint es denkbar, daß die im Laufe des Experimentes nachlassende Pigmentsynthese der Algen durch den versuchsbedingten Wechsel vom Standkultur- zum Airliftverfahren verursacht worden ist. Dennoch kann festgehalten werden, daß das Pigmentsyntheseverhalten der Raphidophyceae *O. luteus* unter wechselnden Lichtbedingungen in wesentlichen Merkmalen mit den Beobachtungen an Kieselalgen übereinstimmt: Ein

Anstieg der Lichtintensität fördert die Synthese der Xanthophyllzykluspigmente bei gleichzeitiger Reduktion der Zuwächse an Chl a und Fx; während der anschließenden Schwachlichtphase wird die Carotinoidbiosynthese zunächst stark gedrosselt, und es erfolgt ein Umbau der Xanthophyllzykluspigmente in das Lichtsammelxanthophyll Fx.

3.2.3 Heterokontophyta, Chrysophyceae: *Ochromonas danica*

Die Pigmentanalysen der Chrysophyceae *O. danica* wurden durch mehrere Umstände erschwert. Zum einen enthielten die Pigmentextrakte von *O. danica* stets Chlorophyllid a (Chlid a) mit einem Anteil zwischen 10 und 30% des Chl a-Gehaltes. Da die Menge an Chlid a zum Teil auch zwischen Probenpaaren stark differierte, wobei die Summe an Chl a und Chlid a jedoch konstant blieb, ist die Entstehung des Chlid a wahrscheinlich auf eine besonders hohe Chlorophyllase-Aktivität in den Algen zurückzuführen. Entsprechend wurden bei der Berechnung der Chl a-Konzentrationen in den Algen die gemessenen Mengen an Chlid a und Chl a addiert. Viele Chromophyten, und insbesondere Kieselalgen wie *P. tricornutum*, zeigen selbst bei Pigmentextraktion in 90% Aceton noch ausgeprägte Chlorophyllase-Aktivität (Owens und Falkowski 1982). Dennoch führten die Extraktionsbedingungen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, bei *O. danica* als einziger der untersuchten Algen zur Bildung relevanter Konzentrationen an Chlid a. Da *O. danica* keine Zellwand besitzt (Grevby und Sundqvist 1992), ist denkbar, daß in einem Teil der Zellen die Chlorophyllase aufgrund einer Schädigung beim Absaugen der Proben auf die Glasfaserfilter aktiviert wurde.

Tab. 3.17 *Pigmentstöchiometrien in O. danica im Schwachlicht bzw. nach 6 h Starklicht bei einer PFD von 700 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils drei (LL) bzw. zwei (nach HL) Meßproben derselben Kultur da; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug für Fx, Vx und die beiden Carotine maximal 10 mmol pro mol Chl a, für die anderen Pigmente höchstens 2 mmol pro mol Chl a. Neben den aufgeführten Pigmenten fanden sich noch geringe Mengen an Cx, CxE sowie dem b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Car-like = Carotin-ähnliches Pigment, Caroide = Summe aller Carotinoide, Dx = Dinoxanthin.*

	Chl c	Fx	β -Car	Car-like	Vx	Ax	Zx	Dx	Phytoen	Caroide
Vor HL	9	276	55	45	138	4	0	18	17	536
Nach HL	5	262	72	31	304	51	19	17	17	756

Außerdem wiesen die Pigmentextrakte von *O. danica* neben den in Tab. 3.17 angegebenen Pigmenten noch geringe Konzentrationen einer Reihe weiterer Carotinoide auf, bei denen es sich den Online-Spektren nach vermutlich um *cis*-Isomere handelt. Diese Pigmente wurden nicht eingehender untersucht und bei der Carotinoidquantifizierung nicht berücksichtigt. Zudem eluierte unmittelbar nach β -Carotin ein weiteres Carotinoid, dessen Online-Spektrum zwar die gleiche Form hatte wie das von

β -Carotin, doch waren seine Absorptionsmaxima (451 nm, 478 nm) um 5 nm zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Dabei lagen keine Anzeichen dafür vor, daß es sich um ein *cis*-Derivat von β -Carotin handeln könnte, da die für *cis*-Polyene charakteristischen Nebenmaxima im UV-Bereich der Online-Spektren fehlten. Die späte Elution im verwendeten HPLC-System spricht zumindest dafür, daß es sich um ein Carotin handelt. Eine Quantifizierung dieses Carotin-ähnlichen Pigmentes mit dem Extinktionskoeffizienten von β -Carotin ergab einen nicht zu vernachlässigenden Anteil von etwa 45 mmol pro mol Chl a in einer Schwachlichtkultur von *O. danica* (Tab. 3.17). Bei der Berechnung der in Abb. 3.34 und 3.35 dargestellten Pigmentänderungen wurde dieses Pigment zum Gehalt an β -Carotin hinzu addiert.

Schließlich waren auch in Kulturen ohne Zusatz von Norflurazon bereits Phytoen detektierbar (Tab. 3.17) sowie zwei weitere Pigmente mit Retentionszeiten von 21,7 und 23,0 min zu finden. Die letztgenannten Pigmente wiesen identische Spektren mit der für Polyene charakteristischen dreigipfligen Form und Maxima bei 272, 284 und 294 nm auf. Die UV-Absorption spricht für einen Chromophor von höchstens drei konjugierten Doppelbindungen, wie er auch im Phytoen vorliegt. Demnach könnte es sich auch bei diesen Molekülen um frühe Intermediate der Carotinoidbiosynthese handeln. Eine Quantifizierung der beiden Pigmente mittels des Extinktionskoeffizienten von Phytoen ergab eine sehr hohe Konzentration von zusammen etwa 600 mmol pro mol Chl a. Wurde *O. danica* im Schwachlicht unter Norflurazon inkubiert, blieb die Konzentration der unbekannten Verbindungen jedoch praktisch unverändert, während Phytoen deutlich zunahm (Abb. 3.34). Dies deutet darauf hin, daß die beiden unbekannten Pigmente nicht direkt an der Xanthophyllbiosynthese beteiligt sind. Schließlich wies die verwendete *O. danica*-Kultur eine für Fx-haltige Algen ungewöhnlich niedrige Fx/Chl a-Stöchiometrie auf (Tab. 3.17), die möglicherweise auf die bereits in Kap. 3.1.2 angesprochene mixotrophe Anzucht der Algen zurückzuführen ist. Somit bleibt zu bedenken, daß die aufgezählten Besonderheiten von *O. danica* ihre Eignung als Modellorganismus einschränken und die Aussagekraft der Ergebnisse insgesamt begrenzen.

Dennoch zeigt *O. danica* prinzipiell die gleichen Carotinoidbiosynthese-Beziehungen wie die anderen bisher erörterten Algen, die Fx als Lichtsammelxanthophyll nutzen. Wie in Abb. 3.34.B erkennbar ist, können die während einer Starklichtinkubation angereicherten Pigmente des VAZ-Pools im nachfolgenden Schwachlicht zur Synthese von Fx genutzt werden. Unter diesen Bedingungen steigt auch die Konzentration an Dinoxanthin (Dx) an, welches wie Fx eine allenische Gruppe besitzt. Dx entsteht wahrscheinlich aus *trans*-Neoxanthin durch Veresterung von dessen 3-OH-Gruppe mit Essigsäure. Wie bereits in Kap. 1.8 diskutiert wurde, sollte Vx wiederum die unmittelbare Vorstufe von *trans*-Neoxanthin darstellen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme läßt sich an *O. danica* unter Norflurazon beobachten, daß der Zuwachs an Fx und Dx in etwa der Abnahme des VAZ-Pools (Abb. 3.34.B) entspricht. Zudem wurde in Kap. 3.1.2 festgestellt, daß der VAZ-Pool in *O. danica* auch nach 6 h Starklicht einen sehr niedrigen Deepoxidierungsgrad aufweist und in der nachfolgenden Schwachlichtphase nach 20 min der Anteil von Vx am VAZ-Pool bereits bei 95% liegt (Abb. 3.27.B).

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß in *O. danica* Vx wahrscheinlich auch als Vorstufe zur Synthese von Dx dient.

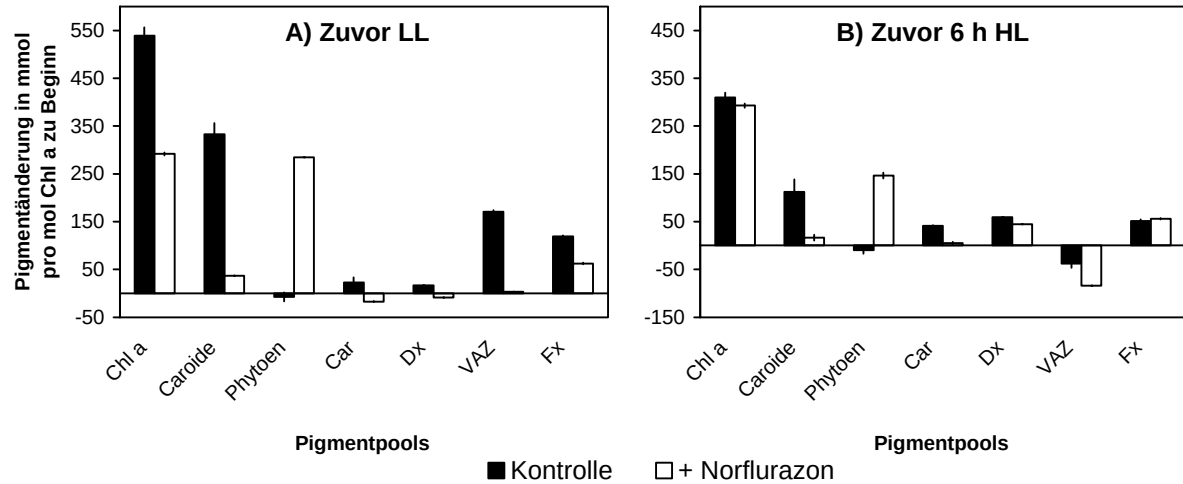


Abb. 3.34 Änderungen der Pigmentgehalte in *O. danica* nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. In (A) wurde die Kultur vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert, in (B) wurden die Algen vor der Zugabe von Norflurazon 6 h mit Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestrahlt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Summe aus b-Carotin und dem Carotin-ähnlichen Pigment, Carotide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), Dx = Dinorxanthin, VAZ = VAZ-Pool.

Unter wechselnden Lichtintensitäten weist *O. danica* im wesentlichen das gleiche Pigmentsyntheseverhalten auf wie die zuvor untersuchten Algen. Während der sechsstündigen Starklichtphase fällt der Zuwachs an Chl a deutlich niedriger aus als bei der Schwachlichtkontrollkultur, wogegen die Carotinoidkonzentration unverändert stark zunimmt (Abb. 3.35.A-B). Ihre Erhöhung ist jedoch im Starklicht fast ausschließlich auf eine Akkumulation der Pigmente des VAZ-Pools zurückzuführen (Abb. 3.35.C-D, vgl. auch Tab. 3.17). Im nachfolgenden Schwachlicht wird die Chl a-Bildung wieder gesteigert, während die Carotinoide deutlich langsamer zunehmen als noch während der Starklichtphase (Abb. 3.35.B). Auch ist ein Anstieg von Fx und Dinorxanthin bei gleichzeitiger Abnahme des VAZ-Pools zu verzeichnen (Abb. 3.35.D), wie schon zuvor bei Algen unter Norflurazon (Abb. 3.34.B) beobachtet wurde.

Zusammenfassend zeigt die Chrysophyce *O. danica* während eines Tagesgangs mit einer mehrstündigen Starklichtphase bei der Pigmentbiosynthese grundsätzlich die gleichen Regulationsphänomene, wie sie bereits für die Raphidophyce und die beiden untersuchten Diatomeen geschildert wurden. Aufgrund der eingangs diskutierten Besonderheiten von *O. danica*, die vermutlich mit ihrer mixotrophen Anzucht in Zusammenhang stehen, empfiehlt es sich jedoch, die Versuche mit einer

weiteren Chrysophyceae durchzuführen, die unter photoautotrophen Kulturbedingungen ausreichend hohe Wachstumsraten zeigt.

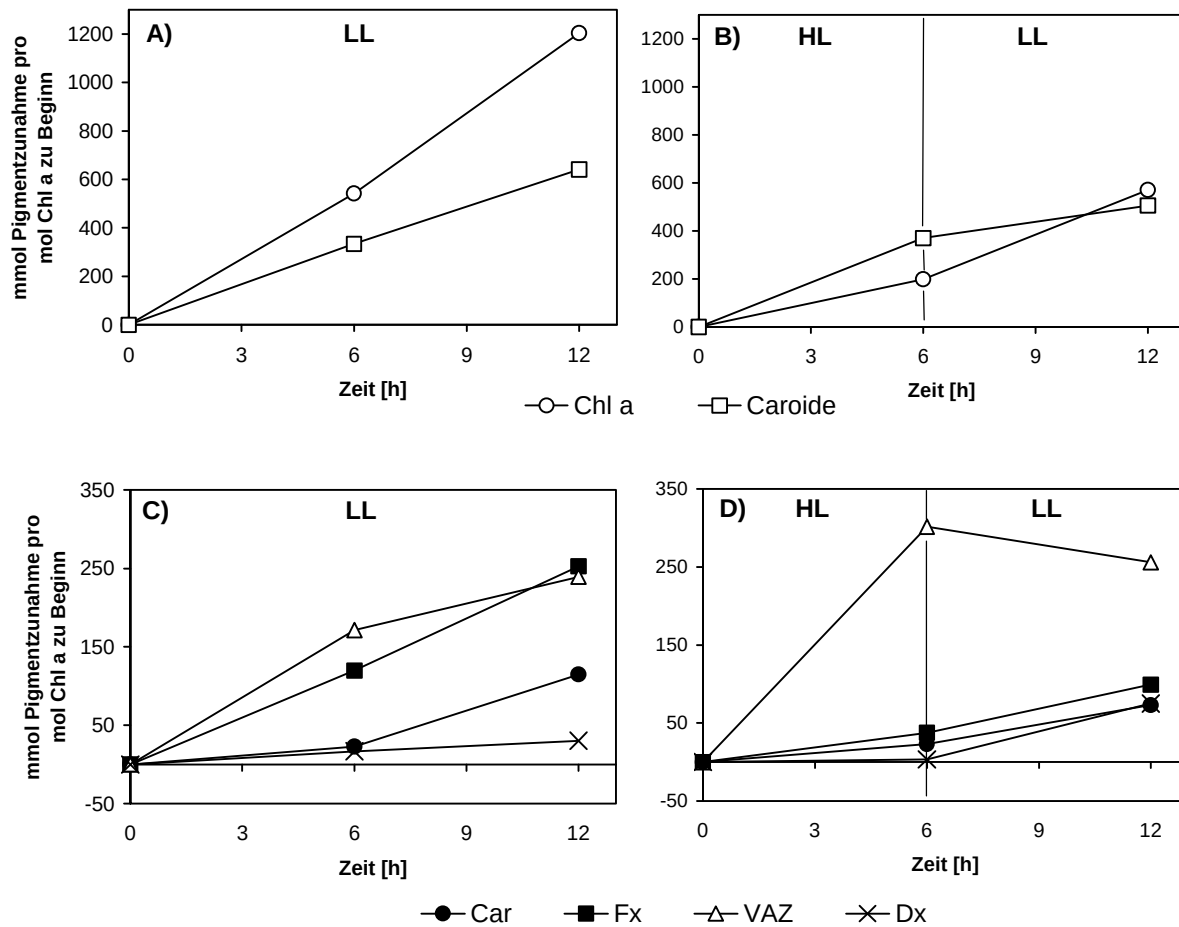


Abb. 3.35 Änderungen der Pigmentgehalte in *O. danica* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Summe aus β -Carotin und dem Carotin-ähnlichen Pigment, Caroide = Summe aller Carotinoide, Dx = Dinoxanthin, VAZ = VAZ-Pool.

3.2.4 Haptophyta: *Prymnesium parvum*

Der untersuchte Haptophyt *Prymnesium parvum* wies als einzige der untersuchten Algen neben β -Carotin auch α -Carotin auf (Tab. 3.18). Doch wurde in *P. parvum* kein Xanthophyll detektiert, das sich von α -Carotin ableitet. Deshalb wird α -Carotin nicht in die weiteren Betrachtungen einbezogen. Ansonsten besitzt *P. parvum* praktisch das gleiche Pigmentmuster wie die untersuchten Diatomeen, lediglich die beiden minoren Pigmente Cx und CxE waren nicht nachweisbar. Bei Inkubation einer Schwachlichtkultur von *P. parvum* mit Norflurazon zeigte sich eindeutig, daß auch in dieser Alge Ddx als Zwischenverbindung bei der Biosynthese von Fx fungieren kann (Abb. 3.36.A). Wurden die Algen

zunächst 6 h im Starklicht inkubiert, um die Pigmente des VAZ-Zyklus zu akkumulieren, und dann mit Norflurazon versetzt, so war ebenso klar zu erkennen, daß der VAZ-Pool in der nachfolgenden Schwachlichtphase sowohl zur Biosynthese von Ddx als auch von Fx diene (Abb. 3.36.B). Demnach liegen in *P. parvum* wahrscheinlich die gleichen Biosyntheseverknüpfungen zwischen VAZ-Pool, DT-Pool und Fx vor wie in Diatomeen (siehe z.B. Abb. 3.21).

Tab. 3.18 *Pigmentstöchiometrien in P. parvum im Schwachlicht bzw. nach 6 h Starklicht bei einer PFD von 1000 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Meßproben derselben Kultur da; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug für Fx, Ddx und Dtx maximal 2 mmol, für die anderen Pigmente höchstens 1 mmol pro mol Chl a. Neben den aufgeführten Pigmenten fanden sich noch geringe Mengen des b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophylls sowie Spuren von trans-Neoxanthin (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Carotide = Summe aller Carotinoide.*

	Chl c	α -Car	β -Car	Fx	Ddx	Dtx	Vx	Ax	Zx	Carotide
Vor HL	298	20	33	867	230	5	9	0	0	1164
Nach HL	292	14	50	869	65	351	49	4	63	1465

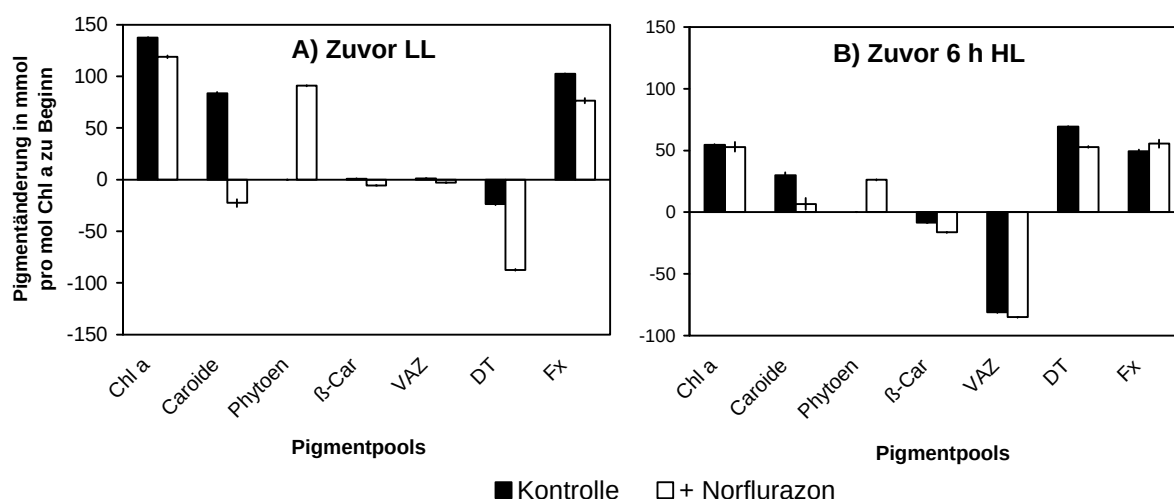


Abb. 3.36 *Änderungen der Pigmentgehalte in P. parvum nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. In (A) wurde die Kultur vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert, in (B) wurden die Algen vor der Zugabe von Norflurazon 6 h mit Starklicht ($1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestrahlt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Carotin, Carotide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.*

Auch die Regulation der Pigmentbiosynthese in *P. parvum* unter wechselnden Lichtintensitäten verläuft im Prinzip analog. Die im vorliegenden Versuch gewählte Starklichtintensität von $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ führte sogar zu einer leichten Abnahme der Chl a-Konzentration in der Algenkultur während der Starklichtperiode, und der Carotinoidgehalt stieg etwa viermal stärker als in der Schwachlichtkontrolle (Abb. 3.37.A-B). Dabei korrelierte die Entwicklung des Fx-Gehaltes in der Kultur wieder eng mit der Chl a-Konzentration (Abb. 3.37.B,D). Entsprechend resultierte der drastische Anstieg der Carotinoide im Starklicht allein aus der Zunahme der Xanthophyllzykluspigmente (Abb. 3.37.D). Im nachfolgenden Schwachlicht stiegen die Konzentrationen an Chl a und Fx wieder, aber auch der DT-Pool nahm noch stark zu, während der VAZ-Pool eine drastische Abnahme zeigte (Abb. 3.37.D).

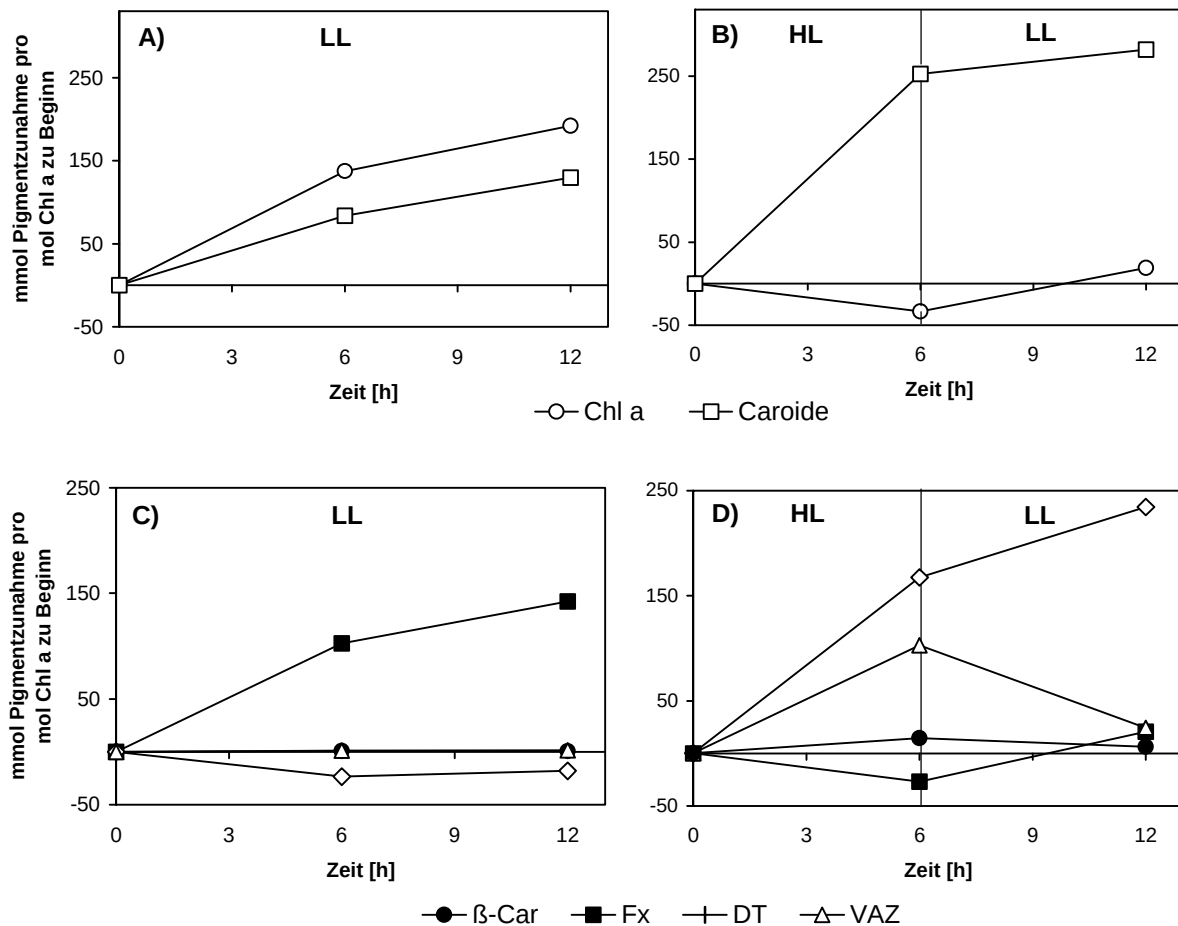


Abb. 3.37 Änderungen der Pigmentgehalte in *P. parvum* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

Ein weiterer Anstieg des DT-Pools im Schwachlicht nach sechsständiger Starklichtinkubation konnte schon in den Versuchen mit *P. tricornutum* beobachtet werden (Kap. 1.7, Abb. 3.12). Er läßt sich dadurch erklären, daß die Umwandlung von Vx zu Ddx mit einer höheren Rate abläuft als die Weiterverwendung von Ddx zur Synthese von Fx. Der letztgenannte Schritt, der offensichtlich eng mit der Chl a-Synthese gekoppelt ist, scheint unter den vorliegenden Bedingungen limitiert zu sein, wie der verhältnismäßig geringe Anstieg von Chl a und Fx in *P. parvum* nach der Starklichtinkubation andeutet (Abb. 3.37.B,D). Die Ursache der geringen Chl a-Zunahme nach 6 h Starklicht könnte eine mechanische Irritation der Algen aufgrund der Durchsprudelung der Kulturen mit Luft während der 12ständigen Versuchsdauer sein, wie sie schon für die Raphidophyceae *O. luteus* diskutiert wurde. Hierfür spricht der Befund, daß auch die Schwachlichtkultur von *P. parvum* mit fortschreitender Versuchsdauer einen reduzierten Zuwachs an Chl a zeigte (Abb. 3.37.A). Aber auch die relativ hohe Starklichtintensität, die zu einer Abnahme des Chl a-Gehaltes von *P. parvum* im Starklicht führte, könnte sich möglicherweise nachteilig auf die Pigmentsynthese im anschließenden Schwachlicht ausgewirkt haben. Dennoch läßt sich anhand der vorliegenden Daten auch für *P. parvum* die Aussage treffen, daß die Algen während einer Starklichtphase nur die Xanthophyllzykluspigmente weiter akkumulieren. Im nachfolgenden Schwachlicht ist ein Anstieg an Chl a und dem Lichtsammelxanthophyll Fx zu beobachten, wobei letzteres aus den zuvor angereicherten Pigmenten des VAZ-Pools und des DT-Pools gebildet wird.

3.2.5 Heterokontophyta, Eustigmatophyceae: *Nannochloropsis salina*

Die Eustigmatophyceae *N. salina* besitzt Vaucherixanthin-Ester anstelle von Fx als Lichtsammelpigmente (Whittle und Casselton 1975a, Antia und Cheng 1982). Aber auch Vx trägt in Eustigmatophyceen zur Lichtsammlung bei (Owens et al. 1987, Trautman et al. 1990), wie bereits im Zusammenhang mit dem niedrigen Deepoxidierungsgrad des VAZ-Pools von *N. salina* unter Starklicht diskutiert wurde (Kap. 3.1.2). Da zudem die Carotinoid/Chl a-Stöchiometrie in *N. salina* im Vergleich zu anderen Chromophyten relativ niedrig ist, spielt auch Chl a in dieser Alge eine entsprechend größere Rolle bei der Sammlung von Licht. Jedoch besitzt *N. salina* wie alle Eustigmatophyceen kein Chl c (Jeffrey und Vesk 1997).

Bei Zusatz von Norflurazon zu einer Schwachlichtkultur von *N. salina* stieg der Chl a-Gehalt im gleichen Maße an wie bei einer Kontrollkultur, doch war nur eine minimale Umverteilung zwischen den verschiedenen Carotinoid-Pools zu beobachten (Abb. 3.38.A). Lediglich die Konzentration an Vaucherixanthin-Estern nahm auf Kosten von β -Carotin leicht zu. Auf eine Beteiligung des VAZ-Pools an der Biosynthese der Vaucherixanthin-Ester konnte anhand dieser Daten nicht geschlossen werden. Erst nach Anreicherung der Xanthophyllzykluspigmente durch sechsständige Vorinkubation im Starklicht (Tab. 3.19) zeigte sich während der anschließenden Schwachlichtphase unter Norflurazon eine Abnahme des VAZ-Pools bei einer entsprechenden Zunahme der Vaucherixanthin-Ester. Dabei sind die Konzentrationsänderungen der Xanthophylle aufgrund der relativ geringen Carotinoid/Chl a-Stöchiometrie von *N. salina* jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen

untersuchten Algen; die größten Änderungen betreffen den Chl a-Gehalt der Kulturen. Dennoch sprechen die Daten dafür, daß die Vaucherixanthin-Ester über den VAZ-Pool synthetisiert werden. Dabei sollte erneut Vx eine Schlüsselstellung einnehmen, denn Vaucherixanthin besitzt eine allenische Gruppe an der gleichen Position wie auch in Fx oder Neoxanthin (siehe Kap. 3.3.1, Abb. 3.46). Bemerkenswerterweise sind die Vaucherixanthin-Ester neben Chl a der einzige Pigmentpool, der unter Norflurazon den gleichen Zuwachs aufwies wie in der Kontrollkultur.

