

**KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH**  
GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG  
**Institut für Botanik und Mikrobiologie**

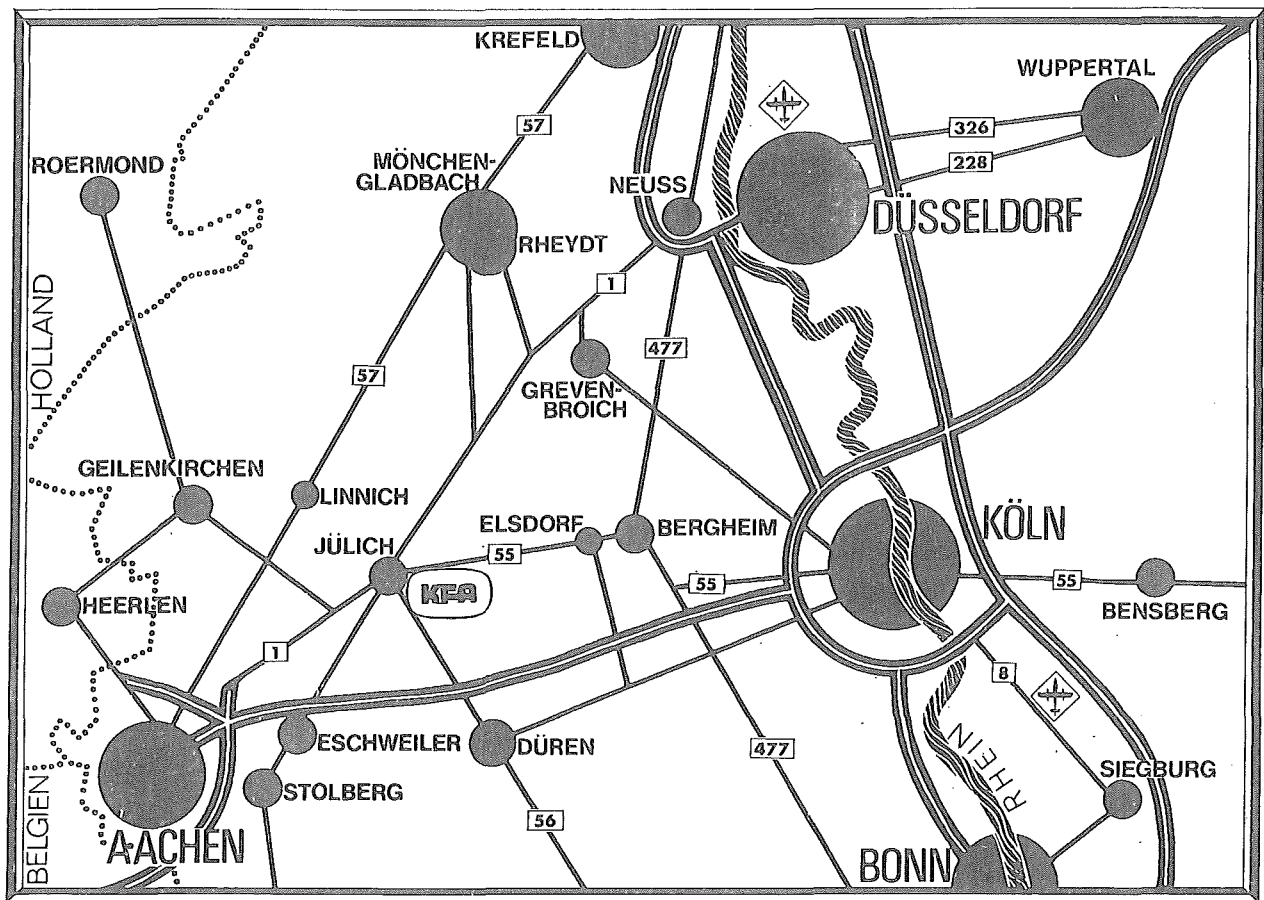
**Lichtinduzierte Entwicklung von Etioplasten  
zu Chloroplasten:  
Induktion und Regulation der Membranbildung**

von

**B. Sprey**

**Jül - 1019 - BO  
November 1973**

Als Manuskript gedruckt



**Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 1019**  
Institut für Botanik und Mikrobiologie Jül - 1019 - BO

Dok.: Chloroplasts  
Etioplasts  
Membranes  
Light-Induced Development

Im Tausch zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH,  
Jülich, Bundesrepublik Deutschland

**Lichtinduzierte Entwicklung von Etioplasten  
zu Chloroplasten:  
Induktion und Regulation der Membranbildung**

von

**B. Sprey**



Lichtinduzierte Entwicklung von Etioplasten zu Chloroplasten :  
Induktion und Regulation der Membranbildung

von

B. Sprey

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
I Einleitung	3
II Material und Methoden	6
III Änderungen der ultrastrukturellen Membran- konfiguration während der Chloroplastengenese	14
IV Membranproteine und Chloroplastenentwicklung	43
V Reduktiver Pentosephosphatweg und Plastidendifferenzierung	54
VI Fraction I-Protein: Molekulargewicht, Unter- einheiten, Aminosäurezusammensetzung und Aktivität von RuDP-carboxylase (E.C. 4.1.1.39)	63
VII Lipidsynthesen und Membranbildungsprozesse	75
1. Lichtinduzierte Veränderungen der Plastoglobulianordnung	82
VIII Membranassoziierte Plastiden-DNA: Isolierung und Abbildung	90
IX Ribosomale RNA in Plastiden: Gelelektrophore- tische Trennung und elektronenmikroskopische Abbildung	111
X Synthese ribosomaler RNAs während der Ent- wicklung von Proplastiden zu Etio- und Chloroplasten	119
1. Verbreitung von rRNA in verschiedenen Plastidentypen	142
XI Ribosomale RNA-Synthese und lichtinduzierte Chloroplastenentwicklung. Wirkung spezifi- scher Inhibitoren auf die Membranbildung	150