Tab. 3.19 *Pigmentstöchiometrien in N. salina im Schwachlicht bzw. nach 6 h Starklicht bei einer PFD von $700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils drei (LL) bzw. zwei (nach HL) Meßproben derselben Kultur da; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug maximal 9 mmol pro mol Chl a für Vx, 2 mmol für VauxE und b-Car und für die anderen Pigmente höchstens 1 mmol pro mol Chl a. Neben den aufgeführten Pigmenten fanden sich noch geringe Mengen an Cx, CxE und dem b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll sowie Spuren von trans-Neoxanthin und Dincoxanthin (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Carotide = Summe aller Carotinoide, VauxE = Vaucherixanthin-Ester.*

	VauxE	β -Car	Vx	Ax	Zx	Carotide
Vor HL	137	55	253	4	6	455
Nach HL	136	43	187	70	51	487

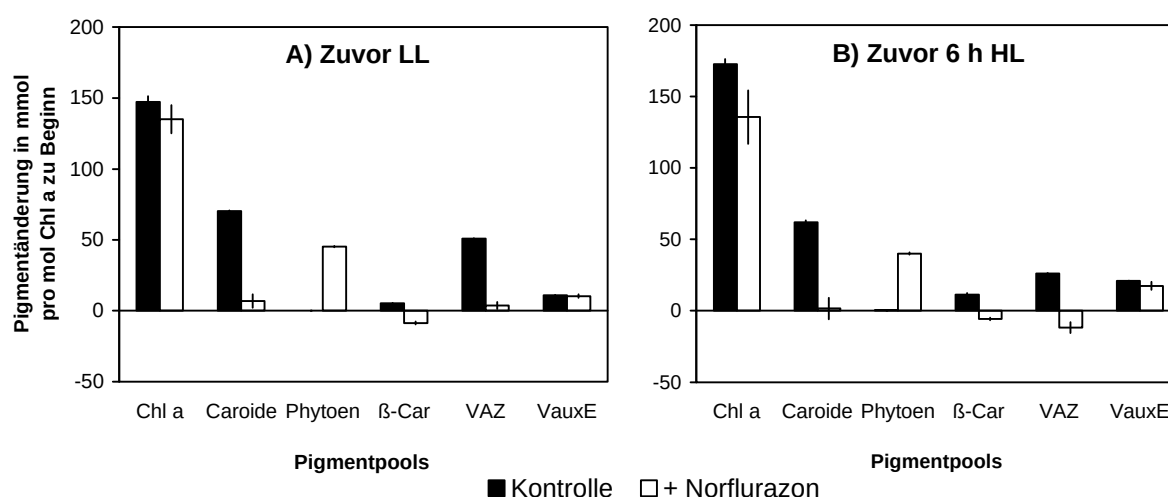


Abb. 3.38 *Änderungen der Pigmentgehalte in N. salina nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. In (A) wurde die Kultur vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert, in (B) wurden die Algen vor der Zugabe von Norflurazon 6 h mit Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bestrahlt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Carotin, Carotide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), VauxE = Vaucherixanthin-Ester, VAZ = VAZ-Pool.*

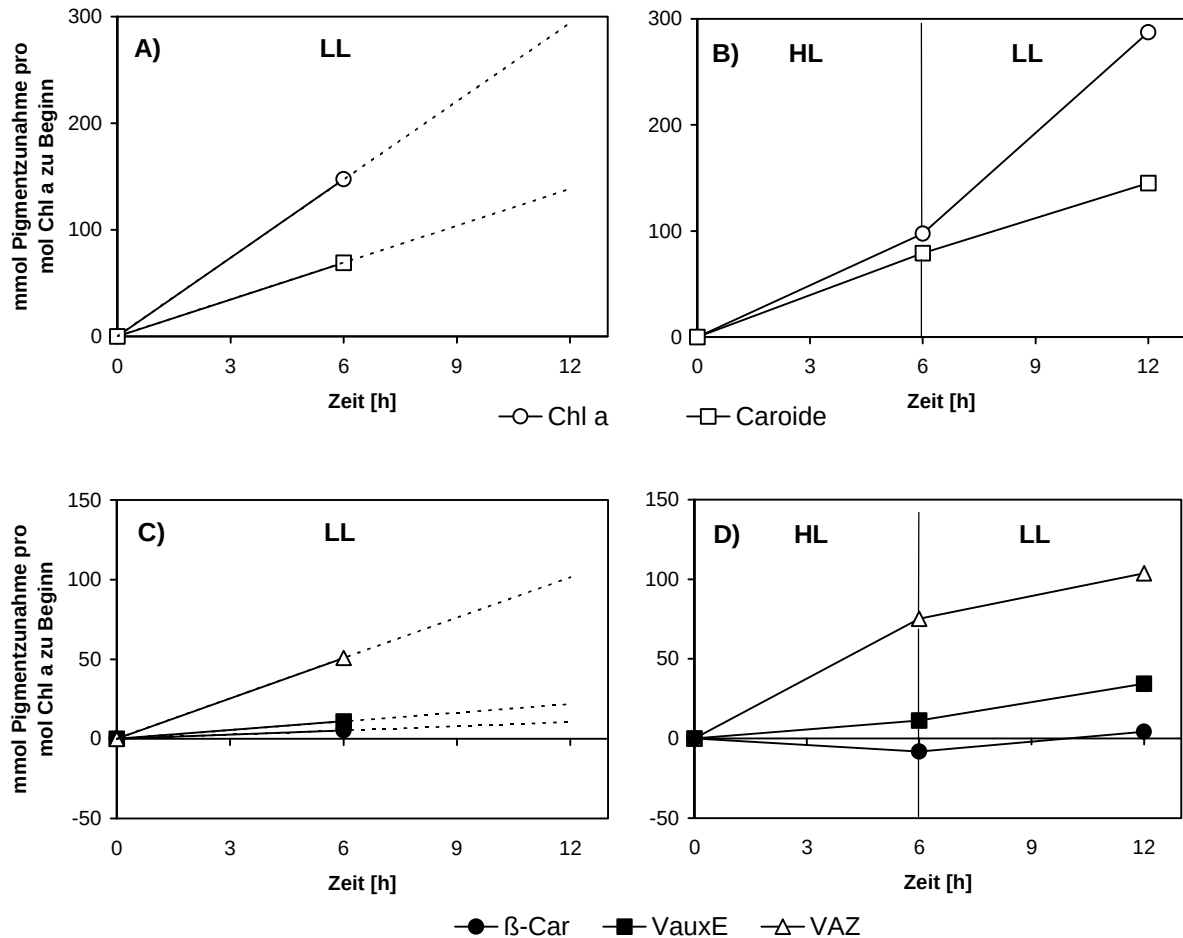


Abb. 3.39 Änderungen der Pigmentgehalte in *N. salina* im Verlauf von (A, C) 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Abweichend von den anderen Algen wurde die Pigmentzunahme der Kontrollkultur von *N. salina* nur nach 6 h Schwachlichtinkubation ermittelt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, VauxE = Vaucheriaxanthin-Ester, VAZ = VAZ-Pool.

Die Pigmententwicklung in *N. salina* unter wechselnden Lichtintensitäten stimmte nicht in allen Punkten mit den Beobachtungen überein, die an den bisher beschriebenen Algen gemacht wurden. Zwar zeigte *N. salina* wie auch die anderen Algen im Starklicht eine geringere Zunahme an Chl a als die Schwachlichtkultur, während der Carotinoidzuwachs in beiden Kulturen praktisch gleich war (Abb. 3.39.A-B). Ebenso fiel der Anstieg der Xanthophyllzykluspigmente unter Starklicht höher aus als im Schwachlicht (Abb. 3.39.C-D). Allerdings stieg der Gehalt an Vaucheriaxanthin-Estern ebenfalls, und lediglich die Konzentration an β -Carotin nahm im Starklicht ab. Während der anschließenden Schwachlichtphase war wieder ein verstärkter Zuwachs von Chl a zu feststellbar, doch nahm neben β -Carotin und den Vaucheriaxanthin-Estern auch der VAZ-Pool aufgrund einer Neubildung von Vx weiter zu (Abb. 3.39.D). Entsprechend war auch keine Reduktion der Carotinoidbiosynthese zu

beobachten (Abb. 3.39.B). In dieser Hinsicht weicht *N. salina* von den anderen untersuchten Algen ab, welche nach der Starklichtperiode zunächst die Neusyntheserate von Carotinoiden verringerten und statt dessen die im Starklicht zusätzlich akkumulierten Xanthophyllzykluspigmente zur Synthese der Lichtsammelxanthophylle nutzten.

Das abweichende Verhalten von *N. salina* könnte zum einen damit zusammenhängen, daß in Eustigmatophyceen, wie schon erwähnt, auch Vx an der Lichtsammmlung beteiligt ist. Zum anderen leistet Chl a in Eustigmatophyceen aufgrund der niedrigen Carotinoid/Chl a-Stöchiometrie der Algen einen größeren Beitrag zur Lichtabsorption als die Carotinoide. Daher hat die Weiterverwendung der Xanthophyllzykluspigmente zur Synthese von Lichtsammelxanthophyllen für Eustigmatophyceen einen geringeren ökonomischen Nutzen als für die anderen bisher besprochenen Algengruppen. Aber auch die Rolle des VAZ-Zyklus in Eustigmatophyceen bei der Photoprotektion bleibt noch näher zu untersuchen, da auch während einer längerer Starklichtinkubation nur ein verhältnismäßig geringer Anteil an Vx deepoxidiert wird (Kap. 3.1.2; siehe auch Lubian und Montero 1998). Dabei wäre insbesondere zu klären, inwiefern sich Lichtsammmlung und Photoprotektion unterschiedlichen Vx-Pools zuordnen lassen, ob ein Wechsel von Molekülen zwischen diesen Pools möglich ist und wie die Poolgrößen reguliert werden.

3.2.6 Heterokontophyta, Xanthophyceae: *Mischococcus sphaerocephalus*

Die Xanthophyceae *M. sphaerocephalus* zeigte das komplexeste Carotinoidmuster aller untersuchten Algen. Neben β -Carotin und den Xanthophyllen des DT-Zyklus sowie des VAZ-Zyklus konnten drei verschiedene Vaucheriaxanthin-Ester sowie Heteroxanthin, Dincoxanthin und *trans*-Neoxanthin identifiziert werden (Tab. 3.20; siehe auch Material und Methoden, Kap. 6.2.3). Außerdem waren geringe Mengen an Cx, CxE und dem β -Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll detektierbar.

Tab. 3.20 *Pigmentstöchiometrien in M. sphaerocephalus im Schwachlicht bzw. nach 6 h Starklicht bei einer PFD von 700 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils drei (LL) bzw. zwei (nach HL) Meßproben derselben Kultur da; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug maximal 5 mmol pro mol Chl a für Ddx, 3 mmol für VauxE, b-Car und Dtx und höchstens 1 mmol pro mol Chl a für die anderen Pigmente. Neben den aufgeführten Pigmenten fanden sich noch geringe Mengen an Cx, CxE und dem b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, Dx = Dincoxanthin, Hx = Heteroxanthin, Nx = Neoxanthin, VauxE = Vaucheriaxanthin-Ester.*

	Chl c	VauxE	Hx	Nx	Dx	β -Car	Ddx	Dtx	Vx	Ax	Zx	Caroide
Vor HL	37	107	67	32	12	64	206	10	30	1	4	517
Nach HL	31	102	59	24	20	62	86	162	36	17	53	601

Trotz der Vielzahl verschiedener Xanthophylle ist die Carotinoid/Chl a-Stöchiometrie in *M. sphaerocephalus* jedoch ähnlich niedrig wie in der Eustigmatophyceae *N. salina* (Tab. 3.20). Entsprechend leistet auch hier Chl a einen größeren Beitrag zur Lichtsammlung. Allerdings weist *M. sphaerocephalus* im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fx-haltigen Algen sehr geringe Konzentrationen an Chl c auf. Über die Funktion der verschiedenen Xanthophylle lassen sich noch keine eindeutigen Aussagen treffen. Dincoxanthin wurde bisher in Xanthophyceen noch nicht nachgewiesen (Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989). Fluoreszenz-Excitationsspektren an isolierten LHC-Komplexen aus der Xanthophyceae *P. meiringensis* zeigten, daß zumindest ein Teil der protein-gebundenen Xanthophylle Energie auf Chl a überträgt, jedoch wurden in den LHC-Fraktionen neben Vaucheriaxanthin-Ester nur Heteroxanthin und die Pigmente des DT-Pools als weitere Xanthophylle identifiziert (Büchel und Wilhelm 1993). Im folgenden wurden die Konzentrationsänderungen von Vaucheriaxanthin-Ester, Heteroxanthin, Dincoxanthin und Neoxanthin größtenteils als Summe unter der Bezeichnung „Lichtsammelxanthophylle“ dargestellt, um sie von den Xanthophyllzyklus-pigmenten abzusetzen und die Übersichtlichkeit der Abbildungen zu wahren. Doch müssen weitere Untersuchungen klären, ob tatsächlich alle der hier zusammengefaßten Xanthophyllspezies an der Lichtsammlung beteiligt sind.

Eine Schwachlichtkultur von *M. sphaerocephalus* wies unter Norflurazon einen unverändert hohen Zuwachs an Chl a (Abb. 3.40.A) auf. Innerhalb der Gruppe der Carotinoide war eine leichte Abnahme von β -Carotin und den Pigmenten des VAZ-Pools zu beobachten, während die Konzentration des DT-Pools sowie der Lichtammelxanthophylle entsprechend zunahm. Eine Aufschlüsselung der als Lichtammelxanthophylle zusammengefaßten Pigmente zeigt, daß nur der Gehalt an Heteroxanthin und den Vaucheriaxanthin-Estern stieg (Abb. 3.40.B). Die Konzentration von Dincoxanthin blieb unverändert, und Neoxanthin nahm sogar ab. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß zumindest ein Teil des Neoxanthins in *M. sphaerocephalus* als Intermediat bei der Biosynthese anderer Xanthophylle fungiert. Die Daten liefern jedoch keinen Hinweis dafür, daß der DT-Pool als Precursor für die Synthese von Lichtammelxanthophyllen dienen kann. Auch in einer Algenkultur, die zunächst für 6 h im Starklicht inkubiert wurde, waren während der anschließenden Schwachlichtphase unter Norflurazon keine Anzeichen hierfür erkennbar (Abb. 3.40.C). Vielmehr zeigte der DT-Pool unter diesen Bedingungen einen deutlichen Anstieg, der sogar den Zuwachs der Lichtammelxanthophylle übertraf, und innerhalb der als Lichtammelxanthophylle zusammengefaßten Gruppe nahmen nun auch Dincoxanthin und Neoxanthin zu (Abb. 3.40.D). Der β -Carotin-Gehalt der Kultur zeigte keine signifikante Veränderung. Allein die Konzentration der Pigmente des VAZ-Zyklus nahm stark ab. Dies belegt, daß auch in *M. sphaerocephalus* der VAZ-Pool bzw. das im Schwachlicht vorherrschende Vx (Abb. 3.26) ein Intermediat bei der Biosynthese aller Xanthophylle mit allenischer (Neoxanthin, Dincoxanthin, Vaucheriaxanthin-Ester) oder acetylenischer Gruppe (DT-Pool, Heteroxanthin) darstellt.

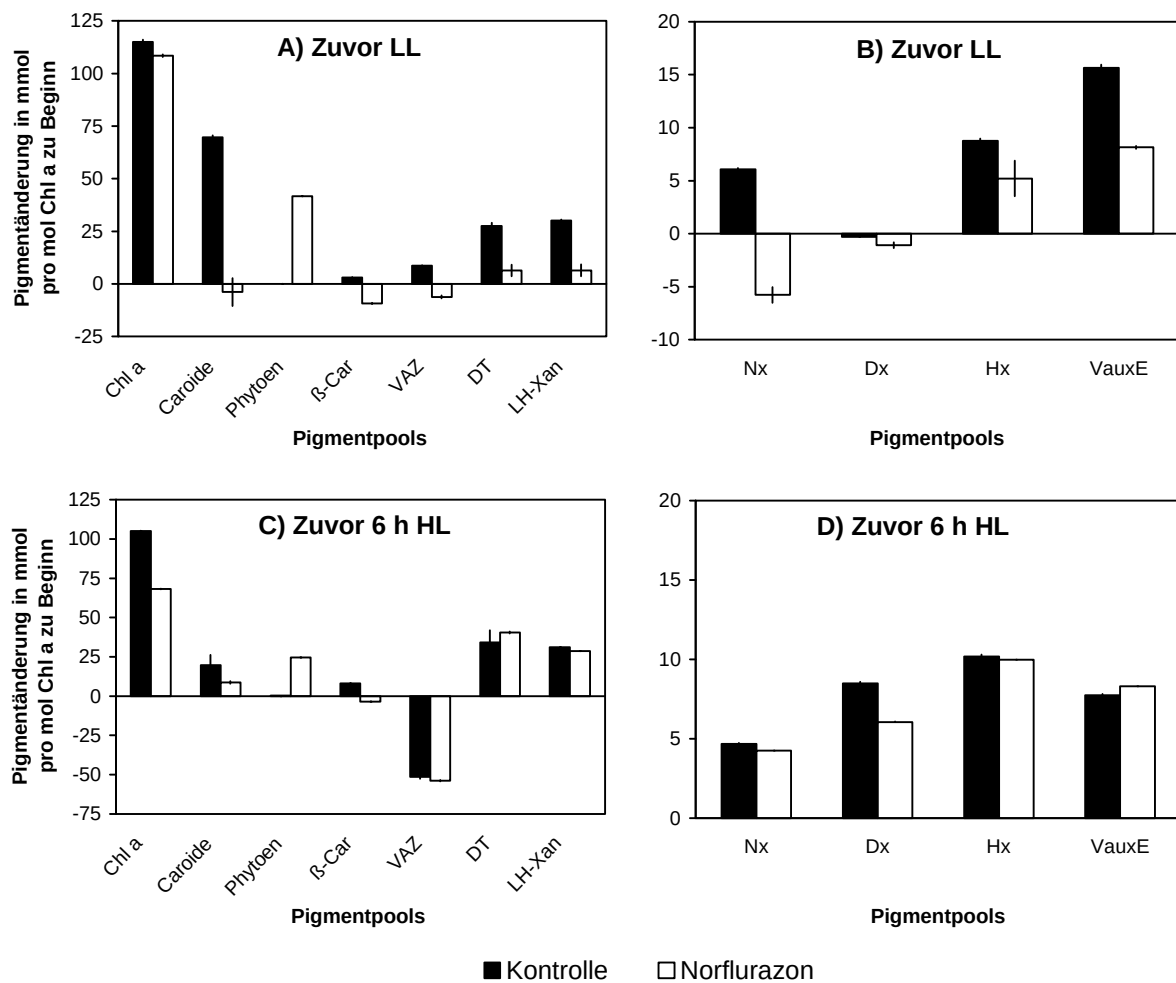


Abb. 3.40 Änderungen der Pigmentgehalte in *M. sphaerocephalus* nach 6 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. In (A-B) wurde die Kultur vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert, in (C-D) wurden die Algen vor der Zugabe von Norflurazon 6 h mit Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), DT = DT-Pool, Dx = Dinooxanthin, Hx = Heterooxanthin, LH-Xan = Lichtsammel-(Licht-Harvesting-)Xanthophylle (Summe aus VauxE, Hx, Dx, und Nx), Nx = Neooxanthin, VauxE = Vaucherioxanthin-Ester, VAZ = VAZ-Pool.

Die Pigmententwicklung in *M. sphaerocephalus* unter wechselnden Lichtintensitäten zeigte in wesentlichen Zügen den gleichen Verlauf wie in den untersuchten Diatomeen. Starklichtinkubation führte zur verringerten Zunahme an Chl a bei einem leicht gesteigerten Zuwachs an Carotinoiden (Abb. 3.41.A-B). Dabei resultierte der Anstieg der Carotinoide im Gegensatz zur Schwachlichtkultur allein aus einer Zunahme der Xanthophyllzykluspigmente (Abb. 3.41.C-D). Während der anschließenden Schwachlichtphase war wieder eine Steigerung des Chl a-Zuwachses zu verzeichnen, wohingegen der Carotinoidgehalt stagnierte. Parallel mit der Chl a-Konzentration stieg der Gehalt an

Lichtsammelxanthophyllen (vgl. auch Kontrolle in Abb. 3.40.D), der VAZ-Pool dagegen entwickelte sich stark rückläufig.

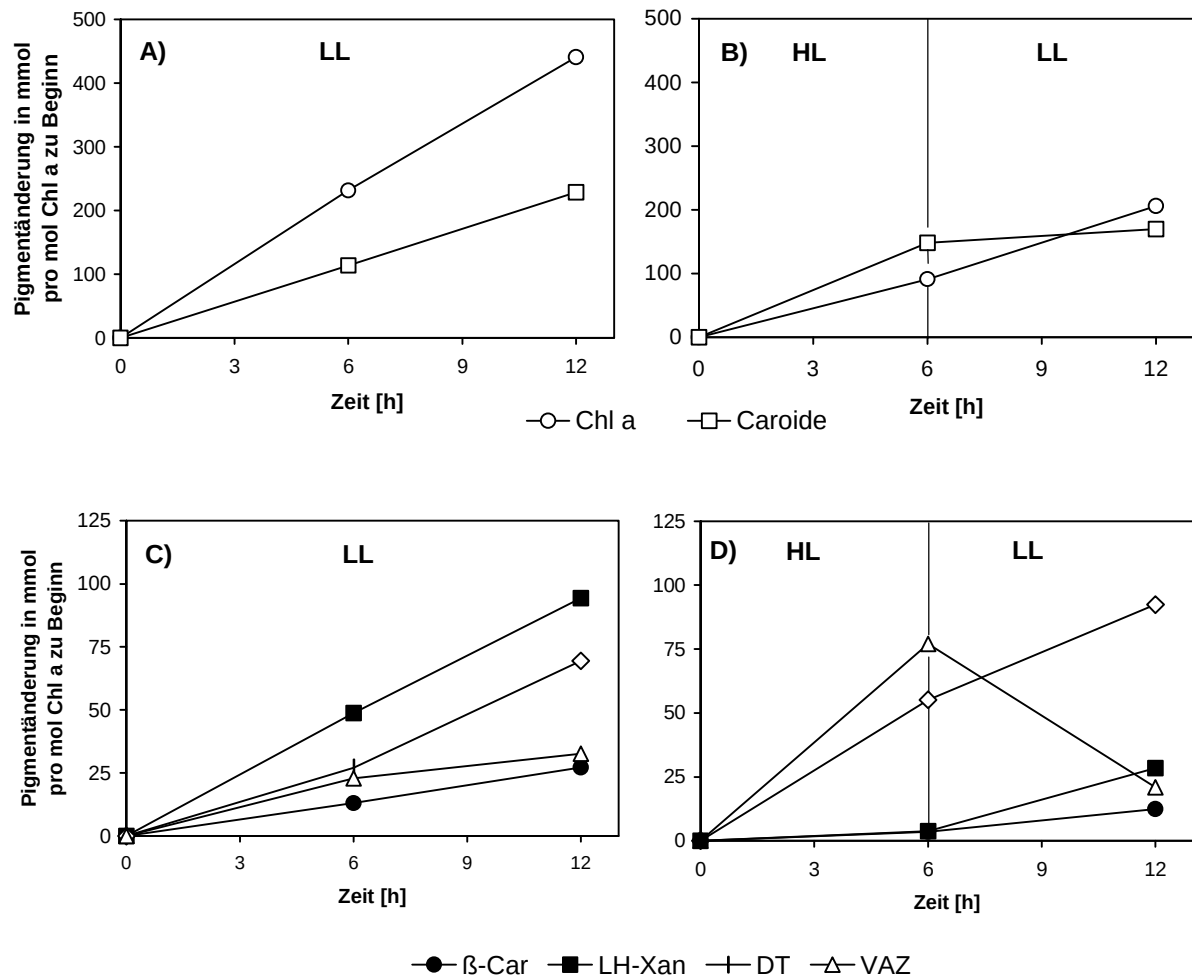


Abb. 3.41 Änderungen der Pigmentgehalte in *M. sphaerocephalus* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, DT = DT-Pool, VAZ = VAZ-Pool.

Der DT-Pool nahm wie schon zuvor bei dem Haptophyten *P. parvum* (Abb. 3.37) auch im Schwachlicht noch weiter zu. Allerdings war bei der Schwachlichtkultur von *P. parvum* unter Norflurazon eindeutig nachweisbar, daß der DT-Pool in dieser Alge für die Synthese des Lichtsammelxanthophylls Fx verfügbar ist. Die für *M. sphaerocephalus* vorliegenden Daten liefern jedoch keine Anzeichen dafür, daß der DT-Pool in dieser Alge einen Zwischenspeicher für die Synthese anderer Xanthophylle darstellt. Wie in Kap. 3.3 noch ausführlicher diskutiert wird, ist dennoch anzunehmen, daß Ddx zumindest als Precursor für die Synthese von Heteroxanthin dient.

3.2.7 Dinophyta: *Amphidinium carterae* und *Prorocentrum cassubicum*

Abschließend wurde die Biogenese der Pigmente in Dinoflagellaten untersucht. Als Modellorganismus diente hier *A. carterae*, und ein ergänzender Versuch wurde mit *P. cassubicum* durchgeführt. Beide Algen zeichnen sich durch eine sehr hohe Carotinoid/Chl a-Stöchiometrie aus, und insbesondere *A. carterae* verfügt über große Pools der beiden Lichtsammelpigmente Peridinin und Chl c_2 (Tab. 3.21).

Tab. 3.21 *Pigmentstöchiometrien in A. carterae und P. cassubicum im Schwachlicht sowie in A. carterae nach 6 h Starklicht bei einer PFD von 700 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL1) bzw. 1000 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL2). Die Daten geben die Pigmentgehalte in mmol pro mol Chl a wieder und stellen Mittelwerte aus jeweils drei (LL) bzw. zwei (nach HL) Meßproben derselben Kultur da; der Unterschied zwischen den Meßwerten betrug maximal 15 mmol pro mol Chl a für Peridinin, 5 mmol für Chl c_2 , Ddx und Dtx und höchstens 1 mmol pro mol Chl a für die anderen Pigmente. Neben den aufgeführten Pigmenten fanden sich noch geringe Mengen an Cx, CxE, dem b-Carotin-Epoxid-ähnlichen Xanthophyll sowie trans-Neoxanthin (siehe auch Kap. 3.3). Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, Dx = Dincoxanthin, Peri = Peridinin.*

	Chl c_2	β -Car	Peri	Dx	Ddx	Dtx	Vx	Ax	Zx	Caroide
<i>Amphidinium carterae</i>										
Vor HL	426	40	1137	43	306	9	4	5	1	1545
Nach HL1	430	45	1116	84	299	100	4	10	2	1660
Vor HL	471	38	1199	36	287	2	3	1	0	1566
Nach HL2	468	40	1199	36	201	147	3	8	33	1667
<i>Prorocentrum cassubicum</i>										
LL	296	48	619	109	360	1	4	0	0	1141

Eine Schwachlichtkultur von *A. carterae* zeigte unter Norflurazon auch nach achtstündiger Inkubation nur sehr geringe Veränderungen der einzelnen Carotinoid-Pools (Abb. 3.42.A). Die Konzentrationen an β -Carotin und Dincoxanthin waren leicht rückläufig, während die Gehalte an den Xanthophyllen des DT-Pools sowie von Peridinin entsprechend stiegen. Die Zunahme der Pigmente des DT-Pools ist insofern bemerkenswert, als daß *A. carterae* schon vor der Zugabe von Norflurazon über einen verhältnismäßig großen Pool dieser Pigmente verfügt. Dennoch wird ihre Konzentration auf Kosten der vergleichsweise kleinen Pools an β -Carotin bzw. Dincoxanthin weiter erhöht. Diese Beobachtung spricht dagegen, daß der DT-Pool in *A. carterae* als Vorstufe zur Synthese von Peridinin verwendet wird. Weiterhin fällt auf, daß der Zuwachs an Chl a unter Norflurazon nur etwa 50% der Chl a-Zunahme in der Kontrollkultur betrug (Abb. 3.42.A). Dennoch bilden die Algen mit inhibierter Carotinoidbiosynthese während der Schwachlichtphase in etwa die gleiche Menge an Phytoen, die zur

Synthese der in der Kontrollkultur neu akkumulierten Carotinoide erforderlich wäre. Wie schon für die vergleichbaren Daten von *P. tricornutum* diskutiert wurde (Kap. 3.2.1), stellt deshalb der reduzierte Zuwachs an Chl a unter Norflurazon möglicherweise einen sekundären Effekt dar, der im Fall von *A. carterae* durch die limitierte Neusynthese von Peridinin verursacht sein könnte.

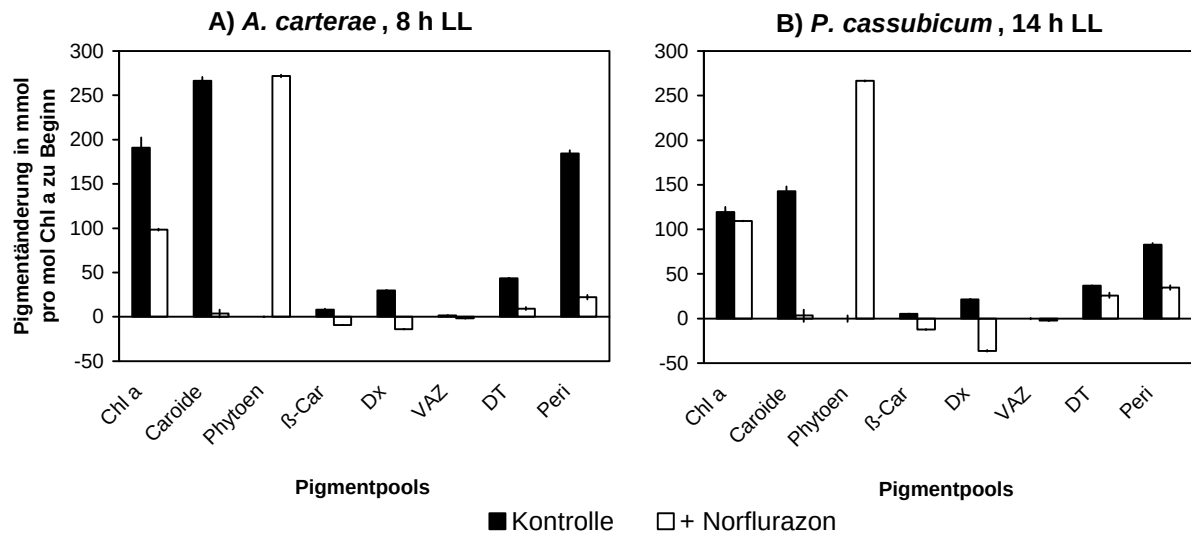


Abb. 3.42 Änderungen der Pigmentgehalte in *A. carterae* nach 8 h Schwachlichtinkubation und in *P. cassubicum* nach 14 h Schwachlichtinkubation ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) unter $5 \mu\text{M}$ Norflurazon. Die Kulturen wurde vor Versuchsbeginn für 1 h im Schwachlicht vorinkubiert. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.28. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide (ohne Phytoen), DT = DT-Pool, Dx = Dinooxanthin, Peri = Peridinin, VAZ = VAZ-Pool.

Der Befund, daß in Dinoflagellaten mit inhibierter Carotinoidbiosynthese die Xanthophylle des DT-Pools nicht zur Biosynthese von Peridinin dienen, ließ sich auch an einem weiteren Dinophyten bestätigen. Nach Zugabe von Norflurazon zu einer Schwachlichtkultur von *P. cassubicum* und anschließender Schwachlichtinkubation für 14 h zeigten auch diese Algen nur eine Abnahme von β -Carotin und Dinooxanthin, während die Konzentrationen sowohl des DT-Pools als auch von Peridinin entsprechend zunahmen. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit Pigmentmarkierungsstudien von Swift et al. (1982) an *A. carterae*. Wurde einem Zellhomogenat der Algen radioaktiv markiertes Zx zugesetzt, so war zunächst eine temporäre Akkumulation von markiertem *trans*-Neoxanthin zu beobachten, die von einem Anstieg an markiertem Ddx und Peridinin abgelöst wurde. Nach vollständigem Umsatz der markierten Pools an Zx und Neoxanthin war keine Veränderung der Konzentrationen an radioaktiv markiertem Ddx bzw. Peridinin mehr zu beobachten. Demnach war auch das Zellhomogenat von *A. carterae* nicht in der Lage, Ddx in Peridinin umzuwandeln.

Eine sechsstündige Inkubation von *A. carterae* im Starklicht bei einer PFD von $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ resultierte in einer Akkumulation der Pigmente des VAZ-Pools (Tab. 3.21). Wie Abb. 3.43 zeigt, erfolgte im anschließenden Schwachlicht eine schnelle Abnahme des VAZ-Pools bei gleichzeitiger

Zunahme von Dinoxanthin. Da für den DT-Pool und die weiteren Xanthophylle in diesem kurzen Zeitraum praktisch keine Konzentrationsänderungen festzustellen waren, wird die Zunahme an Dinoxanthin offensichtlich aus dem VAZ-Pool gespeist. Parallel zu dieser Umwandlung findet innerhalb des VAZ-Pools die Epoxidierung von Zx über Ax zu Vx statt, wie bereits in Kap. 3.1.1 gezeigt wurde (siehe Abb. 3.26.G). Daher scheint es sehr wahrscheinlich, daß Dinoxanthin in *A. carterae* aus Zx sequentiell über die Zwischenstufen Ax, Vx und *trans*-Neoxanthin gebildet wird. Dinoxanthin wiederum dient als Precursor zur Synthese von Peridinin (Abb. 3.42).

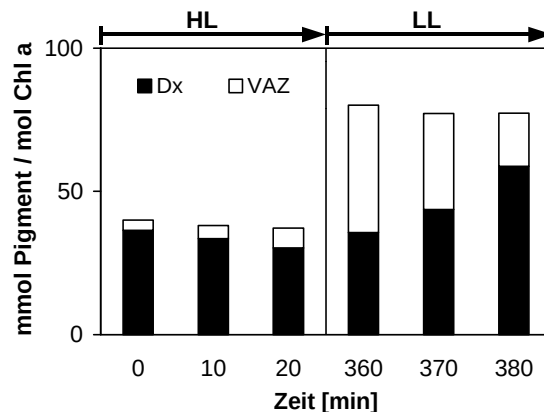


Abb. 3.43 Konzentrationsänderungen des VAZ-Zyklus und von Dinoxanthin in einer Kultur des Dinophyten *A. carterae* zu Beginn einer sechsstündigen Starklichtphase ($1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) sowie nach 6 h Starklicht im nachfolgenden Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Versuchsbedingungen wurden bereits in Abb. 3.26 beschrieben, die Daten stammen aus demselben Versuchsansatz wie die Daten in Abb. 3.26.G. Dx = Dinoxanthin, VAZ = VAZ-Pool.

Fraglich erscheint jedoch, ob Dinoxanthin auch als Vorstufe zur Synthese von Ddx dient, da in diesem Fall der Acetatrest, der mit der 3-OH-Gruppe im Molekül verestert ist, erst wieder abgespalten werden müßte (siehe hierzu auch Kap. 3.3.1, Abb. 3.46-3.47). Statt dessen wäre denkbar, daß der Zuwachs des DT-Pools in Abb. 3.42 allein aus der Umwandlung von β -Carotin resultiert. Diese Möglichkeit ist in weiteren Experimenten eingehender zu prüfen.

Das Pigmentsyntheseverhalten von *A. carterae* unter wechselnden Lichtbedingungen (Abb. 3.44) weicht in einigen Aspekten von dem der vorher untersuchten Algen ab. Dies gilt noch nicht für die sechsstündige Starklichtphase. Wie schon die anderen Algen zeigte auch *A. carterae* unter Starklicht eine drastische Reduktion der Chl a-Synthese, wogegen der Zuwachs an Carotinoiden nur leicht hinter dem der Kontrollkultur zurückblieb (Abb. 3.44.A-B). Dabei nahm Peridinin im Starklicht kaum noch zu, statt dessen stieg die Konzentration der Pigmente des DT-Pools sowie von Dinoxanthin (Abb. 3.44.D). Im nachfolgenden Schwachlicht war jedoch nicht nur eine starke Akkumulation von Chl a zu beobachten, sondern auch die Carotinoide nahmen noch stärker zu als während der vorhergehenden Starklichtperiode. Nun wurde hauptsächlich Peridinin neu gebildet, aber auch der DT-Pool

verzeichnete noch einen leichten Zuwachs. Lediglich die Konzentration von Dinoxanthin war rückläufig. Demnach erfolgte auch hier keine Umverteilung zwischen den Pigmenten des DT-Pools und Peridinin.

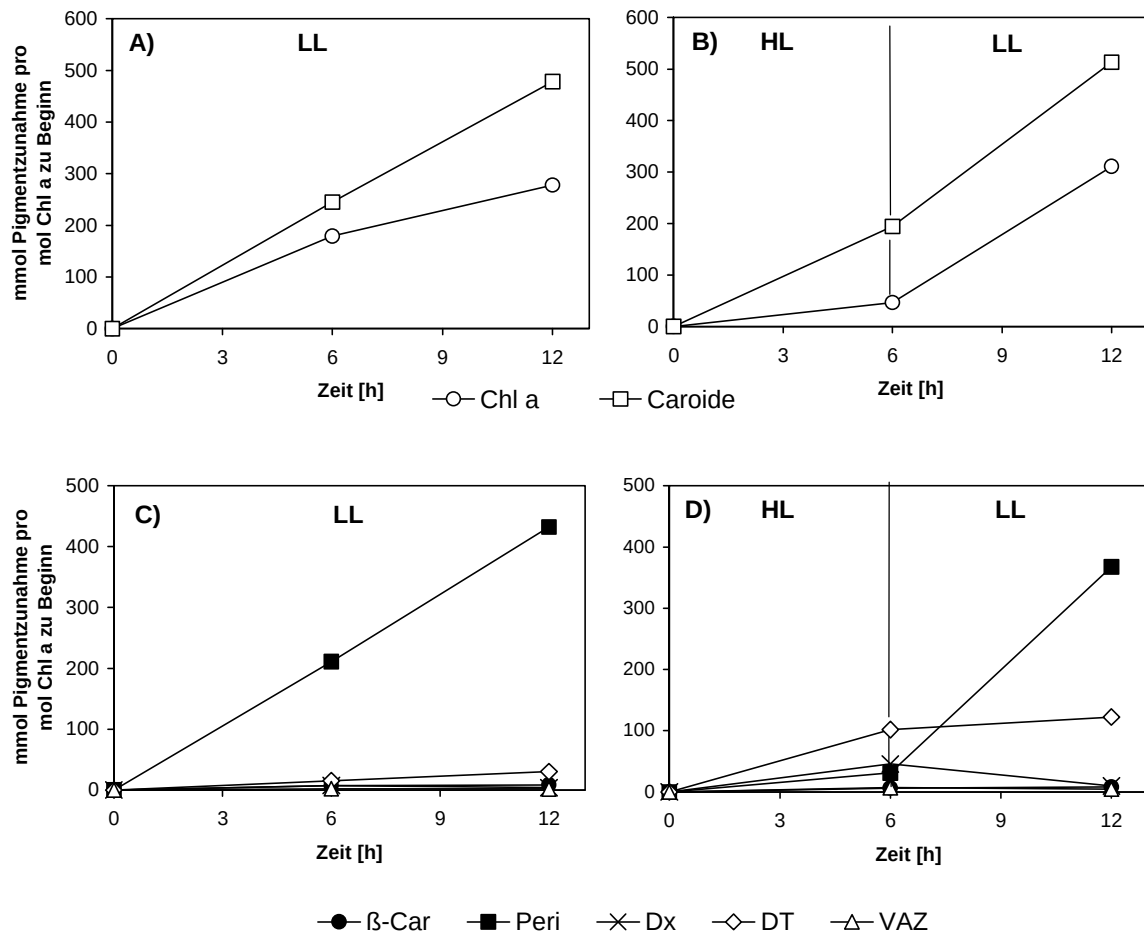


Abb. 3.44 Änderungen der Pigmentgehalte in *A. carterae* im Verlauf von (A, C) 12 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bzw. (B, D) 6 h Starklicht ($700 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gefolgt von 6 h Schwachlicht ($40 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.29. Car = Carotin, Caroide = Summe aller Carotinoide, DT = DT-Pool, Dx = Dinoxanthin, Peri = Peridinin, VAZ = VAZ-Pool.

Die Beobachtung, daß in Dinophyten Ddx offensichtlich nicht zur Biosynthese von Peridinin dient, könnte möglicherweise mit den bereits in Kap.3.1.1 diskutierten Besonderheiten des DT-Zyklus im Zusammenhang stehen. Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Bedeutung der DT-Zyklus für die Photoprotektion der Algen hat und welche Funktion Ddx in den Antennen zukommt. Außerdem sollten die hier geschilderten Experimente auch mit einem Dinoflagellaten durchgeführt werden, der im Gegensatz zu *A. carterae* (Hofmann et al. 1996) keinen wasserlöslichen PCP-Komplex besitzt; hier käme z.B. *Prorocentrum minimum* in Frage (Jovine et al. 1995). Möglicherweise fehlt auch *P. cassubicum* ein PCP, doch wiesen die hier untersuchten Kulturen zu geringe Wachstumsraten auf, und waren daher für Pigmentsynthesestudien unter wechselnden Lichtbedingungen ungeeignet.

3.3 Diskussion der Xanthophyllbiosynthese und der Xanthophyllzyklen in Chromophyten

3.3.1 Übersicht der in den untersuchten Algen identifizierten Pigmente und der aus den Experimenten ableitbaren Xanthophyllbiosynthese-Verknüpfungen in Chromophyten

In Tab. 3.22 sind für alle untersuchten Algen die jeweils identifizierten Pigmente zusammengestellt. Dabei kann die Identität der Carotinoide, die mit einem „D“ markiert sind, als gesichert betrachtet werden. Auch die Identifizierung der Pigmente mit dem Eintrag „C“ oder „d“ ist noch gut abgesichert. Für die mit einem „c“ markierten Pigmente empfiehlt es sich jedoch, ihr Vorkommen durch weitere Messungen unter Verwendung höher konzentrierter Pigmentextrakte zu bestätigen. In den Fx-haltigen Algen war der Nachweis von Neoxanthin aufgrund einer unzureichenden Trennung dieser beiden Pigmente im verwendeten HPLC-System nur über Differenzspektren möglich (erkennbar an dem Zusatz „Δ“ in Tab. 3.22). Hier sollten ergänzende Messungen mit einem HPLC-System durchgeführt werden, das hinsichtlich der Trennung von Fx und Neoxanthin optimiert ist.

Abgesehen von *C. meneghiniana* und *P. cassubicum* liegen für alle aufgeführten Algen auch Literaturdaten zur Pigmentzusammensetzung vor. Ein Vergleich dieser Daten mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Pigmentmustern zeigte völlige Übereinstimmung hinsichtlich des Vorkommens der Carotine, der Pigmente des DT-Zyklus sowie der Lichtsammelxanthophylle Fx, Peridinin, Vaucheriaxanthin-Ester und Heteroxanthin. Die Pigmente des VAZ-Zyklus dagegen wurden bisher nur in Algen ohne DT-Zyklus detektiert. Eine Ausnahme stellt lediglich der Dinoflagellat *A. carterae* dar, da in dieser Alge bereits Zx nachgewiesen wurde (Swift et al. 1982). Der Nachweis von β -Carotin-Epoxid beschränkte sich bislang auf die beiden Haptophyten *P. parvum* und *P. lutheri* (Berger et al. 1977), und über das Vorkommen von Cx und CxE wurde nur in der Chrysophyceen *O. danica* (Hager und Stransky 1970b) sowie den beiden Xanthophyceen *M. sphaerocephalus* und *P. meiringensis* berichtet (Whittle und Casselton 1975b). Beide Xanthophylle sind aber auch schon in anderen Algen aus den Klassen Chrysophyceae, Xanthophyceae und Eustigmatophyceae detektiert worden (Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989). Neoxanthin wurde bereits in allen untersuchten Algen mit Ausnahme der beiden Haptophyten gefunden (siehe Literaturangaben zu Tab. 3.22). Dinoxanthin findet sich generell in peridininhaltigen Dinoflagellaten (Johansen et al. 1974, Jeffrey et al. 1975). In den weiteren in Tab. 3.22 aufgeführten Algen wurde es bisher nicht detektiert, doch liegen vereinzelt Nachweise in Xanthophyceen und Haptophyten vor (Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989).

Die in Kap. 3.2 dargestellten Untersuchungen an Algen mit gehemmter Carotinoidbiosynthese, deren wichtigste Ergebnisse nochmals in Tab. 3.23 zusammengestellt sind, zeigten eine Reihe von Biosyntheseverknüpfungen zwischen den verschiedenen Pigment-Pools auf. Unter Norflurazon waren die Konzentrationsänderungen der Xanthophyllzykluspigmente von VAZ- und DT-Pool sowie der Lichtsammelxanthophylle am ausgeprägtesten. Dabei nahm der VAZ-Pool in allen untersuchten Algen

Tab. 3.22 Übersicht über die mittels HPLC identifizierten Carotinoide in den untersuchten Algen. C = Identifikation anhand von Retentionszeit und On-line-Spektrum; c = wie C, aber On-line-Spektrum verwechselt; D = wie C, aber zusätzlich Test auf Alkalistabilität und 5,6-Epoxidgruppen; d = wie D, aber On-line-Spektrum verwechselt; Δ = On-line-Spektrum durch Differenzspektrum gewonnen, – = Pigment mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht vorhanden. Fett und kursiv gedruckte Pigmente dienten als Referenzpigmente zur Identifikation der Pigmente in anderen Organismen. Die Referenzpigmente Cx und CxE wurden aus Papayafrüchten (*Carica papaya*), die Pigmente Vx, Ax sowie Zx aus Spinat (*Spinacia oleracea*) gewonnen. Algengruppen: B = Bacillariophyceae, C = Chrysophyceae, D = Dinophyta, E = Eustigmatophyceae, H = Haptophyta, R = Raphidophyceae, X = Xanthophyceae; Algenarten: A.c. = *Amphidinium carterae*, C.m. = *Cyclotella meneghiniana*, M.s. = *Mischococcus sphaerocephalus*, N.s. = *Nannochloropsis salina*, O.d. = *Ochromonas danica*, O.l. = *Olisthodiscus luteus*, P.c. = *Prorocentrum cassubicum*, P.l. = *Pavlova lutheri*, P.m. = *Pleurochloris meiringensis*, P.p. = *Prymnesium parvum*, P.t. = *Phaeodactylum tricornutum*; Pigmente: Car = Carotin, CarE-like = b-Carotin-Epoxid-ähnliches Xanthophyll, Dx = Dinoxanthin, Hx = Heteroxanthin, Nx = Neoxanthin, Peri = Peridinin, VauxE = Vaucheriaxanthin-Ester.

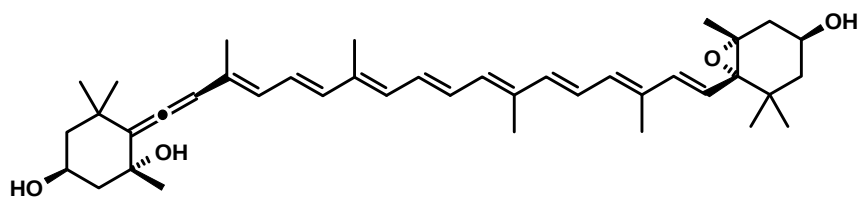
	B ^{1, 2}		R ^{3, 4}	C ^{1, 3}	H ⁵		E ⁶	X ⁷		D ^{8, 9}	
Pigment	P.t.	C.m.	O.l.	O.d.	P.p.	P.l.	N.s.	M.s.	P.m.	A.c.	P.c.
α-Car	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	–
β-Car	D	D	D	D	D	C	D	D	D	D	C
CarE-like	D	D	d	D	D	C	d	D	D	D	
CxE	D	D	D	D	–	–	D	D	D	D	cΔ
Cx	D	D	D	D	–	–	D	D	D	D	
Vx	D	D	D	D	D	C	D	D	D	D	C
Ax	D	D	D	D	D	C	D	D	D	D	cΔ
Zx	D	D	D	D	D	C	D	D	D	D	
Ddx	D	D	–	–	D	C	–	D	D	D	C
Dtx	D	D	–	–	D	C	–	D	D	D	C
trans-Nx	CΔ	CΔ	CΔ		cΔ		c	D	D	C	C
Dx	C	C	cΔ	C			C	D	D	D	C
Fx	D	D	D	D	D	C	–	–	–	–	–
Peri	–	–	–	–	–	–	–	–	–	D	C
VauxE	–	–	–	–	–	–	D	D	D	–	–
Hx	–	–	–	–	–	–	–	D	D	–	–

Literaturstellen mit Angaben zur Pigmentzusammensetzung der untersuchten Algen: ¹⁾ Hager und Stransky 1970b, ²⁾ Pennington et al. 1988, ³⁾ Withers et al. 1981, ⁴⁾ Mostaert et al. 1998, ⁵⁾ Berger et al. 1977, ⁶⁾ Antia und Cheng 1982, ⁷⁾ Whittle und Casselton 1975b, ⁸⁾ Johansen et al. 1974, ⁹⁾ Swift et al. 1982

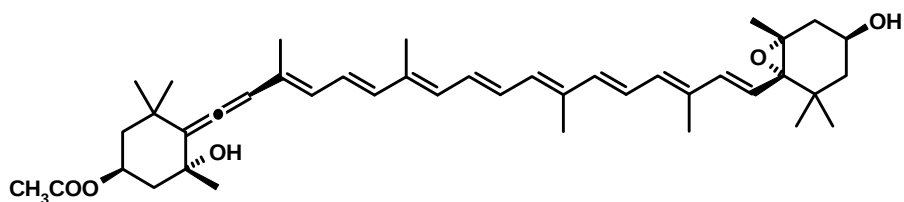
ab, während die Konzentration der Lichtsammelxanthophylle (Fx, Peridinin bzw. Vaucheriaxanthin-Ester und Heteroxanthin) stets anstieg. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der für Vx postulierten Rolle als Vorstufe bei der Synthese aller Xanthophylle mit allenischer oder acetylenischer Gruppe (Strukturformeln in Abb. 3.46 und 3.47; Bonnett 1969, Liaaen-Jensen 1978, Goodwin 1980, Milborrow 1982). In Ddx-haltigen Algen, in denen der VAZ-Pool zuvor durch eine mehrstündige Starklichtinkubation akkumuliert worden war, erfolgte unter Norflurazon zunächst ein Übergang der Pigmente des VAZ-Pools in den DT-Pool. In den beiden Kieselalgen und dem Haptophyt *P. parvum* dient der DT-Pool wiederum zur Synthese des Lichtsammelxanthophylls Fx. Für die Xanthophyceae *M. sphaerocephalus* und die beiden untersuchten Dinoflagellaten liegen jedoch keine Hinweise darauf vor, daß der DT-Pool für die Biosynthese der jeweiligen Lichtsammelxanthophylle Vaucheriaxanthin-Ester und Heteroxanthin bzw. Peridinin mobilisierbar ist.

Tab. 3.23 Übersicht über die Veränderungen der einzelnen Carotinoide in den untersuchten Algen nach Inhibition der Carotinoidbiosynthese mittels Norflurazon. Die für die Pigmente, Algengruppen und Algenarten verwendeten Abkürzungen entsprechen denen in Tab. 3.22. $\oplus$ = Pigment (-Pool) nimmt zu, $\ominus$ = Pigment (-Pool) nimmt ab, $\oplus\ominus$ = Pigment (-Pool) nimmt nur temporär zu, n.v. = Pigment (-Pool) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht vorhanden, $\blacktriangledown$ = Übergang vom VAZ-Pool in den DT-Pool.

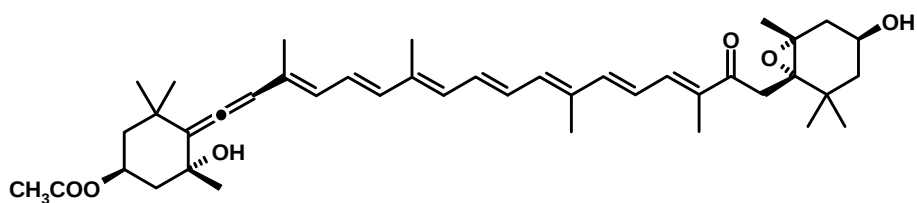
Pigment	B		R	C	H	E	X	D	
	P.t.	C.m.	O.l.	O.d.	P.p.	N.s.	M.s.	A.c.	P.c.
β -Car	$\ominus$		$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$
CarE-like				$\ominus$	$\ominus$				
CE-Pool	$\ominus$			$\ominus$	n.v.				
VAZ-Pool	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$	$\ominus$
DT-Pool	$\oplus\ominus$	$\oplus\ominus$	n.v.	n.v.	$\oplus\ominus$	n.v.	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$
<i>trans</i> -Nx							$\oplus\ominus$	$\ominus$	$\ominus$
Dx			$\ominus$	$\oplus\ominus$			$\oplus\ominus$	$\oplus\ominus$	$\ominus$
Fx	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Peri	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	$\oplus$	$\oplus$
VauxE	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	$\oplus$	$\oplus$	n.v.	n.v.
Hx	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	$\oplus$	n.v.	n.v.



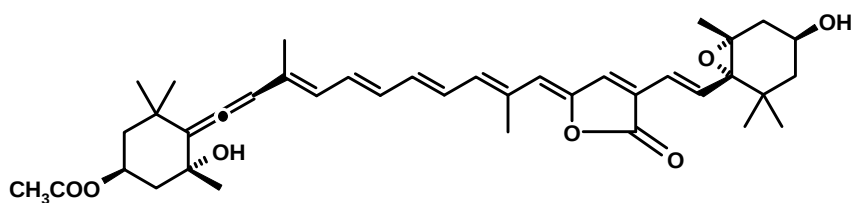
Neoxanthin



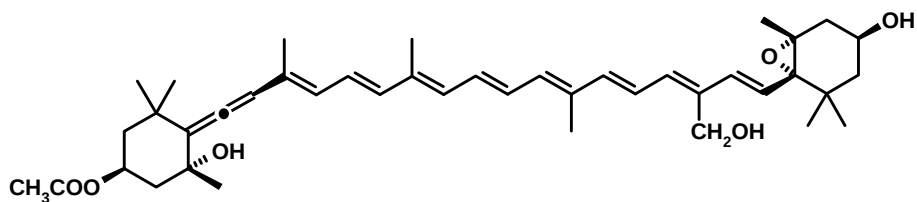
Dinoxanthin



Fucoxanthin

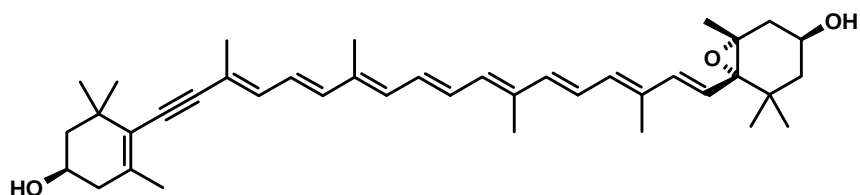


Peridinin

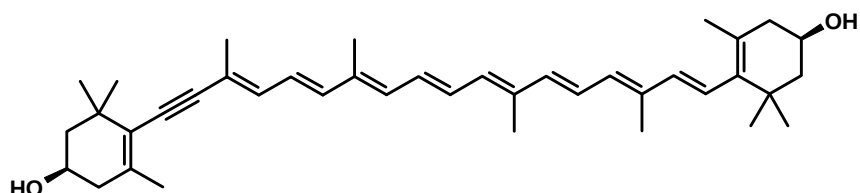


Vaucheriaxanthin-3-acetat

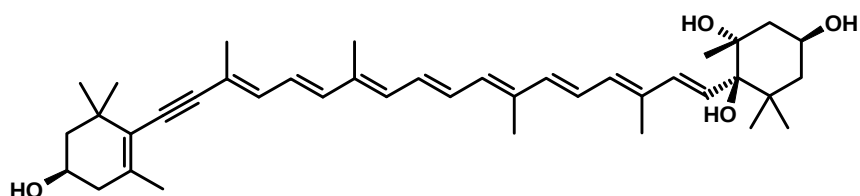
Abb. 3.45 Strukturformeln der in den untersuchten Algen identifizierten Xanthophylle mit allenischer Gruppe (nach Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989)



Diadinoxanthin



Diatoxanthin



Heteroxanthin

Abb. 3.46 Strukturformeln der in den untersuchten Algen identifizierten Xanthophylle mit acetylenischer Gruppe (nach Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989)

Dennoch legt ein Vergleich der Strukturformeln der beiden Xanthophylle Ddx und Heteroxanthin (Abb. 3.47) nahe, daß der DT-Pool in *M. sphaerocephalus* zumindest zur Synthese von Heteroxanthin dient, wie dies schon von anderen Autoren angenommen wurde (Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989). Ebenso sprechen die Strukturformeln der in Abb. 3.46 zusammengestellten Pigmente für die Annahme, daß *trans*-Neoxanthin ein Intermediat bei der Biosynthese aller weiteren Xanthophylle mit allenischer Gruppe darstellt (Goodwin 1980, Swift et al. 1982, Haugan und Liaaen-Jensen 1994). Möglicherweise gilt dies auch für Dincoxanthin, da dieses Pigment wie auch Neoxanthin in nahezu allen untersuchten Algen detektiert wurde (Tab. 3.22) und im Dinoflagellat *A. carterae* eine Zwischenstufe bei der Biosynthese von Peridinin aus Vx darstellt (Kap. 3.2.7). So wäre denkbar, daß der Schritt der Acetylierung von *trans*-Neoxanthin zu Dincoxanthin generell die Synthese der acetylierten Lichtsammelxanthophylle Fx, Peridinin und Vaucheriaxanthin-Ester einleitet.