	Seite
XII Ribosomale RNA und Thylakoidmembranen in Plastiden von Chlorophylldefekten	177
Literaturverzeichnis	204

## I. Einleitung

Die Entwicklung der Proplastiden zu Etioplasten ist ein lichtunabhängiger Vorgang, der eine Serie plastidenspezifischer Synthesen von Nucleinsäuren, Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen impliziert. Etioplasten - ein für etioliierte Angiospermen typisches Plastidenentwicklungsstadium, das geringe Mengen Protochlorophyllid, aber noch keine Chlorophylle enthält - sind Endprodukte einer Sequenz von Entwicklungsprozessen aus undifferenzierten Proplastiden. Dieser lichtunabhängige Differenzierungsvorgang ist u.a. mit der Ausbildung eines plastideneigenen Systems für Proteinsynthesen (DNA, 70 S Ribosomen, tRNA, Aminoacyl-RNA Synthetasen) korreliert. Damit können in der Dunkelphase signifikante Mengen pufferlöslicher Stromaenzyme (z.B. Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges, Fraction I-Protein), wasserunlösliche Strukturproteine des Prolamellar-körpers - ein charakteristisches inneres Membransystem der Etioplasten - und membranassoziierte Proteine des photosynthetischen Elektronentransportes synthetisiert werden.

Die weitere Entwicklung der Etioplasten zum photosynthetisch aktiven Chloroplasten wird durch Licht - in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Wellenlänge - induziert und durch Photoakzeptoren reguliert. Die Photoregulationen können indirekt über differentielle Genaktivierungen oder/und direkt durch Enzymaktivitätsänderungen infolge Wechsel der Membranpermeabilität für Substrate und direkt durch de novo-Synthesen von Enzymen wirken. Kontrolliert werden die lichtinduzierten Regelprozesse durch die im Kern und in den Plastiden lokalisierte DNA. Dabei übernimmt die Kern-DNA wahrscheinlich die Funktion des Trägers der Strukturgene für viele Chloroplastenproteine, während die Plastiden-DNA möglicherweise als Sitz der Regulatorgene aufzufassen ist.

Kern, Cytoplasma und die durch eine doppelte Hüllmembran begrenzten Plastiden besitzen je ein getrenntes System der Transcription und Translation. Die räumliche Kompartimentierung des Cytoplasmas vom Plastidenstroma schließt die funktionelle Trennung nicht aus: es ist anzunehmen, daß an der Kern- bzw. Plastiden-DNA transcri-

bierte mRNAs sowohl an den 70 S Ribosomen der Plastiden als auch an den 80 S Ribosomen des Cytoplasmas zu spezifischen Polypeptiden während der Plastidendifferenzierung verknüpft werden.

Die Präsenz mehrerer Regelkreise, die in pflanzlichen Eukaryontenzellen die Plastidenentwicklung steuern, erschwert die Interpretation der Ergebnisse im Sinne einer kausalen Analyse. So sind Steuerung und Verlauf der Photomorphogenese von Etioplasten zu Chloroplasten ein komplexes Differenzierungsproblem. Zum Teil bedingt durch differentielle Genaktivierung übernehmen die Etioplasten in Blättern heterotropher Pflanzen während ihrer Entwicklung zu Chloroplasten sequentiell Teilschritte der Photosynthese.

Trotz einer Fülle von Daten über ultrastrukturelle und biochemische Teilaspekte der Chloroplastengenese aus Etioplasten sind viele Detailfragen - insbesondere der Synchronisation ultrastruktureller und funktioneller Differenzierungsschritte - weitgehend ungelöst. Mit den Methoden der Elektronenmikroskopie und der Biochemie werden in dieser Arbeit Einzelschritte der Chloroplastenentwicklung analysiert. Als Objekt wurden Etioplasten, ergrünende Plastiden und Chloroplasten in vivo oder im isolierten Zustand aus Primärblättern von *Hordeum vulgare* 'Bido' L. untersucht.

Daß die lichtinduzierte Chloroplastengenese in diesen Blattteilen weitgehend synchron verläuft und die Chloroplastenentwicklung der einzige Differenzierungsprozeß in den älteren, ausdifferenzierten Primärblättern ist, ließ das Objekt für entwicklungsphysiologische Fragestellungen geeignet erscheinen.

Um die mit der Plastidenentwicklung korrelierten ultrastrukturellen Veränderungen zu verdeutlichen, wurde das klassische, von MÜHLETHALER und FREY-WYSSLING (1959) entwickelte Schema der Plastidenentwicklung als Beispiel gewählt (Abb. 1). So gesehen ist die lichtabhängige Differenzierung der Etioplasten in Chloroplasten ein Teilaspekt von Membranbildungs- und -umbildungsprozessen, der im wesentlichen die Umwandlung der in den Pro-