Ein entsprechendes, hypothetisches Schema der Xanthophyllbiosynthesewege in den hier untersuchten Chromophyten ist in Abb. 3.48 dargestellt. Demnach könnte Neoxanthin in Bacillariophyceen, Xanthophyceen, Haptophyten und Dinophyten den Verzweigungspunkt bei der Biosynthese der

Xanthophylle mit acetylenischer Gruppe auf der einen und den jeweiligen Lichtsammelxanthophyllen mit allenischer Gruppe auf der anderen Seite darstellen. Da aber sowohl in den untersuchten Kieselalgen als auch im Haptophyt *P. parvum* Ddx nachweislich zur Synthese von Fx eingesetzt werden kann, bleibt noch zu klären, über welche Zwischenverbindungen diese Synthese erfolgt.

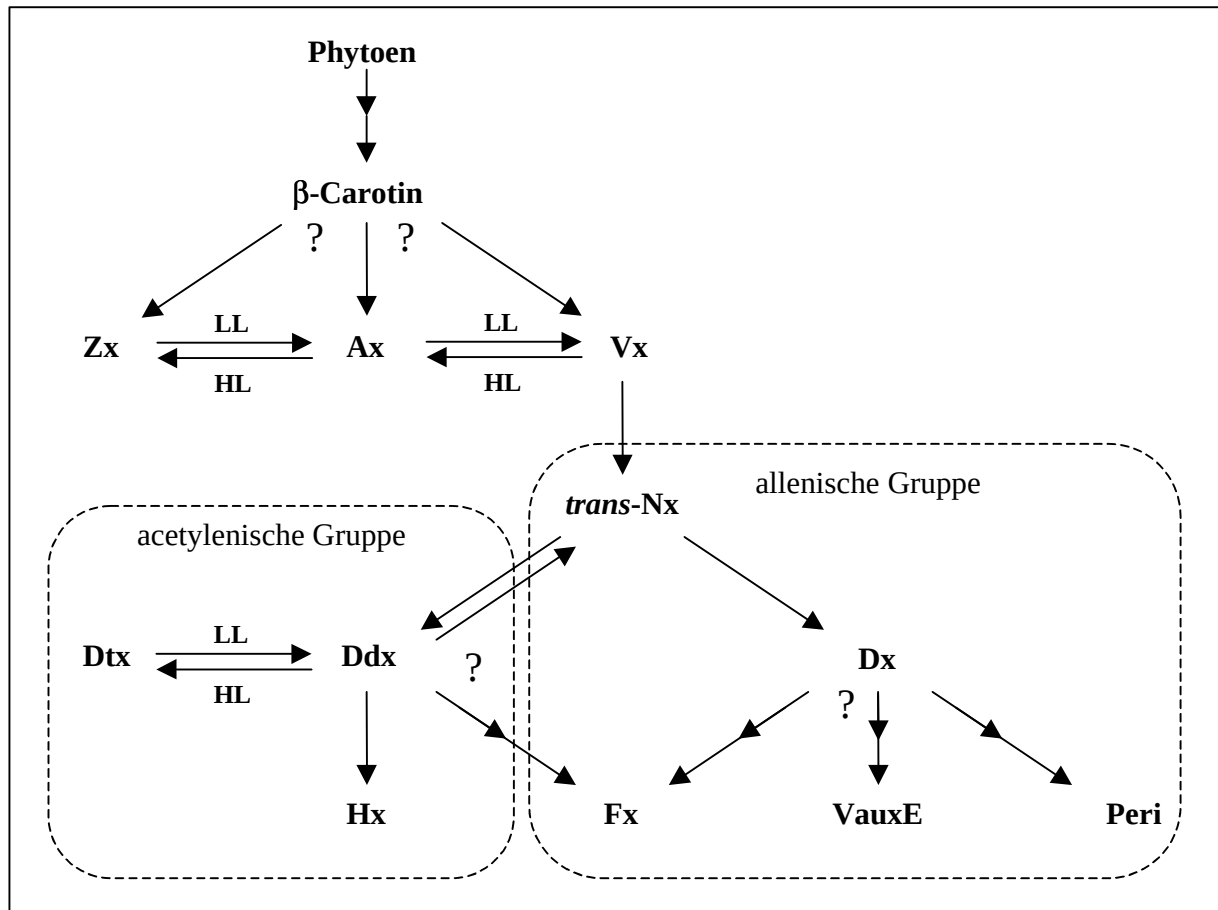


Abb. 3.47 Hypothetisches Schema der Xanthophyllbiosynthesewege in den untersuchten Algengruppen. Weitere Erläuterungen werden im Text gegeben. Dx = Dincoxanthin, Hx = Heteroxanthin, Nx = Neoxanthin, Peri = Peridinin, VauxE = Vaucheriaxanthin-Ester.

Zum einen wäre denkbar, daß in Ddx der Jononring mit der benachbarten acetylenischen Gruppe hydroxyliert wird, um wieder *trans*-Neoxanthin zu erhalten. In diesem Fall wäre die Bildung von Ddx aus Neoxanthin als reversibel anzunehmen. Alternativ könnte aber auch aus der acetylenischen Gruppe die 8-Ketogruppe in Fx hervorgehen und eine neue allenische Gruppe am gegenüberliegenden, epoxidierten Jononring gebildet werden (Liaaen-Jensen 1978, Goodwin 1980, Bjørnland und Liaaen-Jensen 1989). In diesem Fall müßte jedoch in einem späteren Schritt am anderen Jononring erneut eine Epoxidgruppe eingeführt werden. Dabei wäre fraglich, ob diese Reaktion durch die Xanthophyllzyklus-Epoxidase katalysiert werden kann, da sich in unmittelbarer Nachbarschaft des betreffenden Jononringes dann entweder die acetylenische Gruppe oder schon die in Fx vorliegende Ketogruppe befinden sollte und deshalb eine relativ geringe Substratspezifität des Enzyms angenommen werden

müßte. Die zuerst genannte Alternative erscheint auch deshalb wahrscheinlicher, da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Algen der Chrysophyceen und Raphidophyceen offensichtlich nicht in der Lage sind, acetylenische Xanthophylle zu synthetisieren; gleiches gilt auch für Braunalgen (Haugan und Liaaen-Jensen 1994). Demnach bilden diese Algen Fx direkt aus Vx, wobei Neoxanthin als eines der Intermediate angenommen werden kann (Haugan und Liaaen-Jensen 1994). Um eine endgültige Entscheidung zwischen beiden Alternativen treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. In diesem Zusammenhang ist auch weiter abzusichern, daß in Xanthophyceen und Dinoflagellaten die Xanthophylle mit acetylenischer Gruppe nicht mehr zur Synthese von Xanthophyllen mit allenischer Gruppe verwendet werden können.

Ebenso bleibt zu bestätigen, ob Dinoxanthin tatsächlich die in Abb. 3.48 postulierte Rolle als Intermediat bei der Synthese von Fx und den Vaucherixanthin-Estern zukommt, während seine Beteiligung bei der Biosynthese von Peridinin durch die vorliegenden Daten (Kap. 3.2.7) ausreichend gesichert ist. Zwar deutet die Abnahme von Dinoxanthin in Schwachlichtkulturen von *O. luteus*, *O. danica* und *M. sphaerocephalus* unter Norflurazon (Kap. 3.2 und Tab. 3.23) auf eine Precursorfunktion dieses Xanthophylls in den betreffenden Algen. Doch sind die absoluten Konzentrationsänderungen wegen der geringen Menge an Dinoxanthin in den drei Algen zu klein, um eine gesicherte Aussage darüber zu erlauben, ob Dinoxanthin tatsächlich als Vorstufe für Fx bzw. Vaucherixanthin-Ester dient.

Schließlich erfordert auch der Weg der Biosynthese von Vx aus β -Carotin weitere Untersuchungen. So konnte in allen untersuchten Algengruppen mit Ausnahme der Haptophyten sowohl Cx als auch CxE nachgewiesen werden (Tab. 3.22), wobei in Algen unter Schwachlichtbedingungen praktisch nur CxE detektierbar war. Unter Starklicht konnte zumindest in *C. meneghiniana*, *M. sphaerocephalus*, *O. danica* und *A. carterae* auch eine Akkumulation von Cx beobachtet werden, und im Fall von *M. sphaerocephalus* liegen Hinweise für einen CE-Zyklus vor. Doch war die Quantifizierung von Cx in einem Teil der HPLC-Chromatogramme aufgrund einer unzureichenden Abtrennung dieses Xanthophylls von Chl a nicht möglich, und in den meisten Fällen wiesen die analysierten Pigmentextrakte auch zu geringe Konzentrationen an Cx und CxE auf, um eine verlässliche Quantifizierung zu gewährleisten. Somit bleibt durch detailliertere Messungen zu klären, ob CxE in Chromophyten möglicherweise generell ein Intermediat in der Xanthophyllbiosynthese darstellt. Auch die Genese des vorläufig als β -Carotin-Epoxid identifizierten Xanthophylls bedarf einer Klärung. Zumindest in Haptophyten könnte β -Carotin-Epoxid eine Rolle bei der Xanthophyllbiosynthese spielen, da hier weder Cx noch CxE nachweisbar waren und in Schwachlichtkulturen von *P. parvum* die Konzentration an β -Carotin-Epoxid um eine Zehnerpotenz über der von Zx lag. Zudem zeigte dieses Xanthophyll in *P. parvum* unter Norflurazon eine Konzentrationsabnahme (Tab. 3.23).

3.3.2 Mögliche Vorteile der Verknüpfung von Xanthophyllzyklen mit der Synthese der Lichtsammelxanthophylle in Chromophyten

Wie bereits in Kap. 3.2 angesprochen wurde, bietet die Rolle der Xanthophyllzykluspigmente als Intermediate bei der Biosynthese der Lichtsammelxanthophylle die Möglichkeit, die unter Starklicht akkumulierten Lichtschutzpigmente im nachfolgenden Schwachlicht recyceln zu können. Alle in dieser Arbeit untersuchten Algen zeigten im Starklicht eine deutlich reduzierte Chlorophyllsynthese, während der Carotinoidgehalt tendenziell mit einer etwas höheren Rate zunahm als unter Schwachlichtbedingungen. In der auf die Starklichtperiode folgenden Schwachlichtphase kehrten sich die Verhältnisse um, nun erfolgte eine verstärkte Bildung von Chlorophyllen. Die Carotinoidkonzentration dagegen stagnierte in den meisten Fällen, und die Lichtsammelxanthophylle wurden zunächst aus den zuvor angereicherten Xanthophyllzykluspigmenten synthetisiert. Ein Vorteil dieser Strategie könnte darin bestehen, daß auf diese Weise unter den an die Starklichtphase anschließenden Schwachlichtbedingungen eine Konkurrenz der Biosynthesen der Carotinoide und des Chl a-Bestandteils Phytol um das gemeinsame Substrat Geranylgeranylpyrophosphat (Cunningham und Gantt 1998, Lichtenthaler 1999) vermieden wird. Da in dieser Situation die zur Verfügung stehende Lichtenergie den wachstumslimitierenden Faktor darstellt, sollte die daraus erwachsende Möglichkeit der schnellen Pigmentsynthese zur Biogenese von Lichtsammelkomplexen einen Vorteil darstellen.

Das beobachtete Pigmentsyntheseverhalten sollte auch unter energetischen Gesichtspunkten in einer optimierten Biogenese der Antennenkomplexe resultieren, wie die folgenden Ausführungen verdeutlichen. Die Grundüberlegung hierbei ist, daß den Algen unter Starklichtbedingungen – also in einer Situation, in der Lichtenergie im Überfluß zur Verfügung steht – eine weitere Akkumulation von Carotinoiden in Form der Xanthophyllzykluspigmente möglich ist, die neben ihrer photoprotektiven Funktion zugleich einen Vorrat für die erforderliche Synthese von Lichtsammelxanthophyllen bei erneuter Lichtlimitierung darstellen. Die Tab. 3.24-3.26 geben zunächst einen Überblick über die Pigment-Protein-Stöchiometrien der Lichtsammelkomplexe aus verschiedenen Chromophyten. Bei der Zusammenstellung der Daten wurden bevorzugt neuere Arbeiten berücksichtigt, in denen die LHC-Isolierung mit möglichst schonenden Verfahren erfolgte. Bisher wurde eine Bestimmung der Anzahl an Pigmentmolekülen pro Apoprotein nur für einige der Lichtsammelkomplexe vorgenommen, die in den Tabellen aufgeführt sind (die entsprechenden Angaben finden sich in den Tabellenüberschriften). Die relativen Pigmentstöchiometrien aus den weiteren zitierten Untersuchungen wurden auf Basis der an homologen Proteinen ermittelten Chl a-Protein-Stöchiometrien umgerechnet. Bei einem Vergleich der auf diese Weise gewonnenen Daten zeichnete sich für mehrere Algengruppen die Tendenz ab, daß mindestens zwei LHC-Populationen mit leicht unterschiedlichen Pigmentstöchiometrien vorliegen. Dies konnte für die Braunalgen (Phaeophyceae), die Kieselalgen (Bacillariophyceae) und die Dinoflagellaten (Dinophyta) beobachtet werden. Die beiden jeweiligen Subpopulationen sind in Tab. 3.24 und 3.26 dadurch unterschieden, daß die Daten aller unter der willkürlichen Bezeichnung „Typ 2“ eingeordneten Proteine kursiv gesetzt sind. Aus den vorliegenden Daten wurde dann für jede Algengruppe

Tab. 3.24 *Pigmentstöchiometrien in den Lichtsammelkomplexen von Fx-haltigen Algen.* Daten über die Anzahl an Chl a-Molekülen pro FCP-Komplex lagen nur für die Braunalge *L. saccharina* vor (Pascal et al. 1998); sie betrug sechs Moleküle pro Apoprotein. In allen weiteren Referenzen waren für die isolierten Komplexe nur die relativen Pigmentstöchiometrien bezogen auf Chl a angegeben. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der bisher untersuchten FCP-Apoproteine (Durnford et al. 1999) wurde jedoch für alle Komplexe die Bindung von sechs Chl a-Molekülen angenommen und auf dieser Basis die jeweilige Stöchiometrie der anderen Pigmente berechnet. Weitere Erläuterungen erfolgen im Text.

Algengruppe / -art	Protein	Pigmente				Lit.
Phaeophyceae	Molgew.	Chl a	Chl c	Fx	VAZ	
<i>Laminaria saccharina</i>	22 kDa	6	2,2	7,6	-	1
	22 kDa	6	1,4	5,3	0,5	1
	20 kDa	6	2,3	7,9	0,7	2
	20 kDa	6	1,3	5,4	-	2
<i>Pelvetia canaliculata</i>	22 kDa	6	2,0	7,5	-	3
	22 kDa	6	0,8	5,3	2,6	3
FCP-Typ 1	22 kDa	6	2	8	-	
FCP-Typ 2	22 kDa	6	1	5	1	
Chrysophyceae	Molgew.	Chl a	Chl c	Fx	VAZ	
<i>Giraudyopsis stellifer</i>	20 kDa	6	1,5	5,0	0,2	4
FCP	20 kDa	6	2	5	0	
Bacillariophyceae	Molgew.	Chl a	Chl c	Fx	DT	
3 Arten (Mw.)		6	3,7	8,0	1,1	5
<i>P. tricornutum</i>	18 kDa	6	1,9	7,5	1,3	6
	18 kDa	6	2,9	7,5	1,0	6
	18 kDa	6	2,3	7,6	0,6	7
	18 kDa	6	1,1	5,0	1,5	7
FCP-Typ 1	18 kDa	6	3	8	1	
FCP-Typ 2	18 kDa	6	1	5	2	
Haptophyta	Molgew.	Chl a	Chl c	Fx	DT	
<i>Prymnesium parvum</i>	24 kDa	6	1,8	3,6	0,9	8
FCP	24 kDa	6	2	4	1	

Literaturdaten aus: 1) Pascal et al. 1998, 2) Caron et al. 1995, 3) De Martino et al. 1997, 4) Lichtlé et al. 1995, 5) Brown 1988, 6) Caron und Brown 1987, 7) Berkaloff et al. 1990, 8) Wilhelm und Wiedemann 1991

die durchschnittliche Pigment-Protein-Stöchiometrie der bisher isolierten Komplexe ermittelt und für jedes Pigment auf einen ganzzahligen Wert gerundet.

Werden die FCP-Komplexe verschiedener Fx-haltiger Algengruppen miteinander verglichen (Tab. 3.24), so ist zunächst festzustellen, daß die Komplexe aus Phaeophyceen und Bacillariophyceen Chlorophylle und Carotinoide im Verhältnis 1:1 binden. Die potentiellen Subpopulationen in beiden Algengruppen unterscheiden sich in erster Linie in der Stöchiometrie von Fx zu den jeweiligen Xanthophyllzykluspigmenten. Die aus der Chrysophyce *G. stellifer* und dem Haptophyt *P. parvum* isolierten Antennenproteine weisen zwar einen niedrigeren Carotinoidgehalt auf als die anderen FCP-Komplexe, doch könnte es sich hierbei um ein Präparationsartefakt handeln, da in beiden Fällen Hinweise dafür vorliegen, daß im Zuge der FCP-Isolierung ein detergensbedingter Pigmentverlust auftrat (Wilhelm und Wiedemann 1991, Lichtlé et al. 1995). Die Lichtsammelkomplexe von Algen, die Vaucheriaxanthin-Ester besitzen, binden mehr Chlorophylle als Carotinoide, das Verhältnis beträgt hier etwa 2:1 (Tab. 3.25). In Dinoflagellaten schließlich liegt die umgekehrte Situation vor (Tab. 3.26). Die membranintrinsicischen iPCP-Komplexe binden zwar nur einen leichten Überschuß an Carotinoiden, doch tragen die wasserlöslichen PCP-Antennen viermal mehr Peridinin als Chl a.

Tab. 3.25 Pigmentstöchiometrien in den Lichtsammelkomplexen von Algen, die Vaucheriaxanthin-Ester besitzen. Daten über die Anzahl an Chl a-Molekülen pro LHC-Komplex lagen nur für die Eustigmatophyce *Nannochloropsis spec.* vor (Sukenik et al. 1992); sie betrug neun Moleküle pro Apoprotein. In allen weiteren Referenzen waren für die isolierten Komplexe nur die relativen Pigmentstöchiometrien bezogen auf Chl a angegeben. Analog zu Tab. 3.24 wurde für alle anderen Komplexe ebenfalls die Bindung von neun Chl a-Molekülen angenommen und auf dieser Basis die jeweilige Stöchiometrie der anderen Pigmente berechnet. Weitere Erläuterungen erfolgen im Text.

Algengruppe / -art	Protein	Pigmente					Lit.
Eustigmatophyceae	Molgew.	Chl a	Chl c	VauxE	VAZ		
<i>Nannochloropsis spec.</i>	23 kDa	9	-	2	4		1
<i>Nannochloropsis salina</i>		9	-	2,3	2,3		2
<i>Monodus subterraneus</i>	23 kDa	9	-	1,2	2,7		3
LHC	23 kDa	9	-	2	3		
Xanthophyceae	Molgew.	Chl a	Chl c	VauxE	DT	Hx	
<i>P. meiringensis</i> LHC II	22 kDa	9	0,6	1,1	1,9	0,9	4
LHC I	21 kDa	9	0,3	0,8	1,9	0,6	4
LHC	21,5 kDa	9	1	1	2	1	

Literaturdaten aus: 1) Sukenik et al. 1992, 2) Brown 1987, 3) Arsalane et al. 1992, 4) Büchel und Wilhelm 1993

Anhand der Angaben zur Pigment-Protein-Stöchiometrie sowie der Molekularmasse der Apoproteine läßt sich nun der Lichtenergiebedarf berechnen, der zur Biosynthese der einzelnen Komponenten der Lichtsammelkomplexe erforderlich ist. In Tab. 3.27 sind die auf diese Weise berechneten prozentualen Anteile der Proteinkomponente, der Chlorophylle und der Carotinoide am Lichtenergiebedarf für die LHC-Synthese in verschiedenen Chromophyten angegeben. Zusätzlich wurde auch der Energiebedarf bei der Biosynthese des LHC II aus Höheren Pflanzen nach Komponenten aufgeschlüsselt.

Tab. 3.26 *Pigmentstöchiometrien in den Lichtsammelkomplexen der peridininhaltigen Dinoflagellaten.* Hier fehlte nur für *G. polyedra* die Angabe der Chl *a*-Moleküle pro iPCP- bzw. PCP-Komplex. Auf der Grundlage der Chl *a*-Stöchiometrien, die für die Komplexe aus den anderen Dinoflagellaten vorlagen, wurde die Bindung von sieben Chl *a* für den iPCP- und zwei Chl *a* für den PCP-Komplex aus *G. polyedra* angenommen und die Stöchiometrie der anderen Pigmente entsprechend berechnet. Weitere Erläuterungen erfolgen im Text.

Dinophyta	Protein	Pigmente					Lit.
iPCP (=ACP)	Molgew.	Chl a	Chl c	Peri	DT	Dx	
<i>Amphidinium carterae</i>	19 kDa	7	4	12	2	-	1
<i>Heterocapsa pygmaea</i>	19 kDa	7	4	8	2	-	2
	19 kDa	7	4	6	4	-	2
<i>Gonyaulax polyedra</i>	19 kDa	7	1,6	8,5	2	0,7	3
iPCP-Typ 1	19 kDa	7	4	12	2	-	
iPCP-Typ 2	19 kDa	7	3	8	3	-	
PCP	Molgew.	Chl a	Chl c	Peri	DT	Dx	
<i>Amphidinium carterae</i>	30 kDa	2	-	8	-	-	4
<i>Gonyaulax polyedra</i>	32 kDa	2	-	8,8	-	-	4
PCP	30 kDa	2	-	8	-	-	

Literaturdaten aus: 1) Hiller et al. 1993, 2) Jovine et al. 1995, 3) Knoetzel und Rensing 1990, 4) Hofmann et al. 1996

Zunächst läßt sich feststellen, daß der Energiebedarf für die Synthese des jeweiligen Apoproteins mindestens die Hälfte der erforderlichen Gesamtenergie ausmacht. Im Durchschnitt liegt er bei 60%. Das Apoprotein des iPCP der Dinoflagellaten hat mit 50% den geringsten, das PCP-Protein jedoch mit 80% den höchsten Anteil am jeweiligen Gesamtenergiebedarf. Bei der Biosynthese der Pigmentkomponenten haben in den FCP- und den iPCP-Komplexen die Chlorophylle und Carotinoide erwartungsgemäß auch vergleichbare Anteile am Gesamtenergiebedarf infolge ihrer äquimolaren Stöchiometrie. Eine Ausnahme scheinen die FCP-Komplexe aus Chrysophyceen und Haptophyten zu bilden. In beiden Fällen liegen den Berechnungen jedoch vermutlich fehlerhafte Pigmentstöchiometrien zugrunde, wie bereits diskutiert wurde. Entsprechend kann hinsichtlich der für die

Biosynthese von Chlorophyllen bzw. Carotinoiden in FCP-Komplexen aufgewendeten Energiemengen generell von einem Quotienten von etwa 1,3 ausgegangen werden. Für den wasserlöslichen PCP beträgt aufgrund seines sehr niedrigen Chlorophyllgehaltes der Quotient 0,4, wobei hier allerdings die Synthese des Apoproteins, wie schon erwähnt, einen außerordentlich großen Anteil am Gesamtenergieaufwand ausmacht.

Tab. 3.27 *Prozentualer Anteil der Proteinkomponente, der Chlorophylle und der Carotinoide am Energieaufwand für die LHC-Synthese in den verschiedenen Algengruppen. Der Lichtenergieaufwand für die LHC-Komponenten unter Verwendung von Nitrat als Stickstoffquelle wurde auf der Grundlage der Pigment-Protein-Stöchiometrien in Tab. 3.24-3.26 und der folgenden Angaben in Raven (1984) berechnet: 625 mol Photonen pro kDa Protein, 684 mol pro mol Chl a bzw. Chl b, 392 mol pro mol Chl c, 462 mol pro mol Fx, 476 mol pro mol Vaucheriaxanthin-Ester und 448 mol pro mol aller anderen Carotinoide. Für den LHC II der Höheren Pflanzen wurden die folgenden Pigment-Protein-Daten verwendet: Das Apoprotein (25 kDa) bindet sieben Chl a, fünf Chl b, zwei Lutein und je ein Molekül Neoxanthin bzw. Vx (Jansson 1994, Ruban et al. 1999). Chl / Caroid = Verhältnis zwischen den zur Synthese des Chlorophyll- und des Carotinoidanteils im jeweiligen LHC erforderlichen Energiebeträgen.*

Algengruppe		Protein	Chlorophylle	Carotinoide	Chl / Caroid
Phaeophyceae	FCP-Typ 1	62%	22%	17%	1,3
	FCP-Typ 2	65%	21%	13%	1,6
Chrysophyceae	FCP	63%	25%	12%	2,1
Bacillariophyceae	FCP-Typ 1	54%	26%	20%	1,3
	FCP-Typ 2	59%	24%	17%	1,4
Haptophyta	FCP	68%	22%	10%	2,2
Dinophyta	iPCP-Typ 1	48%	26%	26%	1,0
	iPCP-Typ 2	52%	26%	22%	1,2
	PCP	79%	6%	15%	0,4
Xanthophyceae	LHC I	63%	30%	7%	4,2
	LHC II	63%	29%	8%	3,6
Eustigmatophyceae	LHC	61%	28%	11%	2,7
Höhere Pflanzen	LHC II	61%	32%	7%	4,6

Für die Lichtsammelkomplexe der Xanthophyceen und der Eustigmatophyceen schließlich, die neben Chl a hauptsächlich Vaucheriaxanthin-Ester und Violaxanthin binden, liegt dieser Quotient zwischen 3 und 4. Da hier pro Apoprotein nur etwa halb so viele Carotinoide gebunden werden wie in den FCP-Komplexen, ist der Anteil der Carotinoide am Gesamtenergiebedarf auch entsprechend geringer. Damit liegen in den beiden letztgenannten Algengruppen sehr ähnliche Verhältnisse vor wie im Chl a/b-bindenden LHC II der Höheren Pflanzen, und sie heben sich deutlich von Algen ab, die Fx

oder Peridinin als Haupt-Lichtsammelpigment besitzen. Außerdem läßt sich zumindest für Eustigmatophyceen die Trennung zwischen den Xanthophyllzykluspigmenten mit photoprotektiver Funktion auf der einen und den Lichtsammelxanthophyllen auf der anderen Seite nicht so strikt treffen wie in den Fx-haltigen Algen, da Vx in Eustigmatophyceen nachweislich auch an der Lichtsammlung beteiligt ist (Owens et al. 1987, Trautman et al. 1990; vgl. auch Kap. 3.2.5). Da das Hauptxanthophyll Lutein in den Lichtsammelkomplexen der Höheren Pflanzen sich von α -Carotin ableitet, besteht hier keine Biosyntheseverbindung zwischen Lutein und den Xanthophyllzykluspigmenten; letztere dienen jedoch zur Synthese von Neoxanthin (Cunningham und Gantt 1998; vgl. auch Abb. 1.6 der Einleitung).

Demnach können Algen mit FCP- oder PCP-Komplexen durch das Recycling der Xanthophyllzyklus-Pigmente eine größere Energieeinsparung erzielen als die Algengruppen, die LHC-Komplexe mit Vaucheriaxanthin-Estern besitzen. Dabei erscheint die durch eine Xanthophyllweiterverwertung erreichbare Verringerung des Energiebedarfs der FCP-Biogenese um etwa 20% zunächst als nicht sehr hoch. Doch ist zu berücksichtigen, daß eine längere Starklichtphase temporär zu einer erhöhten mitochondrialen Atmung (Cospers 1982, Raghavendra et al. 1994, Xue 1996) und einer Reduktion der photosynthetischen Quantenausbeute (Falk et al. 1992, Ting und Owens 1994, Wilhelm et al. 1995, Hanelt et al. 1997) der Algen unter lichtlimitierten Bedingungen führt. Dies resultiert in einer stark abgeflachten Lichtsättigungskurve der Sauerstoffentwicklung und einer Erhöhung des Lichtkompensationspunktes (Falkowski und Owens 1978, Leverenz et al. 1990, Henley 1993, Ting und Owens 1994). Folglich ist auch die Netto-Produktion an Reduktionsäquivalenten in dieser Phase geringer. Aus bisherigen Experimenten an *P. tricornutum* (Geider et al. 1985; Lohr, Müller und Wilhelm, unveröffentlicht) läßt sich abschätzen, daß an Schwachlicht adaptierte Algen nach mehrstündiger Inkubation bei einer PFD von etwa $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ im anschließenden Schwachlicht bei $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ während der ersten Stunden nur $20\text{-}30 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl a})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ freisetzen. Die Zunahme an Fx in dieser Phase läßt sich anhand der Daten in Tab. 3.6 berechnen und beträgt etwa $0,018 \text{ mg Fx} \cdot (\text{mg Chl a})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Würden diese Fx-Moleküle *de novo* aus CO_2 synthetisiert, so würde die Bereitstellung der hierfür erforderlichen Reduktionsäquivalente zu einer Sauerstoffentwicklung von $1,6 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg Chl a})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ führen, was etwa 5-7% der Netto-Sauerstoffentwicklung bei $40 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ entspräche. Diese Rechnung deutet auf ein nicht unerhebliches Einsparungspotential durch Weiterverwendung der Xanthophyllzykluspigmente zur Fx-Synthese, doch sind zu ihrer Bestätigung noch möglichst exakte und zugleich zeitaufgelöste Messungen der Sauerstoffentwicklung in den Turbidostatkulturen nach 6 h Starklicht durchzuführen.

Dennoch kann schon jetzt konstatiert werden, daß die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene enge Biosynthesebeziehung zwischen den Xanthophyllzykluspigmenten und den Lichtsammelxanthophyllen es den Chl a/c-haltigen Algen ermöglicht, das Verhältnis zwischen Lichtschutz- und Lichtsammelpigmenten den Erfordernissen der jeweiligen Lichtsituation rasch anzupassen. Diese dynamische Regulation ist unter den wechselhaften Lichtbedingungen, mit denen

einzellige Algen in ihrem natürlichen Habitat konfrontiert werden, möglicherweise von besonderem Vorteil (Larkum und Barrett 1983, Falkowski 1984).

In diesem Zusammenhang ist noch auf die Frage einzugehen, ob in Algen mit DT-Zyklus auch die unter Starklicht akkumulierenden Xanthophylle des VAZ-Zyklus zum NPQ und damit zur Photoprotektion beitragen. Wie schon in der Einleitung (siehe Tab. 1.2) dargestellt wurde, finden sich unter den Fx-haltigen Algengruppen sowohl solche mit DT-Zyklus als auch solche mit VAZ-Zyklus. Dabei ist die Ausbildung des NPQ in Algen mit VAZ-Zyklus wie den Phaeophyceen (Uhrmacher et al. 1995, Schofield et al. 1998, Harker et al. 1999) oder den Chrysophyceen (Lichtlé et al. 1995) ebenso eng mit der Akkumulation von Zx korreliert wie in Algen mit DT-Zyklus mit der Bildung von Dtx (Demers et al. 1991, Aرسالane et al. 1994, Olaizola und Yamamoto 1994, Olaizola et al. 1994). Auch die FCP-Gene, die bisher aus den oben genannten Fx-haltigen Algengruppen isoliert wurden, weisen untereinander eine sehr hohe Homologie auf (Durnford et al. 1996, 1999). Daher scheint die Annahme gerechtfertigt, daß in den Algen mit DT-Zyklus nicht nur Dtx, sondern auch Zx eine Verstärkung des NPQ in den Antennenkomplexen bewirken kann.

Bisherige Fluoreszenzmessungen an *P. tricornutum* deuten auf einen linearen Zusammenhang zwischen der Dtx-Konzentration und dem Ausmaß von NPQ hin (Aرسالane et al. 1994, Olaizola et al. 1994, Casper-Lindley und Björkman 1998). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Xanthophyllzykluskinetiken in *P. tricornutum* ergaben, daß das akkumulierte Vx um den Faktor 4 langsamer deepoxidiert wird als Ddx (Tab. 3.10, Abb. 3.18 bzw. 3.20). Entsprechend wird auch Zx deutlich langsamer gebildet als Dtx, während sich der Ax-Gehalt praktisch nicht ändert (Abb. 3.16). Dieser Umstand könnte eine Möglichkeit eröffnen, zwischen den potentiellen Beiträgen von Dtx und Zx zum NPQ in *P. tricornutum* zu differenzieren. Sofern nämlich Dtx und Zx beide zur Ausbildung des NPQ beitragen, sollte die Kinetik der NPQ-Entwicklung eine schnelle Phase aufweisen, die maßgeblich durch den relativ starken Anstieg der Dtx-Konzentration bestimmt wird, sowie eine langsame Phase, die allein aus der weiteren Zunahme an Zx resultiert. Entsprechend sind parallele Messungen der Kinetiken des NPQ und der Bildung von Zx bzw. Dtx in *P. tricornutum* durchzuführen und die resultierenden Daten gegeneinander aufzutragen. In ersten diesbezüglichen Experimenten an *P. tricornutum* wurden jedoch erhebliche Abweichungen zwischen den Kinetiken der NPQ-Ausbildung und der Akkumulation insbesondere von Dtx beobachtet (Lohr und Wilhelm, unveröffentlicht). Zwar zeigte die Entwicklung von NPQ unter Starklicht mit einer PFD von $2900 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ einen zweiphasigen Anstieg, doch betrug die Ratenkonstante der schnellen Phase etwa den zweifachen Wert der Ratenkonstante der Dtx-Bildung. Die Kinetiken der langsamen NPQ-Phase und der Bildung von Zx stimmten dagegen besser überein. Diese vorläufigen Ergebnisse sind jedoch durch weitere Untersuchungen zu ergänzen und wurden deshalb auch nicht in diese Arbeit aufgenommen.

Ein weiterer Punkt, der sich augenblicklich nur spekulativ diskutieren läßt, betrifft die Frage, warum der VAZ-Zyklus in einer Reihe von Algengruppen durch den DT-Zyklus ersetzt wurde. Wie die

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, sind diese Algen prinzipiell dazu in der Lage, auch die Pigmente des VAZ-Zyklus zu bilden. Trotzdem besitzen sie in der Regel neben den Lichtsammel-xanthophyllen nur noch die Pigmente des DT-Zyklus in größerer Konzentration. Daraus ergibt sich die Frage nach möglichen Vorteilen für die Algen bei Verwendung eines DT-Zyklus anstelle des VAZ-Zyklus. Einen Ansatzpunkt könnten die schnelleren Umwandlungskinetiken des DT-Zyklus darstellen. Da Ddx nicht nur in *P. tricornutum*, sondern auch durch die Violaxanthin-Deepoxidase aus Salat (Yamamoto und Higashi 1978) deutlich schneller deepoxidiert wird als Vx, stellt Ddx möglicherweise generell ein besseres Substrat für die Deepoxidase dar. Entsprechend läßt sich Dtx im Starklicht schneller akkumulieren als Zx. Umgekehrt verläuft auch bei der Rückreaktion zumindest in *P. tricornutum* die Bildung von Ddx schneller als die von Vx, da die Epoxidierung von Zx zu Vx über die Zwischenstufe Ax verläuft (Abb. 3.16) und die Epoxidierungsraten für Dtx, Zx und Ax annähernd gleich sind (Tab. 3.9). Deshalb wäre denkbar, daß der DT-Zyklus die Algen zu einer schnelleren Anpassung der photochemischen Quantenausbeute an die rasch wechselnden Lichtbedingungen befähigt, mit denen sie im aquatischen Lebensraum konfrontiert werden (Larkum und Barrett 1983, Falkowski 1984).

Sowohl die Frage nach potentiellen Vorteilen des DT-Zyklus als auch die nach der Fähigkeit von Zx zur Verstärkung des NPQ in Algen mit DT-Zyklus ließen sich am einfachsten an Pigmentmutanten dieser Algen studieren, die nicht mehr in der Lage sind, aus Vx Xanthophylle mit acetylenischer Gruppe zu bilden. Die entsprechenden Mutanten sollten auch Aufschluß darüber geben können, ob in Algen mit DT-Zyklus Ddx ein obligatorisches Intermediat bei der Synthese von Fx darstellt. Kieselalgen erscheinen jedoch ungeeignet für solche Untersuchungen, da diese Algen ein diploides Genom besitzen (Round und Crawford 1990) und deshalb bei Deaktivierung eines Gens z.B. durch Insertionsmutagenese eine Kompensation des resultierenden Gendefektes durch das entsprechende Allel auf dem homologen Chromosom zu erwarten ist. Möglicherweise lassen sich entsprechende Untersuchungen mittelfristig an Haptophyten durchführen. So deuten durchflußzytometrische Untersuchungen an *Prymnesium patelliferum* und *P. parvum* darauf hin, das diese beiden bisher als eigenständige Arten angesehen Algen die Haplo- bzw. Diplophase eines haplodiaplontischen Lebenszyklus darstellen (Larsen und Edvardsen 1998). Hier würde sich demnach bei der haplontischen Phase die Möglichkeit einer Insertionsmutagenese bieten, doch wären für diese Algen zunächst geeignete Transformations- und Selektionsverfahren zu entwickeln.

3.3.3 Evolution der Xanthophyllzyklen und der Xanthophyllbiosynthese in Chromophyten

Abschließend sollen noch einige Aspekte zur Evolution der Xanthophyllzyklen sowie der Xanthophyllbiosynthese in Chromophyten diskutiert werden, die mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Verbindung stehen. Dabei wird der bereits in Kap. 1 der Einleitung dargestellte aktuelle Erkenntnisstand zur Phylogenie der Chl a/c-haltigen Algen vorausgesetzt, und die dort aufgeführte Referenzliteratur wird hier nur in Ausnahmen nochmals zitiert.

Einer der Befunde der vorliegenden Arbeit ist, daß Algen mit DT-Zyklus prinzipiell auch die Pigmente des VAZ-Zyklus synthetisieren können, da Vx ein vermutlich obligatorisches Intermediat bei der Biosynthese von Xanthophyllen mit allenischer oder acetylenischer Gruppe darstellt. Es erscheint daher als sehr wahrscheinlich, daß der VAZ-Zyklus phylogenetisch älter ist als der DT-Zyklus. Für die Einführung des DT-Zyklus war möglicherweise nur die Entwicklung eines Enzyms zur Synthese der acetylenischen Gruppe in Ddx und Dtx erforderlich. Diese Annahme wird durch den schon mehrfach erwähnten Befund gestützt, daß die Violaxanthin-Deepoxidase aus Höheren Pflanzen auch Ddx als Substrat akzeptiert (Yamamoto und Higashi 1978, Hager 1980). Allerdings bleibt noch zu zeigen, daß die entsprechende Epoxidase aus Höheren Pflanzen neben Zx und Ax auch Dtx umsetzen kann.

Sofern nun die beiden Xanthophyllzyklusenzyme während der Evolution der Photosynthese nur einmal entstanden sind, muß dies vermutlich auf der Stufe der ersten photosynthetisch aktiven eukaryotischen Zellen geschehen sein, die aus der primären Endosymbiose resultierten, und zwar noch bevor sich die Linien der Grün- und der Rotalgen entwickelten. Gegen eine frühere Entstehung sprechen alle bisherigen Untersuchungen an Cyanobakterien, wonach diese nicht über die Fähigkeit verfügen, Epoxy-Xanthophylle zu bilden (Liaaen-Jensen 1978, Young 1993). Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, haben die Algen der Abteilungen Heterokontophyta und Haptophyta ihre Plastiden durch sekundäre Endosymbiose mit Vorläufern der heutigen Rhodophyta erworben (Bhattacharya und Medlin 1998), wobei mit der als ursprünglicher angesehenen Rotalgen-Unterklasse der Bangiophycidae eine engere Verwandtschaft besteht als mit den abgeleiteten Florideophycidae (Oliveira und Bhattacharya 2000). Auch für die Dinophyta liegen inzwischen plastidäre Gensequenzen vor, die nahelegen, daß die peridininhaltigen Vertreter dieser Algengruppe aus einer sekundären Endosymbiose von Sporozoen mit Rotalgen hervorgegangen sind (Zhang et al. 1999). Die Algen aller drei Abteilungen verfügen über Xanthophyllzyklen, während von Rotalgen zunächst angenommen wurde, daß ihnen epoxidierte Xanthophylle und damit auch ein Xanthophyllzyklus grundsätzlich fehlen (Stransky und Hager 1970b, Hager 1980, Demmig-Adams und Adams 1993). Allerdings ist im Rahmen der bisher durchgeführten Pigmentanalysen von Rotalgen bereits mehrfach das Auftreten von Xanthophyllen mit 5,6-Epoxidgruppen und vereinzelt sogar von solchen mit allenischer Gruppe berichtet worden, wie die in Tab. 3.28 zusammengestellten Daten zeigen. In einigen der aufgeführten Fälle könnten die nachgewiesenen Xanthophylle von einer Kontamination der untersuchten Rotalgenthalli mit epiphytischen Diatomeen herrühren (Liaaen-Jensen 1978), doch liegen mehrere Studien vor, in denen eine diesbezügliche Überprüfung keine Anzeichen für solche Verunreinigungen lieferte (Bjørnland und Aguilar-Martinez 1976, Bjørnland et al. 1984, Hegazi et al. 1998). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang eine Untersuchung von Rmiki et al. (1996), die in zwei Arten der Gattung *Gracilaria* bei einem Wechsel von Schwach- zu Starklichtbedingungen eine rasche Umwandlung von Ax in Zx feststellen konnten, wie sie für die Deepoxidierungsreaktion im Rahmen eines Xanthophyllzyklus typisch ist. Dieser Beobachtung sollte unbedingt genauer

nachgegangen werden. Da in den anderen in Tab. 3.28 aufgeführten Untersuchungen nicht überprüft wurde, ob unter Starklicht eine Deepoxidierung der detektierten Epoxy-Xanthophylle erfolgt, besteht die Möglichkeit, daß auch in der Gruppe der Rotalgen Xanthophyllzyklen weiter verbreitet sind als bisher angenommen. Dies würde in der Tat die Annahme favorisieren, daß die Xanthophyllzyklusenzyme aller rezenten Algengruppen einen gemeinsamen Ursprung haben und nicht das Ergebnis einer konvergenten Entwicklung darstellen.

Tab. 3.28 Rotalgenspezies, für die von einem Vorkommen größerer Mengen an Xanthophyllen mit 5,6-Epoxidgruppe oder allenischer Gruppe berichtet wurde. Für jede Alge ist der Prozentanteil des jeweiligen Pigmentes an ihrem Carotinoidgesamtgehalt angegeben. Im Fall von *Jania rubens* lagen keine Daten zur Pigmentquantifizierung vor, hier wurden die Pigmentmengen aus dem in der zitierten Literatur abgebildeten HPLC-Chromatogramm abgeschätzt. + = Pigment vorhanden, ++ = Pigment in hoher Konzentration vorhanden, C = Carotin, Lt = Lutein, LtE = Lutein-Epoxid, Nx = Neoxanthin.

Algenspezies	Ordnung	α -C	Lt	LtE	β -C	Cx	Zx	Ax	Vx	Nx	Fx	Lit.
Bangiophycidae												
<i>Erythrotrichia carnea</i>	Bangiales				25	7	3	65				1
Florideophycidae												
<i>Nemalion helminthoides</i>	Nemaliales	1	44		12						43	2
<i>Jania rubens</i>	Corallinales	+	+		+	+	++		+		++	3
<i>Gracilaria gracilis</i>	Gracilariales				32		46	22				4
<i>G. multipartita</i>	Gracilariales				26		41	33				4
<i>G. lichenoides</i>	Gracilariales				24	11	19	25				5
<i>G. verrucosa</i>	Gracilariales				52			34	14			6
<i>Melanthalia abscissa</i>	Gracilariales	25		19	12	22				21		7
<i>Hypnea musciformis</i>	Gigartinales	9		14	26	6	14				17	8
<i>Acanthophora spicifera</i>	Ceramiales				23	4	19	32				5
<i>Cladhymenia oblongifolia</i>	Ceramiales			7	33	11	36	12				7
<i>Chondria sp.</i>	Ceramiales			29	33	16			21			7
<i>Dasya elegans</i>	Ceramiales			15	15	38	5		12			8
<i>Vidalia colensoi</i>	Ceramiales			10	28	9		12	41			7

Literaturdaten aus: 1) Bjørnland et al. 1984, 2) Bjørnland und Aguilar-Martinez 1976, 3) Hegazi et al. 1998, 4) Rmiki et al. 1996, 5) Aihara und Yamamoto 1968, 6) Brown und McLachlan 1982, 7) Czezuga und Taylor 1987, 8) Czezuga 1979

Gleiches könnte auch für das bisher noch nicht identifizierte Enzym gelten, das die Synthese der allenischen Gruppe in Neoxanthin und den abgeleiteten Xanthophyllen Dincoxanthin, Fx, Peridinin und Vaucherixanthin katalysiert. Da bisher jedoch nur für eine Rotalge das Vorkommen von Neoxanthin berichtet wurde, bleiben weitere Untersuchungen abzuwarten. Auch die sporadischen Nachweise von

Fx in Rotalgen bedürfen weiterer Bestätigung. Sollte jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden, daß zumindest einige Rotalgenarten über die erforderliche Enzymausstattung zur Synthese von Fx verfügen, so spräche dies für die Annahme, daß die Fähigkeit zur Fx-Synthese in der Algenevolution nur einmal innerhalb der Rotalgenlinie nach Abtrennung von den Grünalgen entwickelt wurde. Die Fx-haltigen Klassen der Heterokontophyta und die Haptophyta hätten diese Fähigkeit dann durch ihre Rotalgen-Endosymbionten erlangt.

Vergleichbare Überlegungen können schließlich auch für die Evolution der Enzyme angestellt werden, welche für die Biosynthese der acetylenischen Gruppe in Xanthophyllen wie Ddx, Dtx und Heteroxanthin verantwortlich sind. Sofern die Fähigkeit zur Synthese der acetylenischen Gruppe in der Evolution nur einmal entstand, müßte dies ebenfalls schon vor der Trennung von Grünalgen- und Rotalgenlinie geschehen sein, da sich acetylenische Xanthophylle nicht nur in Heterokontophyta, Haptophyta, Dinophyta und Cryptophyta finden, sondern auch in Algen aus der Abteilung Euglenophyta anzutreffen sind, die wahrscheinlich einer sekundären Endosymbiose mit einem sehr frühen Vertreter aus der Grünalgenlinie entstammen (Bhattacharya und Medlin 1995, 1998; Cavalier-Smith 1999). Gegen diese Annahme spricht allerdings, daß bisher weder in Grün- noch in Rotalgen acetylenische Xanthophylle gefunden wurden (Liaaen-Jensen 1978, Young 1993). Daher erscheint es wahrscheinlicher, daß die Fähigkeit zur Synthese von Ddx in den Euglenophyta unabhängig von den anderen hierzu befähigten Algengruppen entwickelt wurde (Cavalier-Smith 1999).

Die Fähigkeit zur Synthese von acetylenischen Xanthophyllen ist in allen von den Rotalgen abstammenden Linien der Heterokontophyta, der Haptophyta, Dinophyta und der Cryptophyta zu finden. Haptophyten, die peridininhaltigen Dinophyten und mehrere Klassen der Heterokontophyta besitzen den DT-Zyklus, die Xanthophyceen und Phaeothamniophyceen zusätzlich Heteroxanthin (Bailey et al. 1998). Die Cryptophyceen schließlich verfügen über das Xanthophyll Alloxanthin, das an beiden Jononringen je eine acetylenische Gruppe besitzt. Die Plastiden dieser Linien unterscheiden sich ausreichend, um von unabhängigen sekundären Endosymbioseereignissen auszugehen (Bhattacharya und Medlin 1998, Oliveira und Bhattacharya 2000). Unter der Annahme, daß auch die Vorfahren der rezenten Rotalgen zur Synthese von acetylenischen Xanthophyllen nicht in der Lage waren, müßte diese Fähigkeit in den verschiedenen Linien konvergent entstanden sein. Für den Fall, daß die vier genannten Algenlinien doch monophyletischen Ursprungs sind, sich aber sehr früh nach der Etablierung der sekundären Endosymbiose herausgebildet und dann weiter auseinander entwickelt haben (Cavalier-Smith 2000), könnte die Fähigkeit zur Synthese acetylenischer Xanthophylle unmittelbar nach der Etablierung der Endosymbiose erworben worden sein. In diesem Fall müßte sie jedoch zumindest innerhalb der Gruppe der Heterokontophyta in einer Reihe von Klassen wie den Phaeophyceen, Chrysophyceen, Raphidophyceen oder Eustigmatophyceen wieder sekundär zurückgebildet worden sein.

Ein genauer Aufschluß hierüber ist erst zu erwarten, wenn das für die Synthese der acetylenischen Gruppe verantwortliche Enzym identifiziert und seine Gensequenz in Vertretern aus allen Ddx-

haltigen Algengruppen entschlüsselt worden ist. Anhand von Sequenzvergleichen sollte sich dann die Evolution der Ddx-Synthese rekonstruieren und mit der Phylogenie der verschiedenen Algengruppen korrelieren lassen. In diesem Zusammenhang sind innerhalb der Abteilung Heterokontophyta auch eine Reihe von erst in jüngerer Zeit neu beschriebenen Algenklassen zu untersuchen, die neben Fx ebenfalls Ddx und damit vermutlich auch den DT-Zyklus besitzen. Hierzu zählen die Bolidophyceae, Dictyochophyceae, Pedinellophyceae, Pelagophyceae und Phaeothamniophyceae (Vesk und Jeffrey 1987, Andersen et al. 1993, Saunders et al. 1995, Bailey et al. 1998, Guillou et al. 1999). Dabei ist unter anderem zu überprüfen, ob in diesen Algengruppen Vx ebenfalls ein Intermediat der Biosynthese von Ddx und Fx darstellt und sich entsprechend durch Starklichtinkubation auch die Pigmente des VAZ-Zyklus akkumulieren lassen.

IV Ausblick

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse eröffnen eine Reihe interessanter Untersuchungsmöglichkeiten. Zum einen würde sich ein weiteres Studium der Xanthophyllzyklen in *P. tricornutum* anbieten, wobei vordringlich zu klären wäre, ob die Epoxidase in *P. tricornutum* auch im Starklicht aktiv ist. Hierzu könnten Hemmstoffversuche unter Verwendung von Deepoxidase- und Epoxidase-Inhibitoren durchgeführt werden, um zu klären, ob der Deepoxidierungsgrad der beiden Xanthophyllzyklus-Pools tatsächlich über das Zusammenspiel dieser beiden Enzyme reguliert wird.

Speziell die Deepoxidase-Reaktion könnte an Zellhomogenaten der Algen weiter untersucht werden, da sich hier exogene Xanthophylle als Substrate zusetzen lassen. Erste vielversprechende Arbeiten sind bereits an einem *in-vitro*-System von *P. tricornutum* durchgeführt worden (Jakob, Wilhelm und Goss, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe dieses Systems sollte sich klären lassen, ob die in *P. tricornutum*-Zellen beobachteten Unterschiede der Deepoxidierungsraten von V_x , A_x , D_x und C_xE tatsächlich von einer unterschiedlichen Affinität der Deepoxidase zu diesen Substraten herrühren. Ebenso kann die Substratspezifität der Deepoxidase hinsichtlich der weiteren in *P. tricornutum* detektierten Epoxy-Xanthophylle F_x , Dinoxanthin und Neoxanthin untersucht werden.

Weiterhin wäre eine genaue Quantifizierung der Lichtenergieverwertung in den Turbidostatkulturen von *P. tricornutum* im Anschluß an die Starklichtphase sinnvoll, um die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Überlegungen zur möglichen Bedeutung des Xanthophyll-Recyclings für die Ressourcenoptimierung der Algen zu überprüfen. Dies könnte durch parallele Messungen von Fluoreszenzquantenausbeute, Sauerstoffentwicklung und Pigmentsynthese der Algen erfolgen. In diesem Rahmen könnten auch weitere Experimente zur Korrelation zwischen der Konzentration an Dtx bzw. Z_x und dem Ausmaß des NPQ in *P. tricornutum* durchgeführt werden.

Schließlich bietet sich an, die kinetischen Untersuchungen, die an *P. tricornutum* vorgenommen wurden, auch auf andere Chl *a/c*-haltige Algen auszudehnen. Ausgehend von den Ergebnissen in Kap. 3 stellen die Xanthophyceen *Mischococcus sphaerocephalus* und der Dinoflagellat *Amphidinium carterae* interessante Untersuchungsobjekte dar. Kinetische Studien der Xanthophyllumwandlungen in diesen beiden Algen könnten einen wichtigen Beitrag zur Validierung des in Kap. 3.3.1 postulierten Biosyntheseschemas der Xanthophylle in Chromophyten liefern. Insbesondere *M. sphaerocephalus* wäre auch für die Turbidostatanzucht geeignet, um so die Daten erfassen zu können, die für einen Vergleich der experimentell bestimmten Kinetiken mit modellierten Syntheseraten erforderlich sind. Auch eine Grünalge böte sich als Untersuchungsobjekt an, um der Frage nach den Ursachen für die Diskrepanzen weiter nachzugehen, die im Fall von *P. tricornutum* bei der Biosynthese von V_x über das Intermediat Z_x zwischen modellierten und gemessenen Kinetiken festgestellt wurden.

Längerfristig ergeben sich interessante Perspektiven durch Untersuchungen auf der Genebene. Hier wäre zunächst eine Sequenzierung der Deepoxidase- und Epoxidase-Gene von möglichst vielen Vertretern der verschiedenen Familien der Chl a/c-haltigen Algen anzustreben. Anhand dieser Sequenzen ließen sich sowohl die Evolution als auch funktionelle Modifikationen der Xanthophyllzyklusenzyme aus den verschiedenen Algengruppen erforschen. In diesem Zusammenhang wäre ferner zu prüfen, ob sich auch aus Rotalgen Gensequenzen mit Homologie zu den Sequenzen der Xanthophyllzyklusenzyme von Chl a/c-haltigen Algen isolieren lassen. Besonders geeignet wären hier Rotalgenarten, die nachweislich über einen aktiven Xanthophyllzyklus verfügen.

Für ein vergleichendes Studium der Funktion und der Bedeutung von DT- und VAZ-Zyklus wären, wie bereits in Kap. 3.3.2 diskutiert wurde, Pigmentmutanten am besten geeignet. Sofern sich beispielsweise von einem Haptophyten Mutanten gewinnen ließen, die nicht mehr in der Lage sind, aus Vx das acetylenische Xanthophyll Ddx zu synthetisieren, könnten diese Mutanten zur Klärung einer Reihe interessanter Fragen beitragen. So ließe sich untersuchen, ob in Algen, die normalerweise nur den DT-Zyklus aufweisen, auch der VAZ-Zyklus eine Verstärkung des NPQ bewirkt und ob der DT-Zyklus den Algen im Vergleich zum VAZ-Zyklus tatsächlich spezifische Vorteile bietet. Außerdem sollte sich bereits am Pigmentmuster dieser Mutanten erkennen lassen, ob Ddx ein obligatorisches Intermediat bei der Biosynthese von Fx darstellt.