In light: normal formation of grana and stroma lamellae

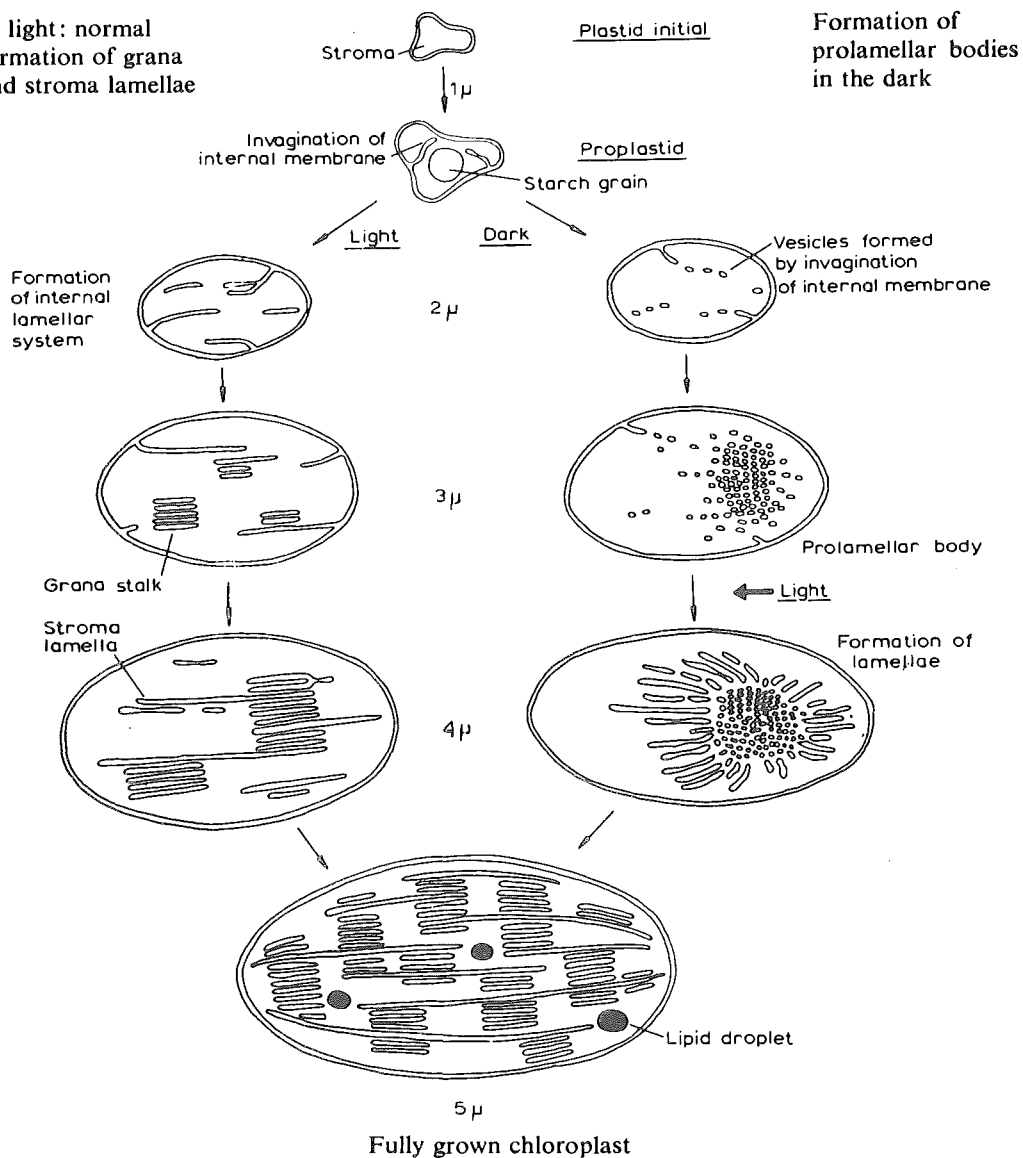


Abb. 1: Lichtabhängige und lichtunabhängige Ontogenese von Chloroplasten bzw. Etioplasten aus Proplastiden (nach MÜHLETHALER und FREY-WYSSLING 1959)

lamellarkörpern präformierten Membranen in Stromathylakoide und anschließend die Neubildung von Granathylakoiden beinhaltet. Gleichzeitig können mit der Photokonversion der Prolamellarkörper in chlorophyllhaltige Thylakoidmembranen im Plastidenstroma zum Teil lichtabhängige Synthesen initiiert werden, die mit der Bildung photosynthetisch aktiver Chloroplasten abschließen.

## II. Material und Methoden

Untersucht wurden lichtinduzierte Veränderungen an sieben Tage alten Primärblattspitzen (5 cm) von *Hordeum vulgare*, var. 'Bido'. Der Entwicklungszustand der Etioplasten dieses Blattalters ist für die Untersuchungen der lichtinduzierten Veränderungen besonders geeignet: Protochlorophyll(id)gehalt, Größe der Prolamellarkörper und die Bildung von Primärthylakoiden erreichen maximale Werte am siebenten Tag der Blattentwicklung (HENNINGSEN und BOYNTON 1967). Die Chloroplastenentwicklung wurde nach Belichtung unterschiedlicher Dauer (Philips Leuchtstoffröhren, TLW, 5 kLux; Belichtungsdauer: 5 und 30 Minuten, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden) abgebrochen und die jeweiligen Differenzierungsstadien vergleichend analysiert.

### Elektronenmikroskopie

Primärblattstückchen ( $1 \text{ mm}^2$ ) wurden in phosphatgepuffertem, 6,25%igem Glutaraldehyd (pH 7,2) fixiert (2 Stunden) und in phosphatgepuffertem, 1%igem  $\text{OsO}_4$  (pH 7,2) nachfixiert (2 - 12 Stunden). Die Entwässerung verlief über eine gestufte Serie von Äthanol über Propylenoxid. Das fixierte Material wurde in niedrig-visköses Epon eingebettet (SPURR 1969). Die mit Uranylacetat kontrastierten Ultradünnschnitte wurden zusätzlich mit Bleicitrat (VENABLE und COGGESHALL 1965) für 1-5 Minuten nachkontrastiert und im Elmiskop I (Fa. Siemens) elektronenmikroskopisch untersucht.