Sobald die entsprechenden Techniken zur Herstellung und Isolierung von Pigmentmutanten etabliert wären, könnte auch eine Identifikation der weiteren an der Synthese von Fx beteiligten Enzyme angestrebt werden. Einmal isolierte und charakterisierte Gensequenzen ließen sich verwenden, um nach homologen Sequenzen in anderen Chl a/c-haltigen Algen zu suchen und auf diese Weise den Verlauf der Biosynthesewege in Chl a/c-haltigen Algen weiter zu klären. Von Interesse wäre hier beispielsweise, ob sich die Fähigkeit zur Synthese acetylenischer Carotinoide in Algen nur einmal oder mehrfach herausgebildet hat. Schließlich könnten funktionelle Studien an den identifizierten Enzymen zur Beantwortung der Frage beitragen, wie die Synthese des jeweiligen Lichtsammelxanthophylls mit der Synthese von Chl a und den LHC-Apoproteinen koordiniert wird.

V Zusammenfassung

Die Gruppe der Chl a/c-haltigen Algen (syn. Chromophyta) umfaßt die Abteilungen Heterokontophyta, Haptophyta, Dinophyta und Cryptophyta. Dino- und Haptophyta sowie die zu den Heterokontophyta zählenden Kieselalgen (syn. Diatomeen; Klasse Bacillariophyceae) stellen die wichtigsten marinen Primärproduzenten dar. In den meisten Chl a/c-haltigen Algen leisten die Carotinoide einen wesentlich stärkeren Beitrag zur Lichtsammlung als in den Chl a/b-haltigen Höheren Pflanzen. Hierfür sind in erster Linie die Xanthophylle Peridinin in Dinophyta und Fucoxanthin in Haptophyta, Diatomeen und weiteren Klassen der Heterokontophyta verantwortlich. Neben den Lichtsammelxanthophyllen finden sich weitere Xanthophylle, die an einem Schutzmechanismus beteiligt sind, den die Algen bei einem Überangebot an Lichtenergie aktivieren. Ein Teil der Chromophyta verfügt hierzu über den auch bei Höheren Pflanzen anzutreffenden Violaxanthin/Antheraxanthin/Zeaxanthin-(VAZ-)Zyklus. In anderen Gruppen wie den Dinoflagellaten und den Kieselalgen ist statt dessen der Diadinoxanthin/Diatoxanthin-(DT-)Zyklus zu finden. Beim VAZ-Zyklus wird das unter Lichtlimitierung vorliegende Diepoxid Violaxanthin (Vx) im Starklicht über Antheraxanthin (Ax) zum photoprotektiven Zeaxanthin (Zx), im DT-Zyklus das Monoepoxid Diadinoxanthin (Ddx) zu Diatoxanthin (Dtx) deepoxidiert. Bei erneuter Lichtlimitierung findet die jeweilige Rückreaktion statt.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst für schwachlichtadaptierte Turbidostatkulturen der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* gezeigt, daß sie unter mehrstündiger Starklichtinkubation neben den Pigmenten des DT-Zyklus auch die Xanthophylle des VAZ-Zyklus akkumulieren. Nach sechs Stunden Starklicht läßt sich in *P. tricornutum* außerdem ein dritter Xanthophyllzyklus nachweisen, der von β -Cryptoxanthin (Cx) und β -Cryptoxanthin-Epoxid (CxE) gebildet wird, doch liegen diese beiden Pigmente nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Die Identität der erstmals in einer Diatomee identifizierten Pigmente des VAZ- und des CE-Zyklus wird durch einen Vergleich ihrer chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften mit Referenzpigmenten aus Spinat bzw. Papayafrüchten zweifelsfrei bestätigt. Für die Starklichtakkumulation von Zx und Cx sind eine hohe Deepoxidase-Aktivität und die *de-novo*-Synthese von Carotinoiden erforderlich. Zx wird im anschließenden Schwachlicht zu Vx epoxidiert, welches wiederum zur Synthese von Ddx dient. Bei Hemmung der Carotinoidbiosynthese in *P. tricornutum* durch Norflurazon zeigt sich ferner, daß aus Ddx Fucoxanthin (Fx) synthetisiert wird. Das Lichtsammelxanthophyll Fx wird in *P. tricornutum* also sequentiell über die Xanthophyllzykluspigmente Vx und Ddx gebildet. Somit liegt erstmals ein experimenteller Beleg für die bereits mehrfach postulierte Hypothese vor, daß das Epoxy-Xanthophyll Vx die Ausgangsverbindung für die Synthese von Xanthophyllen mit allenischer Gruppe wie Fx und solchen mit acetylenischer Gruppe wie Ddx und Dtx darstellt.

Im zweiten Teil der Arbeit werden in *P. tricornutum* die Kinetiken der Deepoxidierungs- und der Epoxidierungsreaktionen der drei Xanthophyllzyklen sowie die Kinetiken der Umwandlungen von Vx

zu Ddx und von Ddx zu Fx analysiert. Die Ratenkonstanten der Epoxidierung von Dtx, Zx, und Ax unterscheiden sich kaum, lediglich Cx wird merklich langsamer epoxidiert. Dagegen ist die Deepoxidierungsrate von Ddx viermal höher als die von Vx und CxE, und Ax wird sogar zehnmal schneller deepoxidiert. Das Verhältnis der Deepoxidierungsraten von Ddx und Vx bleibt auch bei zunehmender Deepoxidase-Aktivität konstant, was dafür spricht, daß beide Substrate vom gleichen Enzym deepoxidiert werden, welches für Ddx eine höhere Affinität aufweist als für Vx. Die Ratenkonstanten der Umwandlungsschritte von Vx zu Ddx und von Ddx zu Fx schließlich liegen um eine Zehnerpotenz unter denen der Epoxidierungsreaktionen. Auf Grundlage der experimentell ermittelten Biosynthesewege wird ein kinetisches Modell entwickelt, mit dessen Hilfe sich anhand der Wachstumsrate und der *steady-state*-Pigmentkonzentrationen der Turbidostatkultur von *P. tricornutum* für jeden Umwandlungsschritt eine theoretische Ratenkonstante berechnen läßt. Der Vergleich der theoretischen Ratenkonstanten mit den gemessenen Kinetiken zeigt eine gute Übereinstimmung für die sequentielle Umwandlung von Vx über Ddx zu Fx. Die gemessene Rate der Zx-Epoxidierung liegt jedoch um zwei Zehnerpotenzen unter der theoretisch zu fordernden Rate. Möglicherweise stellt also Zx kein obligatorisches Intermediat bei der Vx-Synthese dar. Statt dessen könnte CxE eine Rolle bei der Synthese von Vx aus β -Carotin spielen.

Schließlich wird der Zusammenhang zwischen den Xanthophyllzyklen und der Xanthophyllbiosynthese für weitere Vertreter der Chl a/c-haltigen Algen näher untersucht. Die Heterokontophyten *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae), *Pleurochloris meiringensis* und *Mischococcus sphaerocephalus* (beide Xanthophyceae), die Haptophyten *Pavlova lutheri* und *Prymnesium parvum* sowie der Dinoflagellat *Amphidinium carterae*, die alle über den DT-Zyklus verfügen, können unter Starklicht auch die Pigmente des VAZ-Zyklus akkumulieren. In den Heterokontophyten *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae), *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) und *Nannochloropsis salina* (Eustigmatophyceae), die den VAZ-Zyklus aufweisen, treten die Pigmente des DT-Zyklus dagegen nicht auf. Die Biosynthese von Fx erfolgt generell über Vx und in Algen mit DT-Zyklus weiter über Ddx, wie Untersuchungen an *C. meneghiniana*, *P. parvum*, *O. luteus* und *O. danica* zeigen. Für Peridinin in *A. carterae* und das Lichtsammelxanthophyll Vaucherixanthin in *M. sphaerocephalus* bzw. *N. salina* läßt sich nur die Bildung aus Vx belegen, Ddx scheint weder in *A. carterae* noch in *M. sphaerocephalus* beteiligt. Von dieser Einschränkung abgesehen, werden in allen untersuchten Algen die unter Starklicht akkumulierten Xanthophyllzykluspigmente im nachfolgenden Schwachlicht zur Synthese des jeweiligen Lichtsammelxanthophylls genutzt. Unter energetischen Gesichtspunkten stellt dieses Pigment-Recycling insbesondere für die Fx-haltigen Algen einen Vorteil dar, da ihre Lichtsammelkomplexe im Vergleich zu denen der Höheren Pflanzen etwa die doppelte Anzahl an Xanthophyllen binden.

VI Literatur

- Aasen A.J. und Liaaen-Jensen S. (1966): Carotenoids of flexibacteria. IV. The carotenoids of two further pigment types. *Acta Chem. Scand.* **20**, 2322-2324.
- Aihara M.S. und Yamamoto H.Y. (1968): Occurrence of antheraxanthin in two Rhodophyceae *Acanthophora spicifera* and *Gracilaria lichenoides*. *Phytochemistry* **7**, 497-499.
- Ambarsari I., Brown B.E., Barlow R.G., Britton G. und Cummings D. (1997): Fluctuations in algal chlorophyll and carotenoid pigments during solar bleaching in the coral *Goniastrea aspera* at Phuket, Thailand. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **159**, 303-307.
- Andersen R.A., Saunders G.W., Paskind M.P. und Sexton J.P. (1993): Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. et sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae classis nov. *J. Phycol.* **29**, 701-715.
- Anderson J.M. und Barrett J. (1986): Light-harvesting pigment-protein complexes of algae. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* **19**, 269-285.
- Antia N.J. und Cheng J.Y. (1982): The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *Br. Phycol. J.* **17**, 39-50.
- Apt K.E., Clendennen S.K., Powers D.A. und Grossman A.R. (1995): The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 455-464.
- Arsalane W., Rousseau B. und Thomas J.C. (1992): Isolation and characterization of native pigment-protein complexes from two Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* **28**, 32-36.
- Arsalane W., Rousseau B. und Duval J.-C. (1994): Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* **60**, 237-243.
- Bailey J.C., Bidigare R.R., Christensen S.J. und Andersen R.A. (1998): Phaeothamniophyceae classis nova: a new lineage of chromophytes based upon photosynthetic pigments, *rbcL* sequence analysis and ultrastructure. *Protist* **149**, 245-263.
- Barker H.A. (1935): Photosynthesis in diatoms. *Arch. Mikrobiol.* **6**, 141-156.
- Barry P. und Pallett K.E. (1990): Herbicidal inhibition of carotenogenesis detected by HPLC. *Z. Naturforsch.* **45c**, 492-497.
- Bartley G.E., Scolnik P.A. und Giuliano G. (1994): Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 287-301.
- Bartley G.E. und Scolnik P.A. (1995): Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7**, 1027-1038.
- Bassi R., Pineau B., Dainese P. und Marquardt J. (1993): Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* **212**, 297-303.

- Bassi R., Croce R., Cugini D. und Sandonà D. (1999): Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10056-10061.
- Bautista J.A., Hiller R.G., Sharples F.P., Gosztola D., Wasielewski M. und Frank H.A. (1999): Singlet and triplet energy transfer in the peridinin-chlorophyll a-protein from *Amphidinium carterae*. *J. Phys. Chem. A* **103**, 2267-2273.
- Berger R., Liaaen-Jensen S., McAlister V. und Guillard R.R.L. (1977): Carotenoids of the Prymnesiophyceae (Haptophyceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **5**, 71-75.
- Berkaloff C., Caron L. und Rousseau B. (1990): Subunit organization of PS I particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis. *Photosynth. Res.* **23**, 181-193.
- Bhattacharya D., Medlin L., Wainright P.O., Ariztia E.V., Bibeau C., Stickel S.K. und Sogin M.L. (1992): Algae containing chlorophylls a + c are paraphyletic: molecular evolutionary analysis of the chromophyta. *Evolution* **46**, 1801-1817.
- Bhattacharya D. und Medlin L. (1995): The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* **31**, 489-498.
- Bhattacharya D. und Medlin L. (1998): Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol.* **116**, 9-15.
- Bhaya D. und Grossman A.R. (1993): Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4458-4466.
- Bida J. (1994): Quantitative Beziehungen zwischen Photoinhibition und Produktivität bei der Alge *Phaeodactylum tricornutum* unter Laborbedingungen. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Björkman O. und Niyogi K.K. (1998): Xanthophylls and excess-energy dissipation: a genetic dissection in *Arabidopsis*. **In: Photosynthesis: Mechanisms and Effects.** G. Garab (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. III, 2085-2090.
- Bjørnland T. und Aguilar-Martinez M. (1976): Carotenoids in red algae. *Phytochemistry* **15**, 291-296.
- Bjørnland T., Borch G. und Liaaen-Jensen S. (1984): Configurational studies on red algal carotenoids. *Phytochemistry* **23**, 1711-1715.
- Bjørnland T. und Liaaen-Jensen S. (1989): Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. **In: The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives.** Systematics Association Special Volume No. 38, J.C. Green, B.S.C. Leadbeater und W.L. Diver (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 37-60.
- Boekema E.J., van Roon H., Calkoen F., Bassi R. und Dekker J.P. (1999a): Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry* **38** (8), 2233-2239.

- Boekema E.J., van Roon H., van Breemen J.F.L. und Dekker J.P. (1999b): Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.* **266** (2), 444-452.
- Bonnett R., Mallams A.K., Spark A.A., Tee J.L., Weedon B.C.L. und McCormick A. (1969): Carotenoids and related compounds. Part XX. Structure and reactions of fucoxanthin. *J. Chem. Soc. (C)*, 429-454.
- Bouvier F., d'Harlingue A., Hugueney P., Marin E., Marion-Poll A. und Camara B. (1996): Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of β -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J. Biol. Chem.* **271**, 28861-28867.
- Bratt C.E., Arvidsson P.-O., Carlsson M. und Åkerlund H.-E. (1995): Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* **45**, 169-175.
- Britton G. (1993): Structure and nomenclature. **In:** *Carotenoids in Photosynthesis*. A. Young und G. Britton (Hrsg.), Chapman & Hall, London, 1-15.
- Britton G. (1995): UV/visible spectroscopy. **In:** *Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy*. G. Britton, S. Liaaen-Jensen und H. Pfander (Hrsg.), Birkhäuser, Basel, 13-62.
- Brown B.E., Ambarsari I., Warner M.E., Fitt W.K., Dunne R.P., Gibb S.W. und Cummings D.G. (1999): Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs* **18**, 99-105.
- Brown J.S. (1987): Functional organization of chlorophyll a and carotenoids in the alga, *Nannochloropsis salina*. *Plant Physiol.* **83**, 434-437.
- Brown J.S. (1988): Photosynthetic pigment organization in diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **24**, 96-102.
- Brown L.M. und McLachlan J. (1982): Atypical carotenoids for the Rhodophyceae in the genus *Gracilaria* (Gigartinales). *Phycologia* **21**, 9-16.
- Büchel C. und Wilhelm C. (1993): Isolation and characterization of a photosystem I-associated antenna (LHC I) and a photosystem I-core complex from the chlorophyll c-containing alga *Pleurochloris meiringensis* (Xanthophyceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **20**, 87-93.
- Büchel C. und Garab G. (1995): Electrochromic absorbance changes in the chlorophyll-c-containing alga *Pleurochloris meiringensis* (Xanthophyceae). *Photosynth. Res.* **43**, 49-56.
- Bugos R.C. und Yamamoto H.Y. (1996): Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6320-6325.
- Bugos R.C., Hieber A.D. und Yamamoto H.Y. (1998): Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 15321-15324.
- Bungard R.A., Ruban A.V., Hibberd J.M., Press M.C., Horton P. und Scholes J.D. (1999): Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1135-1139.
- Burbridge A., Grieve T., Terry C., Corlett J., Thompson A. und Taylor I. (1997): Structure and expression of a cDNA encoding zeaxanthin epoxidase, isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. *J. Exp. Bot.* **48**, 1749-1750.

- Cammarata K.V. und Schmidt G.W. (1992): In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: deletion mutagenesis and analyses of pigment binding. *Biochemistry* **31**, 2779-2789.
- Caron L. und Brown J.S. (1987): Chlorophyll-carotenoid protein complexes from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: spectrophotometric, pigment and polypeptide analyses. *Plant Cell Physiol.* **28**, 775-785.
- Caron L., Douady D., Rousseau B., Quinet-Szely M. und Berkaloff C. (1995): Light-harvesting complexes from a brown alga. Biochemical and molecular study. **In: Photosynthesis: from Light to Biosphere.** P. Mathis (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. I, 223-226.
- Casper-Lindley C. und Björkman O. (1998): Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth. Res.* **56**, 277-289.
- Cattolico R.A., Boothroyd J.C. und Gibbs S.P. (1976): Synchronous growth and plastid replication in the naturally wall-less alga *Olisthodiscus luteus*. *Plant Physiol.* **57**, 497-503.
- Cavalier-Smith T. und Chao E.E. (1996): 18S rRNA sequence of *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae), and the phylogeny of heterokont algae (Ochromytha). *Phycologia* **35**, 500-510.
- Cavalier-Smith T. (1999): Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J. Eukaryotic Microbiol.* **46** (4), 347-366.
- Cavalier-Smith T. (2000): Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* **5** (4), 174-182.
- Chapman J.R. (1993): *Practical Organic Mass Spectrometry. A Guide for Chemical and Biochemical Analysis.* 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester.
- Cholnoky L., Györgyfy K., Szabolcs J., Weedon B.C.L. und Waight E.S. (1966): Foliaxanthin. *Chem. Commun.* **13**, 404-405.
- Christensen T. (1989): The Chromophyta, past and present. **In: The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives.** Systematics Association Special Volume No. 38, J.C. Green, B.S.C. Leadbeater und W.L. Diver (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 1-12.
- Cleland W.W. (1964): Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3**, 480-482.
- Cosper E. (1982): Effects of diurnal fluctuations in light intensity on the efficiency of growth of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve (Bacillariophyceae) in a cyclostat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **65**, 229-239.
- Costes C., Burghoffer C., Joyard J., Block M. und Douce R. (1979): Occurrence and biosynthesis of violaxanthin in isolated spinach chloroplast envelope. *FEBS Lett.* **103**, 17-21.
- Croce R., Remelli R., Varotto C., Breton J. und Bassi R. (1999a): The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Lett.* **456**, 1-6.
- Croce R., Weiss S. und Bassi R. (1999b): Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 29613-29623.

- Cunningham Jr. F.X., Pogson B., Sun Z., McDonald K.A. und DellaPenna D. (1996): Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**, 1613-1626.
- Cunningham Jr. F.X. und Gantt E. (1998): Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 557-583.
- Czeczuga B. (1979): Characteristic carotenoids in algae of different systematic position. *Nova Hedwigia* **31**, 325-336.
- Czeczuga B. und Taylor F.J. (1987): Carotenoid content in some species of the brown and red algae from the coastal area of New Zealand. *Biochem. Syst. Ecol.* **15**, 5-8.
- Dau H. und Hansen U.-P. (1990): A study on the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic measurements. *Photosynth. Res.* **25**, 269-278.
- Davis J.B., Jackman L.M., Siddons P.T. und Weedon B.C.L. (1966): Carotenoids and related compounds. Part XV. The structure and synthesis of phytoene, phytofluene, zeta-carotene, and neurosporene. *J. Chem. Soc. (C)*, 2154-2165.
- Davies B.H. (1976): Carotenoids. **In:** *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments Vol. II*, 2nd ed., T.W. Goodwin (Hrsg.), Academic Press, London, 38-165.
- De Martino A., Douady D., Rousseau B., Duval J.C. und Caron L. (1997): Characterization of two light-harvesting subunits isolated from the brown alga *Pelvetia canaliculata*: heterogeneity of xanthophyll distribution. *Photochem. Photobiol.* **66**, 190-197.
- Delwiche C.F. und Palmer J.D. (1997): The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. *Plant Syst. Evol. [Suppl.]* **11**, 53-86.
- Demers S., Roy S., Gagnon R. und Vignault C. (1991): Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **76**, 185-193.
- Demmig B., Winter K., Krüger A. und Czygan F.-C. (1987): Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol.* **84**, 218-224.
- Demmig-Adams B. (1990): Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 1-24.
- Demmig-Adams B. und Adams III W.W. (1993): The xanthophyll cycle. **In:** *Carotenoids in Photosynthesis*. A. Young und G. Britton (Hrsg.), Chapman & Hall, London, 206-251.
- Demmig-Adams B. und Adams III W.W. (1996): Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* **198**, 460-470.
- Demmig-Adams B., Gilmore A.M. und Adams III W.W. (1996): In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **10**, 403-412.

- Domin A.H.R. (1995): Untersuchung der Auswirkung photoinhibitorischer Lichtintensitäten auf die Photosynthesekapazität und das Wachstum der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* unter Laborbedingungen. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Donohue C.M. und Fawley M.W. (1995): Distribution of the xanthophyll luteoxanthin in desmids (Charophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* **31**, 294-296.
- Durnford D.G. und Green B.R. (1994): Characterization of the light harvesting proteins of the chromophytic alga, *Olisthodiscus luteus* (*Heterosigma carterae*). *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 118-123.
- Durnford D.G., Aebersold R. und Green B.R. (1996): The fucoxanthin-chlorophyll proteins from a chromophyte alga are part of a large multigene family: structural and evolutionary relationships to other light harvesting antennae. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 377-386.
- Durnford D.G., Deane J.A., Tan S., McFadden G.I., Gantt E. und Green B.R. (1999): A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins with implications for plastid evolution. *J. Mol. Evol.* **48**, 59-68.
- Durrant J.R., Giorgi L.B., Barber J., Klug D.R. und Porter G. (1990): Characterisation of triplet states in isolated photosystem II reaction centres: oxygen quenching as a mechanism for photodamage. *Biochim. Biophys. Acta* **1017**, 167-175.
- Eppard M. und Rhiel E. (1998): The genes encoding light-harvesting subunits of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) constitute a complex and heterogeneous family. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 335-345.
- Eppard M., Krumbein W.E., von Haeseler A. und Rhiel E. (2000): Characterization of fcp4 and fcp12, two additional genes encoding light harvesting proteins of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) and phylogenetic analysis of this complex gene family. *Plant Biol.* **2**, 283-289.
- Eugster C.H. (1995): Chemical derivatizations: Microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. **In:** *Carotenoids, Vol. 1A: Isolation and Analysis*. G. Britton, S. Liaaen-Jensen und H. Pfander (Hrsg.), Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, 71-80.
- Färber A. und Jahns P. (1998): The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organisation. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 47-58.
- Falbel T.G., Staehelin L.A. und Adams III W.W. (1994): Analysis of xanthophyll cycle carotenoids and chlorophyll fluorescence in light intensity-dependent chlorophyll-deficient mutants of wheat and barley. *Photosynth. Res.* **42**, 191-202.
- Falk S., Leverenz J.W., Samuelsson G. und Öquist G. (1992): Changes in photosystem II fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to increasing levels of irradiance in relationship to the photosynthetic response to light. *Photosynth. Res.* **31**, 31-40.
- Falkowski P.G. und Owens T.G. (1978): Effects of light intensity on photosynthesis and dark respiration in six species of marine phytoplankton. *Mar. Biol.* **45**, 289-295.
- Falkowski P.G. (1980): Light-shade adaptation in marine phytoplankton. **In:** *Primary Productivity in the Sea*. P.G. Falkowski (Hrsg.), Plenum Press, New York, 99-119.

- Falkowski P.G. (1984): Physiological responses of phytoplankton to natural light regimes. *J. Plankton Res.* **6** (2), 295-307.
- Falkowski P.G., Dubinsky Z. und Wyman K. (1985): Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **30**, 311-321.
- Falkowski P.G. (1994): The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.* **39**, 235-258.
- Falkowski P.G. und Behrenfeld M.J. (1997): Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. *Limnol. Oceanogr.* **42** (1), 1-20.
- Fawley M.W. (1989): Detection of chlorophylls c_1 , c_2 and c_3 in pigment extracts of *Prymnesium parvum* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **25**, 601-604.
- Fawley M.W., Douglas C.A., Stewart K.D. und Mattox K.R. (1990): Light-harvesting pigment-protein complexes of the Ulvophyceae (Chlorophyta): characterization and phylogenetic significance. *J. Phycol.* **26**, 186-195.
- Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T. und Falkowski P. (1998): Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**, 237-240.
- Fisher T., Shurtz-Swirski R., Gepstein S. und Dubinsky Z. (1989): Changes in the levels of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in *Tetradron minimum* (Chlorophyta) during light and shade adaptation. *Plant Cell Physiol.* **30**, 221-228.
- Flower D.R. (1996): The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* **318**, 1-14.
- Frank H.A. und Cogdell R.J. (1993): The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. **In:** *Carotenoids in Photosynthesis*. A. Young und G. Britton (Hrsg.), Chapman & Hall, London, 253-326.
- Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A., Gosztola D. und Wasielewski M.R. (1994): Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **41**, 389-395.
- Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A., Gosztola D. und Wasielewski M.R. (1996): The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 243-252.
- Frank H.A., Bautista J.A., Josue J.S. und Young A.J. (2000): Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* **39**, 2831-2837.
- Frechilla S., Zhu J., Talbott L.D. und Zeiger E. (1999): Stomata from *npq1*, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light. *Plant Cell Physiol.* **40**, 949-954.
- Friedman A.L. und Alberte R.S. (1984): A diatom light-harvesting pigment-protein complex. *Plant Physiol.* **76**, 483-489.
- Friedman A.L. und Alberte R.S. (1986): Biogenesis and light regulation of the major light harvesting chlorophyll-protein of diatoms. *Plant Physiol.* **80**, 43-51.

- Frosch S., Jabben M., Bergfeld R., Kleinig H. und Mohr H. (1979): Inhibition of carotenoid biosynthesis by the herbicide SAN 9789 and its consequences for the action of phytochrome on plastogenesis. *Planta* **145**, 497-505.
- Funk C., Schröder W.P., Napiwotzki A., Tjus S.E., Renger G. und Andersson B. (1995): The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* **34**, 11133-11141.
- Garab G. und Mustárdy L. (1999): Role of LHCII-containing macrodomains in the structure, function and dynamics of grana. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**, 649-658.
- Geider R.J., Osborne B.A. und Raven J.A. (1985): Light dependence of growth and photosynthesis in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **21**, 609-619.
- Genty B., Briantais J.-M. und Baker N.R. (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 87-92.
- Gibbs P.B. und Biggins J. (1991): *In vivo* and *in vitro* protein phosphorylation studies on *Ochromonas danica*, an alga with a chlorophyll a/c/fucoxanthin binding protein. *Plant Physiol.* **97**, 388-395.
- Gilmore A.M. und Yamamoto H.Y. (1993): Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.* **35**, 67-78.
- Gilmore A.M., Mohanty N. und Yamamoto H.Y. (1994): Epoxidation of zeaxanthin and antheraxanthin reverses non-photochemical quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence in the presence of trans-thylakoid ΔpH . *FEBS Lett.* **350**, 271-274.
- Goerick R. und Welschmeyer N.A. (1992a): Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. I. The $^{14}CO_2$ -labeling kinetics of chlorophyll a. *J. Phycol.* **28**, 498-507.
- Goerick R. und Welschmeyer N.A. (1992b): Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. II. The $^{14}CO_2$ -labeling kinetics of carotenoids. *J. Phycol.* **28**, 507-517.
- Goodwin T.W. (1980): *The Biochemistry of the Carotenoids. Vol. I: Plants*. 2nd ed., Chapman & Hall, London.
- Goss R. (1996): Regulation des Photosystems II. Nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung und Xanthophyllzyklus. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Goss R., Böhme K. und Wilhelm C. (1998): The xanthophyll cycle of *Mantoniella squamata* converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanism of enhanced non-photochemical energy-dissipation. *Planta* **205**, 613-621.
- Green B.R. und Pichersky E. (1994): Hypothesis for the evolution of three-helix Chl a/b and Chl a/c light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynth. Res.* **39**, 149-162.
- Green B.R. und Kühlbrandt W. (1995): Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynth. Res.* **44**, 139-148.
- Green J.C., Perch-Nielsen K. und Westbroeck P. (1990): Phylum Prymnesiophyta. In: *Handbook of Protocista*. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian und D.J. Chapman (Hrsg.), Jones & Bartlett, Boston, 293-317.

- Grevby C. und Sundqvist C. (1992): Characterization of light-harvesting complex in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae). *J. Plant Physiol.* **140**, 414-420.
- Grossman A.R., Manodori A. und Snyder D. (1990): Light-harvesting proteins of diatoms: their relationship to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants and their mode of transport into plastids. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 91-100.
- Gugliemelli L.A. (1984): Isolation and characterization of pigment-protein particles from the light-harvesting complex of *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim. Biophys. Acta* **766**, 45-50.
- Guillou L., Chrétiennot-Dinet M.-J., Medlin L.K., Claustre H., Loiseaux-de Goer und Vaultot D. (1999): *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *J. Phycol.* **35**, 368-381.
- Härtel H., Lokstein H., Grimm B. und Rank B. (1996): Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. Influence of antenna size and relations to nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Physiol.* **110**, 471-482.
- Hager A. (1966): Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und Hill-Reaktion. *Ber. dtsch. Bot. Ges.* **79**, (94)-(107).
- Hager A. und Meyer-Bertenrath T. (1966): Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnsschichtchromatographischer Methoden. *Planta* **69**, 198-217.
- Hager A. (1967): Untersuchung über die Rückreaktionen im Xanthophyll-Cyclus bei *Chlorella*, *Spinacia* und *Taxus*. *Planta* **76**, 138-148.
- Hager A. und Meyer-Bertenrath T. (1967): Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen. *Planta* **76**, 149-168.
- Hager A. (1969): Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin- -> Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* **89**, 224-243.
- Hager A. und Stransky H. (1970a): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. III. Grünalgen. *Arch. Mikrobiol.* **72**, 68-83.
- Hager A. und Stransky H. (1970b): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae und Phaeophyceae. *Arch. Mikrobiol.* **73**, 77-89.
- Hager A. (1975): Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **88**, 27-44.
- Hager A. (1980): The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. In: *Pigments in Plants*. F.C. Czygan (Hrsg.), Fischer, Stuttgart, 57-79.
- Hager A. und Holocher K. (1994): Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* **192**, 581-589.

- Hanelt D., Wiencke C., Karsten U. und Nultsch W. (1997): Photoinhibition and recovery after light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J. Phycol.* **33**, 387-395.
- Harker M., Berkaloff C., Lemoine Y., Britton G., Young A.J., Duval J.-C., Rmiki N.-E. und Rousseau B. (1999): Effects of high light and desiccation on the operation of the xanthophyll cycle in two marine brown algae. *Eur. J. Phycol.* **34**, 35-42.
- Haugan J.A. und Liaaen-Jensen S. (1992): Naturally occurring stereoisomers of fucoxanthin. *Phytochemistry* **31**, 1359-1361.
- Haugan J.A. und Liaaen-Jensen S. (1994): Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **22** (1), 31-41.
- Havaux M. und Gruszecki W.I. (1993): Heat- and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin: indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochem. Photobiol.* **58** (4), 607-614.
- Havaux M. und Tardy F. (1996): Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta* **198**, 324-333.
- Havaux M. und Niyogi K.K. (1999): The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8762-8767.
- Havir E.A., Tausta S.L. und Peterson R.B. (1997): Purification and properties of violaxanthin de-epoxidase from spinach. *Plant Sci.* **123**, 57-66.
- Hegazi M.M., Pérez-Ruzafa A., Almela L. und Candela M.-E. (1998): Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **829**, 153-159.
- Henley W.J. (1993): Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.* **29**, 729-739.
- Hibberd D.J. und Norris R.E. (1984): Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J. Phycol.* **20**, 310-330.
- Hiller R.G., Larkum A.W.D. und Wrench P.M. (1988): Chlorophyll proteins of the prymnesiophyte *Pavlova lutherii* (Droop) comb. nov.: identification of the major light-harvesting complex. *Biochim. Biophys. Acta* **932**, 223-231.
- Hiller R.G., Wrench P.M., Gooley A.P., Shoebridge G. und Breton J. (1993): The major intrinsic light-harvesting protein of *Amphidinium*: characterization and relation to other light-harvesting proteins. *Photochem. Photobiol.* **57**, 125-131.
- Hiller R.G., Broughton M.J., Wrench P.M., Sharples F.P., Miller D.J. und Catmull J. (1999): Dinoflagellate light-harvesting proteins: genes, structure and reconstitution. In: *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*. J.H. Argyroudi-Akoyunoglou und H. Senger (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3-10.

- Hoagland D. und Arnon D. (1938): The water-culture methods of growing plants without soil. *Calif. Exp. Sta. Circ.* **347**, ch. 2.
- Hobe S., Niemeier H., Bender A. und Paulsen H. (2000): Carotenoid binding sites in LHCIIb. Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**, 616-624.
- Hoek C. van den, Mann D.G. und Jahns H.M. (1995): *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press.
- Hofmann E., Wrench P.M., Sharples F.P., Hiller R.G., Welte W. und Diederichs K. (1996): Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science* **272**, 1788-1791.
- Horton P., Ruban A.V., Rees D., Pascal A.A., Noctor G. und Young A.J. (1991): Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHC II chlorophyll-protein complex. *FEBS Lett.* **292**, 1-4.
- Horton P., Ruban A.V. und Walters R.G. (1996): Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 655-684.
- Isler O., Lindlar H., Montavon M., Rüegg R. und Zeller P. (1956): Die technische Synthese von β -Carotin. *Helv. Chim. Acta* **39**, 249-259.
- Jackowski G. und Jansson S. (1998): Characterization of photosystem II antenna complexes separated by non-denaturing isoelectric focusing. **In:** *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. G. Garab (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. I, 373-376.
- Jahns P. (1995): The xanthophyll cycle in intermittent light-grown pea plants. *Plant Physiol.* **108**, 149-156.
- Jansson S. (1994): The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1-19.
- Jeffrey S.W. (1961): Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochem. J.* **80**, 336-342.
- Jeffrey S.W. (1968): Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 271-285.
- Jeffrey S.W. und Haxo F.T. (1968): Photosynthetic pigments of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) from corals and clams. *Biol. Bull.* **135**, 149-165.
- Jeffrey S.W. (1969): Properties of two spectrally different components in chlorophyll c preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 456-467.
- Jeffrey S.W. (1972): Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c_1 and c_2 from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 15-33.
- Jeffrey S.W. und Humphrey G.F. (1975): New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **167**, 191-194.
- Jeffrey S.W., Sielicki M. und Haxo F.T. (1975): Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. *J. Phycol.* **11**, 374-384.

- Jeffrey S.W. (1981): Responses to light in aquatic plants. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* **12A**, 249-276.
- Jeffrey S.W. (1989): Chlorophyll c pigments and their distribution in the chromophyte algae. **In:** *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives*. Systematics Association Special Volume No. 38, J.C. Green, B.S.C. Leadbeater und W.L. Diver (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 13-36.
- Jeffrey S.W. und Vesk M. (1997): Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. **In:** *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura und S.W. Wright (Hrsg.), UNESCO Publishing, Paris, 37-84.
- Jeffrey S.W. und Wright S.W. (1997): Qualitative and quantitative HPLC analysis of SCOR reference algal cultures. **In:** *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura und S.W. Wright (Hrsg.), UNESCO Publishing, Paris, 343-360.
- Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C. und Bjørnland T. (1997): Data for the identification of 47 phytoplankton pigments. **In:** *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura und S.W. Wright (Hrsg.), UNESCO Publishing, Paris, 449-559.
- Jensen A. (1961): Algal carotenoids I. Fucoxanthin monoacetate. *Acta Chem. Scand.* **15**, 1604-1628.
- Johansen J.E., Svec W.A. und Liaaen-Jensen S. (1974): Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochemistry* **13**, 2261-2271.
- Johnsen G. und Sakshaug E. (1993): Bio-optical characteristics and photoadaptive responses in the toxic and bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum*, and two strains of *Prorocentrum minimum*. *J. Phycol.* **29**, 627-642.
- Johnsen G., Nelson N.B., Jovine R.V.M. und Prézelin B.B. (1994): Chromoprotein- and pigment-dependent modeling of spectral light absorption in two dinoflagellates, *Prorocentrum minimum* and *Heterocapsa pygmaea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **114**, 245-258.
- Johnsen G., Prézelin B.B. und Jovine R.V.M. (1997): Fluorescence excitation spectra and light utilization in two red tide dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **42**, 1166-1177.
- Jovine R.V.M., Johnsen G. und Prézelin B.B. (1995): Isolation of membrane bound light-harvesting-complexes from the dinoflagellates *Heterocapsa pygmaea* and *Prorocentrum minimum*. *Photosynth. Res.* **44**, 127-138.
- Katoh T., Mimuro M. und Takaichi S. (1989): Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*. A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **976**, 233-240.
- Katoh T. und Ehara T. (1990): Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from a brown alga, *Petalonia fascia*. Electron microscopic studies. *Plant Cell Physiol.* **31** (4), 439-447.
- Kaufmann R., Wingerath T., Kirsch D., Stahl W. und Sies H. (1996): Analysis of carotenoids and carotenol fatty acid esters by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source-decay mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **238**, 117-128.

- Khachik F., Beecher G.R. und Goli M.B. (1991): Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* **63**, 71-80.
- Khan N., Loeber D.E., Toubé T.P. und Weedon B.C.L. (1975): Carotenoids and related compounds. Part XXX. Stereochemistry and synthesis of phytoene. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1457-1464.
- Kirk J.T.O. (1977): Thermal dissociation of fucoxanthin-protein binding in pigment complexes from chloroplasts of *Hormosira* (Phaeophyta). *Plant Sci. Lett.* **9**, 373-380.
- Kirk J.T.O. (1994): *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. 2nd ed., Cambridge University Press.
- Knoetzel J., Braumann T. und Grimme L.H. (1988): Pigment-protein complexes of green algae: improved methodological steps for the quantification of pigments in pigment-protein complexes derived from the green algae *Chlorella* and *Chlamydomonas*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1**, 475-491.
- Knoetzel J. und Rensing L. (1990): Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. I. Pigment and polypeptide composition of the pigment-protein complex. *J. Plant Physiol.* **136**, 271-279.
- Knox J.P. und Dodge A.D. (1985): Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24** (5), 889-896.
- Kohata K. und Watanabe M. (1988): Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in *Chatonella antiqua* (Raphidophyceae). *J. Phycol.* **24**, 58-66.
- Kolber Z. und Falkowski P.G. (1993): Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnol. Oceanogr.* **38**, 1646-1665.
- Kowallik K.V. (1997): Origin and evolution of chloroplasts: current status and future perspectives. **In:** *Eukaryotism and Symbiosis*. H.E.A. Schenk, R.G. Herrmann, K.W. Jeon, N.E. Müller und W. Schwemmler (Hrsg.), Springer, Heidelberg, 3-23.
- Kraay G.W., Zapata M. und Veldhuis M.J.W. (1992): Separation of chlorophylls c_1 , c_2 , and c_3 of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.* **28**, 708-712.
- Krause G.H. und Weis E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313-349.
- Krinsky N.I. (1964): Carotenoid de-epoxidations in algae. I. Photochemical transformation of antheraxanthin to zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 487-491.
- Krinsky N.I. (1966): The role of carotenoid pigments as protective agents against photosensitized oxidations in chloroplasts. **In:** *Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I*. T.W. Goodwin (Hrsg.), Academic Press, New York, 423-430.
- Krinsky N.I. (1979): Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.* **51**, 649-660.
- Kühlbrandt W. und Wang D.N. (1991): Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* **350**, 130-134.

- Kühlbrandt W., Wang D.N. und Fujiyoshi Y. (1994): Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-621.
- Kylin H. (1910): Über Phykoerythrin und Phykocyan bei *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie* **69**, 169-239.
- Kylin H. (1927): Über die karotinoiden Farbstoffe der Algen. *Zeit. physiol. Chem.* **166**, 39-77.
- Laidler, K.J. (1970): *Reaktionskinetik I. Homogene Gasreaktionen*. B.I.-Hochschultaschenbücher, Band 290; Bibliographisches Institut, Mannheim.
- Larkum A.W.D. und Barrett J. (1983): Light-harvesting processes in algae. *Adv. Bot. Res.* **10**, 1-219.
- Larsen A. und Edvardsen B. (1998): Relative ploidy levels in *Prymnesium parvum* and *P. patelliferum* (Haptophyta) analyzed by flow cytometry. *Phycologia* **37** (6), 412-424.
- Latasa M. (1995): Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Sci. Mar.* **59**, 25-37.
- Lee A. I. und Thornber J.P. (1995): Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.* **107**, 565-574.
- Leipner J., Stamp P. und Fracheboud Y. (2000): Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta* **210**, 964-969.
- Leitsch C.E.W., Kowallik K. und Douglas S. (1999): The *atpA* gene cluster of *Guillardia theta* (Cryptophyta): a piece in the puzzle of chloroplast genome evolution. *J. Phycol.* **35**, 128-135.
- Leverenz J.W., Falk S., Pilström C.-M. und Samuelsson G. (1990): The effects of photoinhibition on the photosynthesis light-response curve of green plant cells (*Chlamydomonas reinhardtii*). *Planta* **182**, 161-168.
- Lewin J.C., Lewin R.A. und Philpott D.E. (1958): Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Gen. Microbiol.* **18**, 418-426.
- Li X.-P., Björkman O., Shih C., Grossman A.R., Rodenquist M., Jansson S. und Niyogi K.K. (2000): A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395.
- Liaaen-Jensen S. (1962): The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on photosynthetic problems. *Kgl. Norske Videnskab. Selskabs, Skrifter* **Nr. 8**.
- Liaaen-Jensen S. (1978): Marine carotenoids. **In:** *Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives. Vol. II*. P.J. Scheuer (Hrsg.), Academic Press, New York, 1-73.
- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* **148**, 350-382.
- Lichtenthaler H.K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47-65.

- Lichtlé, C., Arsalane W., Duval J.C. und Passaquet C. (1995): Characterization of the light-harvesting complex of *Giraudyopsis stellifer* (Chrysophyceae) and effects of light stress. *J. Phycol.* **31**, 380-387.
- Linden H., Lucas M.M., de Felipe M.R. und Sandmann G. (1993): Immunogold localization of phytoene desaturase in higher plant chloroplasts. *Physiol. Plant.* **88**, 229-236.
- Lohmann C. (1996): Vergleichende Phytoplankton-Untersuchungen der Trinkwassertalsperren Neunzehnhain und Dröda sowie des Schmalen Luzin-Sees anhand der Lichtmikroskopie und HPLC-gestützten Pigmentanalyse. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Lubian L.M. und Montero O. (1998): Excess light-induced violaxanthin cycle activity in *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae): effects of exposure time and temperature. *Phycologia* **37**, 16-23.
- Macpherson A.N., Telfer A., Barber J. und Truscott T.G. (1993): Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centres. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 301-309.
- Margulis L. (1981): *Symbiosis in Cell Evolution*. Freeman, San Francisco.
- Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M. und Chapman D.J. (1990): *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett, Boston.
- Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B., Hugueney P., Frey A. und Marion-Poll A. (1996): Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **15**, 2331-2342.
- Maslova T.G., Popova I.A., Korniyushenko G.A. und Koroleva O.Ya. (1996): Violaxanthin cycle in photosynthesis: History and current concept. *Russ. J. Plant Physiol.* **43**, 437-449.
- McFadden G.I. und Gilson P. (1997): What's eating eu? The role of eukaryote/eukaryote endosymbioses in plastid origin. **In:** *Eukaryotism and Symbiosis*. H.E.A. Schenk, R.G. Herrmann, K.W. Jeon, N.E. Müller und W. Schwemmler (Hrsg.), Springer, Heidelberg, 24-39.
- Melkonian M. (1996a): II. Systematics and evolution of the algae: endocytobiosis and evolution of the major algal lineages. *Prog. Bot.* **57**, 281-311.
- Melkonian M. (1996b): Phylogeny of photosynthetic protists and their plastids. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **89.2**, 71-96.
- Mereschkowsky C. (1905): Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* **25**, 593-604. Englische Übersetzung in: Martin W. und Kowallik K.V. (1999): Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *Eur. J. Phycol.* **34**: 287-295.
- Mewes H. (1997): Die Wirkung von UV-B-Strahlung auf den Xanthophyllzyklus und die Xanthophyllsynthesen der einzelligen Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Milborrow B.V. (1982): Stereochemical aspects of carotenoid biosynthesis. **In:** *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*. G. Britton und T.W. Goodwin (Hrsg.), Pergamon Press, Oxford, 279-295.

- Mimuro M., Katoh T. und Kawai H. (1990a): Spatial arrangement of pigments and their interaction in the fucoxanthin-chlorophyll a/c protein assembly (FCPA) isolated from the brown alga *Dictyota dichotoma*. Analysis by means of polarized spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 450-456.
- Mimuro M., Tamai N., Ishimaru T. und Yamazaki I. (1990b): Characteristic fluorescence components in photosynthetic pigment system of a marine dinoflagellate, *Protogonyaulax tamarensis*, and excitation energy flow among them. Studies by means of steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1016**, 280-287.
- Moisan T.A., Olaizola M. und Mitchel B.G. (1998): Xanthophyll cycling in *Phaeocystis antarctica*: changes in cellular fluorescence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **169**, 113-121.
- Moreira D., Le Guyader H. und Phillipe H. (2000): The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* **405**, 69-72.
- Mostaert A.S., Karsten U., Hara Y. und Watanabe M.M. (1998): Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: a chemotaxonomic re-evaluation. *Phycol. Res.* **46**, 213-220.
- Müller A.-M. (1995): Physiologische Charakterisierung der Planktonalge *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) unter Labor- und naturnahen Freilandbedingungen. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Müller A.-M. und Wilhelm C. (1997): Light adaptation of the phytoplankton diatom *Phaeodactylum tricornutum* under conditions of natural light climate. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **82**, 315-328.
- Mullineaux C.W., Ruban A.V. und Horton P. (1994): Prompt heat release associated with Δ pH-dependent quenching in spinach thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**, 119-123.
- Niyogi K.K., Björkman O. und Grossman A.R. (1997a): *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* **9**, 1369-1380.
- Niyogi K.K., Björkman O. und Grossman A.R. (1997b): The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14162-14167.
- Niyogi K.K., Grossman A.R. und Björkman O. (1998): *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10**, 1121-1134.
- Niyogi K.K. (1999): Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 333-359.
- Norgård S., Svec W.A., Liaaen-Jensen S., Jensen A. und Guillard R.R.L. (1974): Chloroplast pigments and algal systematics. *Biochem. Syst. Ecol.* **2**, 3-6.
- Norris B.J. und Miller D.J. (1994): Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll a-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium* sp.. *Plant Mol. Biol.* **24**, 673-677.
- Norton T.A., Melkonian M. und Andersen R.A. (1996): Algal biodiversity. *Phycologia* **35**, 308-326.

- Oku O. und Kamatani (1999): Resting spore formation and biochemical composition of the marine planktonic diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* in culture: ecological significance of decreased nucleotide content and activation of the xanthophyll cycle by resting spore formation. *Mar. Biol.* **135**, 425-436.
- Olaizola M. und Yamamoto H.Y. (1994): Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **30**, 606-612.
- Olaizola M., La Roche J., Kolber Z. und Falkowski P.G. (1994): Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* **41**, 357-370.
- Oliveira M.C. und Bhattacharya D. (2000): Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. *Am J. Bot.* **87** (4), 482-492.
- Owens T.G. und Falkowski P.G. (1982): Enzymatic degradation of chlorophyll a by marine phytoplankton *in vitro*. *Phytochemistry* **21**, 979-984.
- Owens T.G. und Wold E.R. (1986): Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. I. Isolation and characterization of pigment-protein complexes. *Plant Physiol.* **80**, 732-738.
- Owens T.G., Gallagher J.C. und Alberte R.S. (1987): Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis spp.* (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* **23**, 79-85.
- Owens T.G., Shreve A.P. und Albrecht A.C. (1992): Dynamics and mechanism of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophylls: light harvesting and non-photochemical fluorescence quenching. **In:** *Research in Photosynthesis*. N. Murata (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. I, 179-186.
- Owens T.G. (1994): Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching. **In:** *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. N.R. Baker und J.R. Bowyer (Hrsg.), BIOS Scientific Publishers, Oxford, 95-109.
- Palmer J.M., Warpeha K.M.F. und Briggs W.R. (1996): Evidence that zeaxanthin is not the photoreceptor for phototropism in maize coleoptiles. *Plant Physiol.* **110**, 1323-1328.
- Parry A.D. und Horgan R. (1992): Absciscic acid biosynthesis in roots. I. The identification of potential absciscic acid precursors, and other carotenoids. *Planta* **187**, 185-191.
- Parsons T.R. (1961): On the pigment composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **18**, 1017-1025.
- Parsons T.R., Takahashi M. und Hargrave B. (1984): *Biological Oceanographic Processes*. 3rd ed., Pergamon, Oxford.
- Partali V., Olsen Y., Foss P. und Liaaen-Jensen S. (1985): Carotenoids in food chain studies - I. Zooplankton (*Daphnia magna*) response to a unialgal (*Scenedesmus acutus*) carotenoid diet, to spinach, and to yeast diets supplemented with individual carotenoids. *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**, 767-772.
- Pascal A.A., Caron L., Rousseau B., Lapouge K., Duval J.-C. und Robert B. (1998): Resonance Raman spectroscopy of a light-harvesting protein from the brown alga *Laminaria saccharina*. *Biochemistry* **37**, 2450-2457.

- Paulsen H., Rümmler U. und Rüdiger W. (1990): Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211.
- Pennington F., Guillard R.R.L. und Liaaen-Jensen S. (1988): Carotenoid distribution patterns in Bacillariophyceae (diatoms). *Biochem. Syst. Ecol.* **16**, 589-592.
- Peter G.F. und Thornber J.P. (1991): Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 16745-16754.
- Peterman E.J.G., Dukker F.M., van Grondelle R. und van Amerongen H. (1995): Chlorophyll a and carotenoid triplet states in light-harvesting complex II of higher plants. *Biophys. J.* **69**, 2670-2678.
- Peterman E.J.G., Gradinaru C.C., Calkoen F., Borst J.C., van Grondelle R. und van Amerongen H. (1997): Xanthophylls in light-harvesting complex II of higher plants: light harvesting and triplet quenching. *Biochemistry* **36**, 12208-12215.
- Pfündel E.E. und Dilley R.A. (1993): The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **101**, 65-71.
- Phillips J.N. Jr. und Myers J. (1953): Measurement of algal growth under controlled steady-state conditions. *Plant Physiol.* **29**, 148-152.
- Plumley F.G. und Schmidt G.W. (1995): Light-harvesting chlorophyll a/b complexes: interdependent pigment synthesis and protein assembly. *Plant Cell* **7**, 689-704.
- Pogson B., McDonald K.A., Truong M., Britton G. und DellaPenna D. (1996): *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* **8**, 1627-1639.
- Polívka T., Herek J.L., Zigmantas D., Åkerlund H.-E. und Sundström V. (1999): Direct observation of the (forbidden) S₁ state in carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4914-4917.
- Post A.F., Dubinsky Z., Wyman K. und Falkowski P.G. (1984): Kinetics of light-intensity adaptation in a marine planktonic diatom. *Mar. Biol.* **83**, 231-238.
- Provasoli L., McLaughlin J.J.A. und Droop M.R. (1957): The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* **25**, 392-428.
- Quinones M.A. und Zeiger E. (1994): A putative role of the xanthophyll, zeaxanthin, in blue light photoreception of corn coleoptiles. *Science* **264**, 558-561.
- Quinones M.A., Lu Z. und Zeiger E. (1996): Close correspondence between the action spectra for the blue light responses of the guard cell and coleoptile chloroplasts, and the spectra for blue light-dependent stomatal opening and coleoptile phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2224-2228.
- Raghavendra A.S., Padmasree K. und Saradadevi K. (1994): Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.* **97**, 1-14.
- Raven J.A. (1984): A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytol.* **98**, 593-625.

- Raven J.A., Johnston A.M. und Surif M. bin (1989): The photosynthetic apparatus as a phyletic character. **In:** *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives*. Systematics Association Special Volume No. 38, J.C. Green, B.S.C. Leadbeater und W.L. Diver (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 63-84.
- Raven J.A. (1997): Putting the C in phycology. *Eur. J. Phycol.* **32**, 319-333.
- Reith M. (1996): The evolution of plastids and the photosynthetic apparatus. **In:** *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. D.R. Ort und C.F. Yocum (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 643-657.
- Rhiel E., Marquardt J., Eppard M., Mörschel E. und Krumbein W.E. (1997): The light harvesting system of the diatom *Cyclotella cryptica*. Isolation and characterization of the main light harvesting complex and evidence for the existence of minor pigment proteins. *Bot. Acta* **110**, 109-117.
- Richter M. (1989): Untersuchungen zum Mechanismus der Photoinhibition an isolierten Thylakoiden von Spinat (*Spinacia oleracea* L.). *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Riper D.M., Owens T.G. und Falkowski P.G. (1979): Chlorophyll turnover in *Skeletonema costatum*, a marine plankton diatom. *Plant Physiol.* **64**, 49-54.
- Rmiki N.-E., Brunet C., Cabioch J. und Lemoine Y. (1996): Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiologia* **326/327**, 407-413.
- Robinson S.P. (1986): Improved rates of CO₂-fixation by intact chloroplasts isolated in media with KCl as osmoticum. *Photosynth. Res.* **10**, 93-100.
- Rock C.D. und Zeevaart J.A.D. (1991): The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7496-7499.
- Round F.E. und Crawford R.M. (1990): Phylum Bacillariophyta. **In:** *Handbook of Protocista*. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian und D.J. Chapman (Hrsg.), Jones & Bartlett, Boston, 574-596.
- Ruban A.V., Young A.J., Pascal A.A. und Horton P. (1994): The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.* **104**, 227-234.
- Ruban A.V., Phillip D., Young A.J. und Horton P. (1997): Carotenoid-dependent oligomerization of the major chlorophyll a/b light harvesting complex of photosystem II of plants. *Biochemistry* **36**, 7855-7859.
- Ruban A.V., Phillip D., Young A.J. und Horton P. (1998): Excited-state energy level does not determine the differential effect of violaxanthin and zeaxanthin on chlorophyll fluorescence quenching in the isolated light-harvesting complex of photosystem II. *Photochem. Photobiol.* **68**, 829-834.
- Ruban A.V., Lee P.J., Wentworth M., Young A.J. und Horton P. (1999): Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10458-10465.
- Sandmann G., Linden H. und Böger P. (1989): Enzyme-kinetic studies on the interaction of norflurazon with phytoene desaturase. *Z. Naturforsch.* **44c**, 787-790.
- Sandmann G. und Albrecht M. (1990): Accumulation of colorless carotenes and derivatives during interaction of bleaching herbicides with phytoene desaturation. *Z. Naturforsch.* **45c**, 487-491.

- Sapozhnikov D.I., Krasovskaya T.A. und Mayevskaya A.N. (1957): Changes observed in the relation between the main carotenoids in the plastids of green leaves exposed to light. *Dokl. Akad. Nauk.* **113**, 456-467.
- Sapozhnikov D.I. (1973): Investigation of the violaxanthin cycle. *Pure Appl. Chem.* **35**, 47-61.
- Sarry J.-E., Montilet J.-L., Sauvaire Y. und Havaux M. (1994): The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. *FEBS Lett.* **353**, 147-150.
- Saunders G.W., Potter D., Paskind M.P. und Andersen R.A. (1995): Cladistic analyses of combined traditional and molecular data sets reveal an algal lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 244-248.
- Savitzky A. und Golay M.J.E. (1964): Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639.
- Schagerl M. und Angeler D.G. (1998): The distribution of the xanthophyll luteoxanthin and its systematic significance in the colonial Volvocales (Chlorophyta). *Phycologia* **37**, 79-83.
- Schiedt K. und Liaaen-Jensen S. (1995): Isolation and analysis. **In:** *Carotenoids, Vol. 1A: Isolation and Analysis*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen und H. Pfander (Hrsg.), Birkhäuser, Basel, 81-108.
- Schlösser U.G. (1994): SAG - Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains 1994. *Bot. Acta* **107**, 113-186.
- Schmid V.H.R., Cammarata K.V., Bruns B.U. und Schmidt G.W. (1997): *In vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7667-7672.
- Schofield O., Evens T.J. und Millie D.F. (1998): Photosystem II quantum yields and xanthophyll-cycle pigments of the macroalga *Sargassum natans* (Phaeophyceae): responses under natural sunlight. *J. Phycol.* **34**, 104-112.
- Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J.A.D. und McCarty D.R. (1997): Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872-1874.
- Shreve A.P., Trautman J.K., Owens T.G. und Albrecht A.C. (1991): A femtosecond study of electronic state dynamics of fucoxanthin and implications for photosynthetic carotenoid-to-chlorophyll energy transfer mechanisms. *Chem. Phys.* **154**, 171-178.
- Siefermann D. (1972): Kinetic studies on the xanthophyll cycle of *Lemna gibba* L. – Influence of photosynthetic oxygen and supplied reductor. **In:** *Proc. 2nd Int. Congr. Photosynth. Res.*, G. Forti, M. Avron, A. Melandri (Hrsg.), W. Junk, The Hague, Vol. 1, 629-635.
- Siefermann D. und Yamamoto H.Y. (1974): Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. III. reaction kinetics and effect of light intensity on de-epoxidase activity and substrate availability. *Biochim. Biophys. Acta* **357**, 144-150.
- Siefermann D. und Yamamoto H.Y. (1975a): Properties of NADPH and oxygen-dependent zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 70-77.