Für die Negativ-Kontrastierung von Plastidenbruchstücken und von Plastidenproteinen wurden engmaschige (150 mesh), Formvarbefilmte Cu-Netzchen verwendet, die zusätzlich durch eine aufgedampfte Kohleschicht verstärkt wurden. Die frisch hergestellten Präparate wurden auf die Trägernetzchen angetrocknet und mit 2% Phosphorwolframsäure, deren pH mit nKOH auf 7,0 eingestellt wurde, kontrastiert.

Zur Kegelbedampfung von isolierten Thylakoidmembranen wurden Plastiden im Dichtegradienten isoliert (Kap. VIII), nach osmotischer Lysis durch wiederholtes Waschen in Phosphatpuffer gereinigt und auf einem Teflon-beschichteten Aluminiumtrog

(E. FULLHAM, N.Y.) gespreitet. Die auf den Formvar-befilmten Cu-Netzchen angetrockneten Membranen wurden unter einem Winkel von  $6^{\circ}$  mit Platindraht ( $\emptyset$  0,1 mm, Länge 7 cm) kegelbedampft (Fa. Edwards). Die elektronenmikroskopischen Mikrographien wurden, z.T. nach Anfertigen von Zwischenvergrößerungen, densitometrisch ausgewertet (Chromoscan, Fa. Joyce und Loeb1).

Die Beugungsdiagramme der parakristallin angeordneten Plastidenkomponenten wurden von den elektronenmikroskopischen Negativen mit einem optischen Diffraktometer (Fa. Polaron) hergestellt.

Neben der Ultradünnschnittechnik nach chemischer Fixierung wurden  $1 \text{ mm}^2$ -Blattstückchen nach Vorfixierung in Glutaraldehyd und Zusatz von 20% Glycerin als Gefrierschutzmittel nach der Gefrierätzmethode (MOOR et al. 1961) untersucht. Die Präparate wurden mit flüssigem Dichloridfluormethan in speziellen Präparathalterneingefroren, in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und auf den Objektisch ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) übertragen.

Mit dem gekühlten Mikrotommesser ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) werden Querbrüche durch die Blattspreite gelegt (Objekttemperatur  $-99^{\circ}\text{C}$ ). Nach einer Sublimationsdauer von einer Minute bei einem Vakuum von  $10^{-6}$  Torr wurden die Objekte schrägbedampft.

Für die Schrägbedampfung (Bedampfungswinkel  $45^{\circ}$ ) wurde ein enggewickelter Platin-Iridiumdraht (7 cm Länge, 0,1 mm  $\emptyset$ ) aufgedampft. Um reproduzierbare Metallbeschattungen unter gleichen Bedampfungswinkeln zu erhalten, wurde der Platin-Kohleverdampfer und die Kohleverdampfungseinrichtung der Gefrierätzanlage (Fa. Balzers) so umgebaut, daß die Zentrierung der Kohleelektroden spitzen auf das Präparat entfiel.

Zur Ablösung der Abdrücke wurden die Objekte durch eine Serie von Lösungsmitteln geführt: aqua dest., 15 min.; 20%ige Chromschwefelsäure, 15 min.; aqua dest., 15 min.; 40-70%ige Schwefelsäure je nach Bedarf und 2 x 15 min. aqua dest.. Zur weiteren Beobachtung im Elektronenmikroskop wurden die Abdrücke auf Formvar-befilmte Kupferobjektträgernetzchen mit einer Platinöse übertragen.

Die Extraktion der Chlorophyllide erfolgte mit kaltem 80%igen Aceton unter Zusatz von Spuren von  $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$  im Sorvall-Omnimixer. Im Falle der quantitativen Bestimmung der Protochlorophyllidreduktion wurden die Primärblätter nach einer Belichtungsdauer von 5 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort mit kaltem Aceton extrahiert. Die eingeengten Chlorophyllide wurden dünnschichtchromatographisch an Cellulose MN 300 im Trennmittelgemisch Methanol-Dichlormethan- $\text{H}_2\text{O}$  (100:18:20; v/v/v) getrennt (SCHNEIDER 1967). Die dc-getrennten Chlorophyllide wurden fluorometrisch bei 325 nm identifiziert. Mit Hilfe eines Gelb-Grün-Filters wurden sichtbare, nichtfluoreszierende Pigmente - bis auf eine im Lutein fluoreszierende Bande (vgl. SCHNEIDER 1967) - unterdrückt. Die Lage der fluoreszierenden Pigmente - Protochlorophyllid, Protochlorophyll, Chlorophyllid, Chlorophyll a und b - wurde durch Densitometrie qualitativ bestimmt (Chromoscan, Fa. Joyce und Loebler). Als Basislinie wurde das Mittel der maximalen und minimalen Durchlässigkeit des photographischen Negativs festgelegt.

Die quantitative Bestimmung des Verhältnisses von Protochlorophyll(id) zu Chlorophyll(id) wurde unter Verwendung der spezifischen Absorptionskoeffizienten für Chlorophyll a bei 663 nm (McKINNEY 1941) und Protochlorophyll bei 626 nm (ANDERSON und BOARDMAN 1964) berechnet:

$$C = 12.2013 \cdot E_{663} - 0.0699 \cdot E_{626}$$

$$P = 28.6818 \cdot E_{626} - 5.209 \cdot E_{663}$$

(wobei C und P = Mikrogramm Chlorophyll(id) bzw. Protochlorophyll(id)/ml·cm ist).

Der Chlorophyllgehalt wurde nach der ARNON-Methode (1949) oder nomogrammatisch nach KIRK (1968) bestimmt.