- Siefermann D. und Yamamoto H.Y. (1975b): Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. IV. The effects of electron-transport conditions on violaxanthin availability. *Biochim. Biophys. Acta* **387**, 149-158.
- Siefermann-Harms D., Joyard J. und Douce R. (1978): Light-induced changes of the carotenoid levels in chloroplast envelopes. *Plant Physiol.* **61**, 530-533.
- Siefermann-Harms D. (1987): The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* **69**, 561-568.
- Sistrom W.R., Griffiths M. und Stanier R.Y. (1956): The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. *J. Cell. Comp. Physiol.* **48**, 473-515.
- Smith G.J., Gao Y. und Alberte R.S. (1997): The fucoxanthin-chlorophyll a/c proteins comprise a large family of co-expressed genes in the marine diatom *Skeletonema costatum* (Greve): characterization of 8 unique cDNAs (accession nos. U66169, U66170, U66171, U66172, U66173, U66174, U66175, U66176, U66177, U66178, U66179, U66180). *Plant Physiol.* **114**, 1136.
- Srivastava A. und Zeiger E. (1995): The inhibitor of zeaxanthin formation, dithiothreitol, inhibits blue-light-stimulated stomatal opening in *Vicia faba*. *Planta* **196**, 445-449.
- Staehelin L.A. (1986): Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. *Encycl. Plant Physiol. New Ser.* **19**, 1-84.
- Stauber J.L. und Jeffrey S.W. (1988): Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *J. Phycol.* **24**, 158-172.
- Stiller J.W. und Hall B.D. (1997): The origin of red algae: Implications for plastid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4520-4525.
- Strain H.H., Manning W.M. und Hardin G. (1944): Xanthophylls and carotenes of diatoms, brown algae, dinoflagellates, and sea-anemones. *Biol. Bull.* **86**, 169-191.
- Stransky H. und Hager A. (1970a): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. II. Xanthophyceae. *Arch. Mikrobiol.* **71**, 164-190.
- Stransky H. und Hager A. (1970b): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. IV. Cyanophyceae und Rhodophyceae. *Arch. Mikrobiol.* **72**, 84-96.
- Stransky H. und Hager A. (1970c): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen. VI. Chemosystematische Betrachtung. *Arch. Mikrobiol.* **73**, 315-323.
- Sukenik A., Bennett J. und Falkowski P.G. (1987): Light-saturated photosynthesis - limitation by electron transport or carbon fixation?. *Biochim. Biophys. Acta* **891**, 205-215.
- Sukenik A., Bennett J. und Falkowski P.G. (1988): Changes in the abundance of individual apoproteins of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes of photosystem I and II with growth irradiance in the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. *Biochim. Biophys. Acta* **932**, 206-215.

- Sukenik A., Livne A., Neori A., Yacobi Y.Z. und Katcoff D. (1992): Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll-protein complex from the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp.. *Plant Cell Physiol.* **33** (8), 1041-1048.
- Sun Z., Gantt E. und Cunningham Jr. F.X. (1996): Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **271**, 24349-24352.
- Swift I.E. und Milborrow B.V. (1981): Stereochemistry of allene biosynthesis and the formation of the acetylenic carotenoid diadinoxanthin and peridinin (C_{37}) from neoxanthin. *Biochem. J.* **199**, 69-74.
- Swift I.E., Milborrow B.V. und Jeffrey S.W. (1982): Formation of neoxanthin, diadinoxanthin and peridinin from [^{14}C]zeaxanthin by a cell-free system from *Amphidinium carterae*. *Phytochemistry* **21**, 2859-2864.
- Takahashi Y., Hansson Ö., Mathis P. und Satoh K. (1987): Primary radical pair in the photosystem II reaction centre. *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 49-59.
- Takaichi S. und Mimuro M. (1998): Distribution and geometric isomerism of neoxanthin in oxygenic phototrophs: 9'-cis, a sole molecular form. *Plant Cell Physiol.* **39**, 968-977.
- Tardy F. und Havaux M. (1996): Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **34**, 87-94.
- Taylor F.J.R. und Pollinger U. (1987): Ecology of Dinoflagellates. **In:** *The Biology of Dinoflagellates*. F.J.R. Taylor (Hrsg.), Blackwell, Oxford, 398-529.
- Taylor F.J.R. (1990): Phylum Dinoflagellata. **In:** *Handbook of Protocista*. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian und D.J. Chapman (Hrsg.), Jones & Bartlett, Boston, 419-437.
- Telfer A., Dhami S., Bishop S.M., Phillips D. und Barber J. (1994): β -Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* **33**, 14469-14474.
- Thayer S.S. und Björkman O. (1992): Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynth. Res.* **33**, 213-225.
- Thompson L.K. und Brudvig G.W. (1988): Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry* **27**, 6653-6658.
- Thronsdén J. (1996): Note on the taxonomy of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Phycologia* **35** (4), 367.
- Ting C.S. und Owens T.G. (1994): The effects of excess irradiance on photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* **106**, 763-770.
- Trautman J.K., Shreve A.P., Owens T.G. und Albrecht A.C. (1990): Femtosecond dynamics of carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in thylakoid membrane preparations from *Phaeodactylum tricornutum* and *Nannochloropsis* sp.. *Chem. Phys. Lett.* **166**, 369-374.
- Uhrmacher S., Hanelt D. und Nultsch W. (1995): Zeaxanthin content and the degree of photoinhibition are linearly correlated in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Mar. Biol.* **123**, 159-165.

- Vaisberg A.J. und Schiff J.A. (1976): Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. 7. Inhibition of carotenoid biosynthesis by the herbicide San 9789 (4-chloro-5-(methylamino)-2-(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl)-3(2H)pyridazinone) and its developmental consequences. *Plant Physiol.* **57**, 260-269.
- Valentin K. (1997): Phylogeny and expression of the *secA* gene from a chromophytic alga - implications for the evolution of plastids and sec-dependent protein translocation. *Curr. Genet.* **32**, 300-307.
- Vesk M. und Jeffrey S.W. (1987): Ultrastructure and pigments of two strains of the picoplanktonic alga *Pelagococcus subviridis* (Chrysophyceae). *J. Phycol.* **23**, 322-336.
- Volkmar, P. (1999): Differenzierung und Quantifizierung von Algenpopulationen im Freiland mit Hilfe der HPLC-gestützten Phytoplanktonanalyse. Grenzen und Möglichkeiten der Methode unter Berücksichtigung lichtmikroskopischer und wasserchemischer Parameter. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Walters R.G., Ruban A.V. und Horton P. (1996): Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14204-14209.
- Weis E. und Berry J.A. (1987): Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 198-208.
- Werner D. (1977): Introduction with a note on taxonomy. **In:** *The Biology of Diatoms*. D. Werner (Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1-17.
- Whittle S.J. und Casselton P.J. (1975a): The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *Br. Phycol. J.* **10**, 179-191.
- Whittle S.J. und Casselton P.J. (1975b): The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. II. Xanthophyceae. *Br. Phycol. J.* **10**, 192-204.
- Wiessner W. (1968): Enzymaktivität und Kohlenstoffassimilation bei Grünalgen unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Typs. *Planta* **79**, 92-98.
- Wilhelm C. (1983): Untersuchungen zur Korrelation zwischen Photosyntheserate und verschiedenen Komponenten des photosynthetischen Elektronentransports unter verschiedenen Kulturbedingungen bei *Chlorella fusca*. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*.
- Wilhelm C. und Lenartz-Weiler I. (1987): Energy transfer and pigment composition in three chlorophyll b-containing light-harvesting complexes isolated from *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae), *Chlorella fusca* (Chlorophyceae) and *Sinapis alba*. *Photosynth. Res.* **13**, 101-111.
- Wilhelm C., Krämer P. und Wiedemann I. (1987): Die Lichtsammelkomplexe der verschiedenen Algenstämme. *Biologie in unserer Zeit* **17**, 138-143.
- Wilhelm C. (1990): The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. *Plant Physiol. Biochem.* **28**, 293-306.
- Wilhelm C. und Wiedemann I. (1991): Evidence of protein-bound chlorophyll c_3 in a light-harvesting protein isolated from the flagellate alga *Prymnesium parvum* (Prymnesiophyceae). *Photosynthetica* **25**, 249-255.

- Wilhelm C., Bida J., Domin A. und Lohr M. (1995): Is the measure of PSII quantum yield by means of in-vivo chl a-fluorescence really a direct measure of phytoplankton primary production?. **In: Photosynthesis: From Light to Biosphere**. P. Mathis (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. V, 809-812.
- Wilhelm C., Bida J. und Lohr M. (1996): The quantitative effect of photoinhibition on the productivity of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* - Implications on the assessment of the primary production under natural conditions. *Sci. Mar.* **60 (Supl. 1)**, 249-255.
- Willemoës M. und Monas E. (1991): Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol. Plant.* **83**, 449-456.
- Wingerath T. (1997): Analytik von Carotinoiden und Retinoiden mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und der MALDI-Massenspektrometrie. *Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Withers N.W., Fiksdahl A., Tuttle R.C. und Liaaen-Jensen S. (1981): Carotenoids of the Chrysophyceae. *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**, 345-349.
- Woese C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Xue X., Gauthier D.A., Turpin D.H. und Weger H.G. (1996): Interactions between photosynthesis and respiration in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **112**, 1005-1014.
- Yahyaoui W., Harnois J. und Carpentier R. (1998): Demonstration of thermal dissipation of absorbed quanta during energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthetic membranes. *FEBS Lett.* **440**, 59-63.
- Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M. und Chichester C.O. (1962): Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 168-173.
- Yamamoto H.Y. und Chichester C.O. (1965): Dark incorporation of $^{18}\text{O}_2$ into antheraxanthin by bean leaf. *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 303-305.
- Yamamoto H.Y. und Kamite L. (1972): The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation and absorbance changes in the 500-nm region. *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 538-543.
- Yamamoto H.Y., Kamite L. und Wang Y.-Y. (1972): An ascorbate-induced absorbance change in chloroplasts from violaxanthin de-epoxidation. *Plant Physiol.* **49**, 224-228.
- Yamamoto H.Y. und Higashi R.M. (1978): Violaxanthin de-epoxidase. Lipid composition and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 514-522.
- Yamamoto H.Y. (1979): Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure Appl. Chem.* **51**, 639-648.
- Yamamoto H.Y. und Bassi R. (1996): Carotenoids: localization and function. **In: Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions**. D.R. Ort und C.F. Yocum (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 539-563.
- Young A., Barry P. und Britton G. (1989): The occurrence of β -carotene-5,6-epoxide in the photosynthetic apparatus of higher plants. *Z. Naturforsch.* **44c**, 959-965.

- Young A. und Britton G. (1990): Photobleaching in the unicellular green alga *Dunaliella parva* 19/9. *Photosynth. Res.* **25**, 129-136.
- Young A. (1993): Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. **In:** *Carotenoids in Photosynthesis*. A. Young und G. Britton (Hrsg.), Chapman & Hall, London, 16-71.
- Zeevaart J.A.D. (1999): Absciscic acid metabolism and its regulation. **In:** *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. P.J.J. Hooykaas, M.A. Hall und K.R. Libbenga (Hrsg.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 189-207.
- Zhang Z., Green B.R. und Cavalier-Smith T. (1999): Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. *Nature* **400**, 155-158.
- Zscheile F.P., White Jr. J.W., Beadle B.W. und Roach J.R. (1942): The preparation and absorption spectra of five pure carotenoid pigments. *Plant Physiol.* **17**, 331-346.

VII Anhang

A Verwendete Medien und deren Stammlösungen

A.1 ASP/m-Medium (basierend auf ASP-Medium von Provasoli et al. 1957, modifiziert)

	Stammlösung [g Einwaage/100 mL]	Nährlösung	Endkonzentration in der Nährlösung
NaCl	-	5 g	86,0 mM
H ₂ O	-	940 mL	
TRIS (SIGMA)	5	10 mL	8,0 mM
KCl	16	10 mL	21,0 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	20	10 mL	8,1 mM
NaNO ₃	10	10 mL	11,8 mM
K ₂ HPO ₄	1	10 mL	0,58 mM
H ₃ BO ₃	1	1 mL	0,16 mM

Vor Zugabe der weiteren Stammlösungen Einstellung des Mediums auf pH 7,7 mit konz. H₂SO₄

CaCl ₂ × 2 H ₂ O	4	10 mL	2,72 mM
Eisen-(III)-Lsg.	Siehe A.7	1 mL	
Spurenelement-Lsg. A	Siehe A.8	1 mL	

A.2 AXEN-Medium (nach Barker 1935, Test auf Bakterienkontamination von *P. tricornutum*)

		Nährlösung
Glucose × H ₂ O	-	2,2 g
Standard II-Nährbouillon	-	4 g
ASP/m-Medium	Siehe A.1	1000 mL

A.3 ASW-Medium (nach CCAP Catalogue of Strains 1995, *The Culture Collection of Algae and Protozoa*, <http://www.ife.ac.uk/ccap/>, modifiziert)

	Stammlösung [g Einwaage/100 mL]	Nährlösung
Seesalz	-	67,2 g
Tricin (SERVA)	-	1,0 g
H ₂ O	-	1940 mL
Extra-Stammlösung	Siehe A.12	7,5 mL
Erdabkochung	Siehe A.13	50 mL

Nach dem Autoklavieren erfolgte Zugabe von 2 mL Vitaminlösung A unter sterilen Bedingungen.

A.4 Cryptomonas-Medium (Desmidiaceenmedium nach Schlösser 1994, leicht modifiziert)

	Stammlösung [g Einwaage/100 mL]	Nährlösung	Endkonzentration in der Nährlösung
H ₂ O		1860 mL	
KNO ₃	1,0	20 mL	0,99 mM
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	10 mL	0,08 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1	20 mL	0,04 mM
CaSO ₄	Gesättigte Lösung	20 mL	
Erdabkochung	Siehe A.13	40 mL	
Torfextrakt	Siehe A.13	20 mL	
H ₃ BO ₃	0,01	2 mL	1,6 µM
Eisen-(III)-Lsg.	Siehe A.7	2 mL	
Spurenelement-Lsg. A	Siehe A.8	2 mL	

Nach dem Autoklavieren erfolgte Zugabe von 2 mL Vitaminlösung A unter sterilen Bedingungen.

A.5 Euglena-Medium (Wiessner 1968)

	Stammlösung [g Einwaage/100 mL]	Nährlösung	Endkonzentration in der Nährlösung
NH ₄ Cl	24,6	10 mL	23,0 mM
K ₂ HPO ₄	1,56	10 mL	0,45 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	4,94	10 mL	1,01 mM
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,30	10 mL	0,10 mM
autotroph: NaCl	-	1 g	8,6 mM
mixotroph: Na-Acetat	40,8	12,5 mL	31 mM
H ₃ BO ₃	0,01	2 mL	1,6 µM
Eisen-(III)-Lsg.	Siehe A.7	4 mL	
Spurenelement-Lsg. A	Siehe A.8	2 mL	
H ₂ O	-	1940 mL	

Nach dem Autoklavieren erfolgte Zugabe von 2 mL Vitaminlösung A unter sterilen Bedingungen.

A.6 Ochromonas-Medium (Schlösser 1994)

	Nährlösung
Glucose × H ₂ O	2,2 g
Bacto-Trypton (DIFCO)	2,0 g
Leberkonzentrat (NF #XI Powder, ICN)	2,0 g
Hefeextrakt (DIFCO)	2,0 g
H ₂ O	2000 mL

A.7 Eisen-(III)-Lösung (nach Provasoli et al. 1957, modifiziert)

Titriplex III	465 mg
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	330 mg
H_2O	100 mL

A.8 Spurenelement-Lösung A (nach Provasoli et al. 1957, modifiziert)

Titriplex III	3000 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	405 mg
ZnCl_2	30 mg
H_2O	95 mL
Spurenelement-Lsg. B (A.9)	5 mL

Auf pH 5,5 einstellen mit NaOH

A.9 Spurenelement-Lösung B (nach Provasoli et al. 1957, modifiziert)

$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	48 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	24 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	12 mg
H_2O	200 mL

A.10 Vitamin-Lösung A (nach Provasoli et al. 1957, modifiziert)

Ca-D(+)-Pantothenat	5 mg
Nicotinsäure	5 mg
Thiaminchloridhydrochlorid	25 mg
Cyanocobalamin (SERVA)	1,5 mg
4-Aminobenzoessäure	8 mg
Thymin	150 mg
Meso-Inositol (SERVA)	250 mg
H_2O	99 mL
Vitamin-Lösung B (A.11)	1 mL

Die Lösung wurde in Portionen von 4 mL bei -20°C gelagert, bei Bedarf frisch aufgetaut und über Celluloseacetat-Membranfilter mit 0,2 μm Porenweite (SARTORIUS, Göttingen) steril filtriert.

A.11 Vitamin-Lösung B (nach Provasoli et al. 1957, modifiziert)

D(+)-Biotin	5 mg
Folsäure	1 mg
H_2O	10 mL

A.12 Extra-Stammlösung (nach CCAP Catalogue of Strains 1995, *The Culture Collection of Algae and Protozoa*, <http://www.ife.ac.uk/ccap/>, modifiziert)

NaNO ₃	15 g
Na ₂ HPO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
H ₂ O	500 mL

A.13 Erd- bzw. Torfabkochung (Schlösser 1994)

Zur Herstellung der Erd- bzw. Torfabkochung wurden etwa 2 L ungedüngte Gartenerde bzw. Torf in einem ca. 6 L fassenden Topf mit entionisiertem Wasser bis zu einem Überstand des Wassers von 5 cm versetzt und unter gelegentlichem Rühren für 1 h gekocht. Nach 24 h wurde die einstündige Abkochung wiederholt. Der resultierende Sud wurde anschließend durch mehrere Lagen Mull filtriert, dann für 10 min bei 5000×g zentrifugiert und schließlich über einen Faltenfilter in autoklavierbare Glasflaschen gefüllt und bei 125 °C für 20 min autoklaviert. Die Lösungen wurden anschließend im Kühlschrank gelagert.

B Chl a-Eichung der HPLC-Anlage

Ausgangsmaterial: 10 Proben aus einer *P. tricornutum*-Kultur

(je 10 mL Algensuspension auf einen Filter abgesaugt und gefriergetrocknet)

Für die spektralphotometrischen Messungen wurden fünf Filterproben in jeweils 5 mL 90%igem Aceton aufgeschlossen (Material und Methoden, Kap. 2.3). Die Ergebnisse der Chl a-Bestimmung dieser Proben sind in Tab. B1 aufgeführt. Die verbliebenen fünf Proben wurden mittels HPLC analysiert. Die Chl a-Kalibrierung erfolgte bei drei Wellenlängen, und zwar bei 385 nm (Schulter im Absorptionsspektrum von Chl a), 430 nm (Maximum der Soret-Bande) und 615 nm (Nebenmaximum der Rotabsorption). In späteren Messungen wurde Chl a jeweils bei derjenigen Wellenlänge quantifiziert, bei der die Höhe des Chl a-Peaks im Chromatogramm noch unterhalb einer Extinktion von 1,0 blieb (oberhalb dieser Extinktion wird der lineare Detektormeßbereich verlassen). Auf diese Weise war es möglich, auch in höher konzentrierten Pigmentextrakten eine zuverlässige Quantifizierung von Chl a vorzunehmen. Beispielhaft sind in Tab. B1 die Detektor-Flächenintegrale für Chl a bei 385 nm aufgeführt.

Tab. B.1

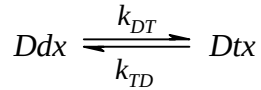
Photometrie		HPLC	
Probe Nr.	Chl a [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]	Probe Nr.	Chl a-Area [385 nm]
1	6,678	2	7967808
3	6,570	4	7897535
5	6,587	6	7956265
7	6,569	8	8027027
9	6,620	10	8018329
Mittelwert	6,605	Mittelwert	7973393
Std.abw.	0,046 (0,7%)	Std.abw.	52380 (0,7%)

Aus dem Mittelwert der photometrischen Chl a-Bestimmung ließ sich berechnen, daß bei den HPLC-Messungen jeweils eine Menge von 2,00151 μg Chl a injiziert wurde. Mit dieser Angabe und dem Mittelwert in Tab. B1 berechnete sich das Flächensignal des Detektors pro μg Chl a [Area/ μg Pigment] bei 385 nm zu 3983686 (vgl. Material und Methoden, Tab. 2.4).

C Herleitung von Formeln

C.1 Gleichung 3.7: $Ddx(t) = Ddx(t_0) \cdot (1 - k_{DT}/(k_{DT} + k_{TD}) \cdot (1 - \exp(-t \cdot (k_{DT} + k_{TD}))))$

Die zeitabhängigen Umwandlungen der Pigmente im kinetischen Modell



lassen sich nach Laidler (1970) durch die folgende Gleichung beschreiben:

$$Dtx_G / Ddx(t_0) \cdot \ln(Dtx_G / (Dtx_G - Dtx(t))) = k_{DT} \cdot t \quad (1)$$

mit $Ddx(t_0)$ = Ddx-Menge zu Beginn der Starklichtinkubation,
 Dtx_G = Dtx-Menge in Reaktionsgleichgewicht (*steady state*),
 $Dtx(t)$ = Dtx-Menge zum Zeitpunkt t.

Im Gleichgewichtszustand (*steady state*) gilt:

$$Dtx_G / Ddx_G = k_{DT} / k_{TD} \quad (2)$$

Unter der Annahme, daß zu Beginn der Reaktion nur Ddx vorliegt ($Dtx(t_0) = 0$), gilt ferner:

$$Ddx_G = Ddx(t_0) - Dtx_G \quad (3)$$

bzw.:

$$Ddx(t) = Ddx(t_0) - Dtx(t) \quad (4)$$

Wird Ddx_G in Gl. (2) durch Gl. (3) ersetzt und Gl. (2) anschließend nach Dtx_G aufgelöst, ergibt sich:

$$Dtx_G = Ddx(t_0) \cdot k_{DT} / (k_{DT} + k_{TD}) \quad (5)$$

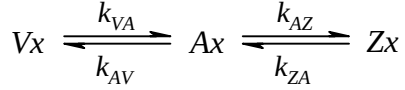
Wird Dtx_G in Gl. (1) durch Gl. (5) ersetzt und Gl. (1) anschließend nach $Dtx(t)$ aufgelöst, resultiert:

$$Dtx(t) = Ddx(t_0) \cdot k_{DT} / (k_{DT} + k_{TD}) \cdot (1 - \exp(-t \cdot (k_{DT} + k_{TD}))) \quad (6)$$

Schließlich erhält man Gl. 3.7, indem $Dtx(t)$ in Gl. (4) durch Gl. (6) ersetzt wird.

C.2 Gleichung 3.12: $V_{X_G} [\%] = (k_{ZA} \cdot k_{AV}) / (k_{AZ} \cdot k_{VA} + k_{ZA} \cdot k_{VA} + k_{ZA} \cdot k_{AV}) \cdot 100$

Im kinetischen Modell



sind im *steady state* die Pigmentkonzentrationen mit den Ratenkonstanten wie folgt verknüpft:

$$Vx_G / Ax_G = (k_{AV} / k_{VA}), \text{ also } Ax_G = Vx_G \cdot (k_{VA} / k_{AV}) \quad (1)$$

$$Ax_G / Zx_G = (k_{ZA} / k_{AZ}), \text{ also } Ax_G = Zx_G \cdot (k_{ZA} / k_{AZ}) \quad (2)$$

Wird Ax_G in Gl. (1) durch Gl. (2) ersetzt, resultiert:

$$Zx_G \cdot (k_{ZA} / k_{AZ}) = Vx_G \cdot (k_{VA} / k_{AV}) \quad (3)$$

Unter der Annahme, daß zu Beginn der Reaktion nur Vx vorliegt ($Ax(t_0) = Zx(t_0) = 0$), gilt ferner:

$$Vx_G + Ax_G + Zx_G = Vx(t_0) \quad (4)$$

Wird Ax_G in Gl. (4) durch Gl. (1) ersetzt und Gl. (4) dann nach Zx_G aufgelöst, ergibt sich:

$$Zx_G = Vx(t_0) - Vx_G \cdot ((k_{AV} + k_{VA}) / k_{AV}) \quad (5)$$

Nun kann Zx_G in Gl. 3 durch Gl. 5 ersetzt werden, und Auflösen von Gl. 3 nach Vx_G liefert:

$$Vx_G = Vx(t_0) \cdot ((k_{ZA} \cdot k_{AV}) / (k_{AZ} \cdot k_{VA} + k_{ZA} \cdot k_{VA} + k_{ZA} \cdot k_{AV})) \quad (6)$$

Der im *steady state* verbleibende Prozentanteil von Vx ($Vx_G [\%]$) bezogen auf den Ausgangsgehalt $Vx(t_0)$ berechnet sich schließlich als:

$$Vx_G [\%] = Vx_G / Vx(t_0) \cdot 100 \quad (7)$$

Gl. 3.12 resultiert, indem Vx_G in Gl. (7) durch Gl. (6) ersetzt wird.

Bereits veröffentlichte Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit

Lohr M. und Wilhelm C. (2001): Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* **212**, 382-391.

Lohr M. und Wilhelm C. (1999): Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8784-8789.

Lohr M. und Wilhelm C. (1998): Pigment synthesis and xanthophyll cycle in diatoms under high-light stress and during low-light recovery. **In:** *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, G. Garab, ed., Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, 2313-2316.

Weitere Veröffentlichungen

Wilhelm C., Hilse C., Kaiser B., Lohr M., Müller A.M. und Kesselmeier J. (1997): Interaction between global climate change and the physiological responses of algae. *Photosynthetica* **33**, 491-503.

Wilhelm C., Bida J. und Lohr M. (1996): The quantitative effect of photoinhibition on the productivity of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* - Implications on the assessment of the primary production under natural conditions. *Sci. Mar.* **60 (Supl. 1)**, 249-255.

Wilhelm C., Bida J., Domin A. und Lohr M. (1995): Is the measure of PSII quantum yield by means of in-vivo chl a-fluorescence really a direct measure of phytoplankton primary production? **In:** *Photosynthesis: From Light to Biosphere, Vol. V*, P. Mathis, ed., Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, 809-812.

Last but not least ... DANKE an

Herrn Professor Wilhelm für das Vertrauen, das er in mich setzte, indem er mir eine eigenständige wissenschaftliche Entfaltung ermöglichte, und für die unbedingte Unterstützung, wann immer ich seiner Hilfe bedurfte.

Herrn Professor Paulsen, dessen Ermutigungen und Einschätzungen sehr aufbauend für mich waren.

Herrn Professor Wild für sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Dr. Haferburg, der meinen Pigmentidentifikationen Masse gab.

Annette für geteiltes Leid und gemeinsame Bastelwochen an der HPLC.

Frau Müller und die ehemalige Arbeitsgruppe Wilhelm in Mainz für die Begleitung während der Startphase, die Arbeitsgruppen Wernicke und Paulsen für die Gewährung von Sozial-Asyl, und die jetzige Arbeitsgruppe Wilhelm in Leipzig für die herzliche Aufnahme.

Matthias, der mir das erste Leipziger Dach überm Kopf bot und mich dann auch noch mit auf Tauchstation nahm.

Reimund für die Geduld, mit der er mein schamloses Ausnutzen seiner Gastfreundschaft hinnahm, sowie für die musikalische Inspiration und die Einführung in die Leipziger Sub(pen)kultur.

Dirk für die kreative Büroatmosphäre, durch die er mich mitriß, und für die täglichen Infoinfusionen, durch die ich in mancher abendlicher Runde beeindrucken konnte (wir würden furiose Finanzbeamte abgeben).

meinen Vater und meine Schwester, die sich durch diese Promotionsschrift durchgebissen und dabei so manche Formulierungsfalte ausgebügelt haben.

Stephan, der die Promotionsschrift davor bewahrte, eine reine Familienangelegenheit zu werden, und mir ein wichtiger Diskussionspartner nicht nur für fachliche Fragen war.

Michael und Volkmar, die sich mit dieser Arbeit auszugsweise konfrontiert sahen, für ihr Feedback, und Volkmar auch für seine Geduld bei der Laborübergabe.

die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium.

alle Ehemaligen der Kaiserstraßen-WG, ganz besonders aber Christiane, Steffi und Quietschie, die mich während der kritischsten Phase meiner Promotion ertragen mußten.

die Phantastischen Vier, a.k.a Billy, Stephan, Dirk und Heiko, die mir mit unwiderstehlicher Lebensfreude über manche Durststrecke geholfen haben.

meine Eltern für ihren liebevollen Rückhalt. Ihnen widme ich diese Arbeit.