Zum Nachweis  $^{14}\text{C}$ -markierter Intermediärprodukte des reduktiven Pentosephosphatweges wurden die mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) extrahierten, radioaktiven Zwischenprodukte papierchromatographisch zweidimensional getrennt (BENSON et al. 1950) und autoradiographisch (Kodak Röntgenfilm, royal blue) identifiziert. Die radioaktiven Flecken wurden ausgeschnitten und ihre

Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, Tri-Carb) in Toluol (1000 ml), p-bis-(2,5-Phenylloxazolyl)benzol (100 mg), 2,5-Diphenyloxazol (4 g) bestimmt.

Die Markierungs- und Extraktionsbedingungen nach  $^{14}\text{CO}_2$ -Begasung sind in Kap. XII beschrieben.

Auf die Isolierungsmethode von Plastiden (Etioplasten, ergrünende Plastiden und Chloroplasten) im Ficoll-Dextran-Saccharose Gradienten wird in Kap. VIII eingegangen.

Die Plastoglobuli aus verschiedenen Plastidendifferenzierungsstadien wurden nach Ultraschallbehandlung (Braunsonic 300 S) bei  $4^\circ\text{C}$  und mit Hilfe differentieller Zentrifugation isoliert (LICHTENTHALER und SPREY 1966). Zur elektronenmikroskopischen Abbildung wurden sie  $\text{OsO}_4$ -fixiert und wahlweise mit Pt-C-schrägbedampft. Für die Proteinextraktion wurden die isolierten Plastoglobuli solange mit Phosphatpuffer über Millipore-Filter (AAWP 02500) gewaschen, bis das Eluat frei von löslichen Proteinen war (LOWRY et al. 1951). Die Plastoglobuliproteine wurden mit 1% Natriumlaurylsulfat (SDS) in 0.01 M Tris-Glycin Puffer (pH 8,9) gelöst und der unlösliche Debris abzentrifugiert (Beckman Minifuge). Die Proteinkonzentration wurde mit Folin-Reagenz bestimmt (LOWRY et al. 1951) und der Überstand gelelektrophoretisch in 7,0% Polyacrylamidgelen (Gelsystem 1a, MAURER 1971) in Gegenwart von 0,1% SDS im Elektrodenpuffer (Tris-Glycin-Puffer, pH 8,9) getrennt. Als Standarddeichproteine zur Bestimmung der Molekulargewichte in Gegenwart von 0,1% SDS (SHAPIRO et al. 1967) wurden verwendet: Cytochrom c (M.W. 13.500), Chymotrypsinogen A (M.W. 25.000), Ovalbumin (M.W. 45.000), Rinderserumalbumin (M.W. 67.000), Aldolase (M.W. 147.000), Catalase (M.W. 240.000), Ferritin (M.W. 540.000, Combithek, Fa. Boehringer).

Fraction I-Protein wurde in Tris-HCl Puffer (pH 8,0) in Gegenwart von 0,002 M  $\text{MgCl}_2$ , 0,0005 M Cysteinhydrochlorid, 0,01 M Mercaptoaethanol im eisgekühlten Omnimixer extrahiert, für 30 Minuten im Ti-50 Rotor mit 40.000 Upm zentrifugiert (Beckman L-50). Der Überstand wurde für die Enzymuntersuchungen und die

Gelfiltration (Sephadex G-100) nach den von KANNANGARA (1969) beschriebenen Bedingungen verwendet.

Zur quantitativen Bestimmung der löslichen Proteine nach der Folin-Ciocalteu Methode (LOWRY et al. 1951) wurde Serumalbumin als Standardprotein verwendet.

Für die Bestimmung der spezifischen Syntheserate von Fraction I-Protein während der Chloroplastengenesse wurden abgeschnittene, 5 Tage alte, etiolierte, oberflächensterilisierte Primärblätter für 48 Stunden mit einem  $^{14}\text{C}$ -Proteinhydrolysat von Chlorella ( $5\ \mu\text{Ci/ml}$ , Fa. Buchler) in Dunkelheit vorinkubiert. Die Proben verblieben in Gegenwart der  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in Dunkelheit, bzw. wurden für 48 Stunden oder 8 Stunden belichtet. Das an Sephadex(G-100)-Säulen getrennte Fraction I-Protein wurde in 5% Trichloressigsäure gefällt, abzentrifugiert und in dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und erneut pelletiert (2x). Nach Lyophilisierung der Probe wurde ihre Radioaktivität (Imp./Minute  $\cdot$  mg Protein) unter Zusatz von Soluene (Fa. Packard) und unter Verwendung des oben angegebenen Szintillationscocktails im Tri-Carb (Fa. Packard) bestimmt.

Alternativ dazu wurden spezifische Syntheseraten des Fraction I-Proteins während der Blättergrünung durch Markierung in  $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre via Photosynthese bestimmt. Aus 5 mCi  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  wurde mit 70%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in einem Exsikkator (Vol. 5 l)  $^{14}\text{CO}_2$  generiert und eine Stunde belichtet (35 kLux). Fraction I-Protein wurde analog der oben beschriebenen Methode extrahiert und isoliert. Verglichen wurden die Syntheseraten von Fraction I-Protein in 7 Tage alten, etiolierten (im Exsikkator lichtdicht abgeschirmten) Blättern und ergrünenden Blättern (nach unterschiedlicher Belichtungsdauer).

Die Aktivität der Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase wurde nach der bei KANNANGARA (1969) aufgeführten Methode bestimmt.

Die Aktivität der Enzymsequenz Phosphoriboisomerase, Phosphoribulokinase und Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase wurde nach der bei STEER und Mitarbeitern (1966) beschriebenen Methodik ermittelt. Die Radioaktivität der  $^{14}\text{C}$ -Phosphoglycerinsäure

wurde als Ipm pro Milligramm bzw. Mikrogramm extrahierbarer, pufferlöslicher Gesamtproteine angegeben (vgl. Kap. V).

Zur Fraktionierung der Untereinheiten von Fraction I-Protein wurde das native Protein in Gegenwart von 0,1% SDS elektrophoretisch in 7,0% Polyacrylamidgelen getrennt. Elektrodenpuffer (Tris-Glycin, pH 8,9), Gel und Probe waren 0,1% an SDS. Die Untereinheiten wurden in einem Glaszylinder ( $\emptyset$  2,3 cm) einer analytischen Trennapparatur (Fa. WTW) bei 4°C getrennt (Probenmenge 1 mg). Es wurden jeweils zwei Versuche parallel durchgeführt. Bei Erreichen des Gelendes durch die Bromphenolblau-Front wurden die Gele aus den Trennröhrchen entfernt. Ein Gel wurde mit 1% Amidoschwarzlösung in 7,5% Essigsäure angefärbt und die Lage der Proteinbanden nach Entfärbung der Gele markiert. Dieses Gel fungierte als Referenz. Die proteinhaltigen Banden des zweiten ungefärbten Gels wurden, entsprechend der Lage der Proteine im Referenzgel, ausgeschnitten, durch ein engmaschiges Nylonsieb mit einem Pistill zerrieben und die Proteine in 10 mM Tris-Glycin Puffer (pH 8,9) über Nacht bei 4°C unter Schütteln eluiert. Nach Zentrifugation (30 Minuten, 40.000 Upm, Ti-50 Rotor, Spinco L 50) wurde der Überstand TCA-gefällt und durch Zentrifugation pelletiert. Das Sediment wurde in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst und erneut zentrifugiert (3x). Das Sediment wurde gefriergetrocknet.

Für die Aminosäureanalyse wurden die Proteine 8, 14 oder 24 Stunden in 6N HCl bei 110°C in Gegenwart von Stickstoff in verschlossenen Reagenzgläschen (Sovirel) hydrolysiert. Zur Aminosäureanalyse wurde ein automatischer Analysator (Fa. Biocal) benutzt.

Die Isolierung des Protochlorophyllid-Holochroms aus 7 Tage alten, etiolierten Primärblättern von *H. vulgare* erfolgte unter Zusatz des nichtionischen Detergenz Triton X-100 (0,06%, v/v) in 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,5), enthaltend 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA und 25% (v/v) Glycerin nach der bei AKOYUNOGLU und Mitarbeitern (1970) beschriebenen Methode. Als Funktionstest wurde die spektralphotometrisch nachweisbare Verschiebung des Absorp-

tionsmaximums von Protochlorophyllid-Holochrom von 639 nm nach 678 nm durch Belichtung der Protochlorophyllid-Holochromlösung in einer 1 cm Meßküvette verwendet (SCHOPFER und SIEGELMAN 1968).

Für die Markierungsexperimente zur Bestimmung der Lipidsynthesen wurden die etiolierten Primärblätter von *H. vulgare* unter sterilem, dest. Wasser oberhalb der Coleoptile abgeschnitten und in Bechergläser, die mit wenig dest. H<sub>2</sub>O gefüllt waren, für 4, 12 und 24 Stunden belichtet (Mischlicht aus Osram L Fluora 40 W und Philips TL 40 W Leuchtstoffröhren, 5.000 Lux). Als Kontrolle dienten gleichalte (7 Tage), abgeschnittene Primärblätter etiolierter bzw. kontinuierlich belichteter Kulturen von *H. vulgare*.

Zur Markierung der Glykolipide und der Phospholipide wurden die abgeschnittenen Primärblätter mit verdünnter, wässriger H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub>-Lösung (50 µCi/ml, Fa. Hoechst, Fa. Buchler) bzw. mit <sup>14</sup>C-Natriumacetat-Lösung (5 µCi/ml, Fa. Buchler) jeweils zwei Stunden vor Belichtungsende inkubiert.

Für die Lipidextraktion wurden die Blätter mit flüssigem Stickstoff zermörkert und gefriergetrocknet. Das Lyophilat wurde unter Stickstoff bei -20°C aufbewahrt und zur Aufarbeitung mit einem schnell rotierenden Messerhomogenisator (Krupps) pulverisiert und die Lipide mit kaltem, wasserfreiem Methanol/Äther-Gemisch (2:1, v/v) unter Zusatz von etwas flüssigem Stickstoff 12 Stunden im Dunkeln bei 4°C extrahiert. Der Rückstand wurde über eine Glasfritte (G4) bis zur Farblosigkeit gewaschen und im Rotationsverdampfer unter Stickstoffbelüftung bis zur Trockene eingengt. Die wasserlöslichen Bestandteile wurden an der Sephadex(G-25)-Säule durch Verteilungschromatographie zwischen der stationären, hydrophilen Phase und mobiler, lipophiler Phase in einem Chloroform-Methanol-Wassergemisch (200:100:75, v/v/v) abgetrennt (WUTHIER 1966).

Die eluierten Lipide wurden erneut in Gegenwart von Stickstoff vakuumgetrocknet, gravimetrisch bestimmt und das Trockengewicht mit dem 10-fachen Volumen an Benzol aufgenommen. Aliquote Teile wurden punktförmig bzw. strichförmig auf die DC-Platten aufge-

tragen. Die Lipide wurden eindimensional auf aktivierten Dünnschichtplatten (Kieselgel G) im System Chloroform-Methanol-Wasser (75:24:1, v/v/v) bzw. im Trennmittelgemisch Chloroform-Methanol-Essigsäureäthylester-3% Ammoniak (50:25:25:1, v/v/v/v) getrennt.

Die Identifizierung der markierten Phospholipide geschah unter Verwendung bekannter Rf-Werte (LANGENBACH und KNOCHE 1971) nach Lagebestimmung der Einzelflecke durch Autoradiographie (Expositionsdauer 72 Stunden, Kodak, royal blue-Röntgenfilm), direkt auf der DC-Platte (Dünnschichtscanner, Fa. Berthold) oder nach Abschaben der entsprechenden radioaktiven Flecken und Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tri-Carb, Fa. Packard) mit der oben angegebenen Szintillatorlösung.

Für die Phospholipide wurden folgende Abkürzungen verwendet: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylinosit (PI), Phosphatidäthanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Diphosphatidylglycerin (DPG), Phosphatidylsäure (PA).

Die im Text verwendeten Abkürzungen für die Glykolipide Monogalaktosyldiglycerid, Digalaktosyldiglycerid und Sulfolipid sind MG, DG und SL. Als Sprühreagenz wurde Phosphormolybdänsäure (Fa. Merck) verwendet. Die Expositionsdauer für <sup>14</sup>C-markierte Galaktolipide betrug eine Woche.

### III. Änderungen der ultrastrukturellen Membrankonfiguration während der Chloroplastengenese

Die ultrastrukturelle Anordnung des inneren Membransystems der Etioplasten von Angiospermen in Form der parakristallinen Prolamellarkörper, deren Umwandlung in Primärthylakoide und die Neubildung der Granathylakoide in den photosynthetisch aktiven Chloroplasten sind Gegenstand zahlreicher elektronenmikroskopischer Untersuchungen gewesen. Im Endeffekt führten sie zu einer genauen Kenntnis der räumlichen Membrananordnung des Prolamellarkörpers in Etioplasten (MENKE 1963, WEHRMEYER 1965 a-c, GUNNING und JAGOE 1967, IKEDA 1968, WEIER und BROWN 1970) und der Stroma- und Granathylakoide in Chloroplasten (WEIER und TOMSON 1962, WEHRMEYER 1963, 1964).

Der Vorgang der Photokonversion dreidimensional orientierter Membranen des Prolamellarkörpers der Etioplasten in flächig angeordnete Thylakoide besteht aus mehreren Einzelprozessen, die durch verschiedene Lichtintensitäten (ERIKSSON et al. 1961) und unterschiedliche Wellenlängen (VIRGIN et al. 1963, KLEIN et al. 1964) induziert werden. Die Aktionsspektren für die einzelnen Membranbildungsprozesse implizieren die Beteiligung der Photoakzeptoren Protochlorophyll(id), Phytochrom und eines im Blaubereich absorbierenden Photoakzeptors (HENNINGSEN 1967).

An der lichtabhängigen Metamorphose des Kristallgitters der Prolamellarkörper in Stroma- und Granathylakoide sind Vorgänge wie Membranfluß, Membrantransformation und Membranneubildung hintereinandergeschaltet:

- Die Veränderung der Membrananordnung des Prolamellarkörpers unter Verlust der parakristallinen Struktur (ERIKSSON et al. 1961, HENNINGSEN und BOYNTON 1970) kann als Membranfluß aufgefaßt werden.
- Die Umformung präformierter Membranoberflächen in perforierte Thylakoide (GUNNING und JAGOE 1967) ist eine Membrantransformation. (Rest-)Prolamellarkörper und perforierte Thylakoide bilden ein kontinuierliches Membransystem (SCHNEPF 1964). Die Interstitialräume des (Rest-)Prolamellarkörpers und der per-

forierten (Primär-)Thylakoide sind identisch. Die perforierten Thylakoide werden in geschlossene Thylakoide umgewandelt.

Beide Prozesse sind Folge niederenergetischer Lichtreaktionen (EILAM und KLEIN 1962, SIRONVAL et al. 1968, 1969).

Der Vorgang der Primärthylakoidbildung aus Prolamellarkörpern ist zeitlich etwa mit dem Ende der lag-Phase der Chlorophyllsynthese abgeschlossen. Daß er mehr als Membranumbildung und nicht als mit Synthesen verbundene Membranneubildung aufzufassen ist, zeigt die inverse Korrelation von Membranoberflächen des Prolamellarkörpers und der Primärthylakoide. Die lichtinduzierte Abnahme an Membransubstanz der Prolamellarkörper resultiert in einer entsprechenden Zunahme von Primärthylakoiden. Dieser Prozeß ist in Dunkelheit reversibel (HENNINGSEN und BOYNTON 1969). Auch die weitgehend identische Zusammensetzung von Membranproteinen und -lipiden aus Plastiden dieser Entwicklungsstadien (REMY 1973, PHUNG NHU HUNG et al. 1972, BOARDMAN et al. 1972) bestätigt diese Auffassung: Membranen des Prolamellarkörpers sind Reservoir und Bausteine der Primärthylakoide.

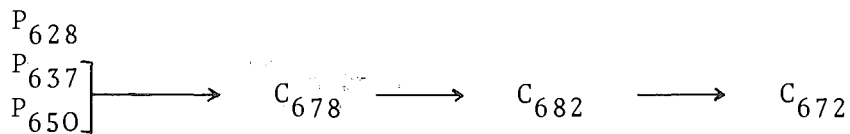
- Die Neubildung einzelner Granathylakoide und ihre Überschiebung in Grana ist abhängig von hohen Lichtintensitäten (ERIKSSON et al. 1961). Die Ausprägung der Grana verläuft korreliert mit der Zunahme grüner Pigmente während der log-Phase der Chlorophyllsynthese.

Die de novo-Bildung der Granathylakoide ist mit weiteren Netto-synthesen von plastidenspezifischen Chinonen, Carotinoiden, Phospho- und Galaktolipiden (LICHTENTHALER und BECKER 1972, LÜRSEN 1970, BOARDMAN et al. 1972, TEVINI 1972) und Membranproteinen verbunden (PHUNG NHU HUNG et al. 1972).

Um diesen strukturellen Veränderungen der sequentiell auftretenden Membranbildungsprozesse während der Chloroplastengenese analoge funktionelle Veränderungen zuzuordnen, wurden im wesentlichen ultrastrukturelle Membranveränderungen mit in vivo-Absorptionsmessungen korreliert.

Die Umwandlung der kristallinen Membranfiguration des Prolamellar-

körpers (tube transformation) ist mit der Photokonversion von Protochlorophyll(id) zu Chlorophyllid a verbunden (ERIKSSON et al. 1961, VIRGIN et al. 1963, KAHN 1968, HENNINGSEN und BOYNTON 1970). Die Photokonversion von Protochlorophyll(id,P) verläuft in Angiospermen mit einer Verschiebung der Absorptionsmaxima in vivo. P kommt in drei verschiedenen Absorptionsformen vor: in zwei photochemisch aktiven Formen, die bei 637 und 650 nm absorbieren ( $P_{637}$ ,  $P_{650}$ ) und in einer inaktiven Form ( $P_{628}$ ). Bei Belichtung werden  $P_{650}$  und  $P_{637}$  in Chlorophyllid a, das bei 678 nm absorbiert ( $C_{678}$ ), dann in  $C_{682}$  und in  $C_{672}$  photokonvertiert (SHIBATA 1957, BOARDMAN et al. 1972).



Das Vorkommen von Protochlorophyll(id) ist bei Angiospermen mit der parakristallinen Membrankonfiguration in den Etioplasten assoziiert, wie die Rekrystallisation des Prolamellarkörpers und Resynthese von Protochlorophyll(id) in Dunkelheit zeigt (HENNINGSEN und BOYNTON 1970). Andererseits scheint die parakristalline Membrankonfiguration nicht unbedingt Voraussetzung bei der Protochlorophyll(id)reduktion zu sein:

- Protochlorophyll kommt in photosynthetisierenden Bakterien vor (*Rhodospseudomonas capsulata*). Die Mutante Rps. A la pho<sup>-</sup> bildet unter semianaeroben Bedingungen Protochlorophyll ohne Anhäufung von Membranen mit Prolamellarkörper-ähnlichem Aussehen (DREWS et al. 1971).
- Dunkelkulturen von *Euglena gracilis* enthalten geschlossene, lange Thylakoide und nichtkristalline Prolamellarkörper mit einer Protochlorophyll(id)-Absorption bei 635 nm ( $P_{635}$ ). Bei Belichtung wird  $P_{635}$  in Chlorophyll(id) mit einer maximalen Absorption bei 672 nm direkt photokonvertiert ( $P_{635} \longrightarrow C_{672}$ ), ohne daß der bei Angiospermen vorkommende SHIBATA-shift, d.h. eine intermediäre Absorptionsform von  $C_{682}$ , auftritt (BUTLER und BRIGGS 1965).
- Nicht an Membranen gebundenes, isoliertes Protochlorophyllid-Holochrom ( $P_{639}$ ) ist in Chlorophyllid-Holochrom ( $C_{678}$ ) photo-

transformierbar (SCHOPFER und SIEGELMAN 1968, AKOYUNOGLU et al. 1972).

Es existieren Hinweise, daß das aktive  $P_{635}$  und  $P_{650}$  in räumlich getrennten und in verschiedenen Membrananordnungen vorliegt. In einer kinetischen Untersuchung über die Entwicklung von Prolamellarkörpern fanden KLEIN und SCHIFF (1972) an *Phaseolus vulgaris* einen Zusammenhang im Vorkommen von  $P_{650}$ , kristalliner Membrankonfiguration und SHIBATA-shift. In alten Blättern von *Phaseolus vulgaris*, die Prolamellarkörper mit typischer parakristalliner Gitterstruktur enthalten, ist überwiegend  $P_{650}$  verbreitet, das via SHIBATA-shift über  $C_{683}$  in  $C_{672}$  phototransformiert wird. In jungen Blättern, die noch keine Prolamellarkörper, sondern nur deren Vorstufen als perforierte, flächig angeordnete Membranen enthalten, dominiert  $P_{635}$ , das direkt - wie bei *Euglena* - ohne SHIBATA-shift in  $C_{672}$  transformiert wird.

Als Fazit dieser Untersuchungen wäre denkbar, daß der Prolamellarkörper in Angiospermen das phototransformierbare  $P_{635}$  und  $P_{650}$  räumlich getrennt enthält. Das  $P_{650}$  sollte dann an die parakristallinen Membranen gebunden sein, während  $P_{635}$  in und an den langen, von der Prolamellarkörperperipherie ausgehenden Membranen lokalisiert sein sollte.

Durch Veränderung der Belichtungsbedingungen (Lichtblitzserien, AKOYUNOGLU et al. 1966, SIRONVAL et al. 1968; Anzucht bei Dunkelrotlicht, de GREEF et al. 1972) wurde versucht, den komplexen Vorgang der Steuerung der Chloroplastengenese zeitlich so zu verzögern, daß eine Korrelation von Veränderungen der Ultrastruktur - besonders die relativ schnelle Umwandlung des Prolamellarkörpers - mit Einzelschritten der beginnenden Photosyntheseaktivität erleichtert wurde.

So scheint einerseits die Ausbildung der Primärthylakoide mit dem Beginn der PS I-Aktivität verbunden zu sein (ARGYROUDI-AKOYUNOGLU et al. 1972, PHUNG NHU HUNG et al. 1970 a), während die Aktivität des PS II und ihrer gelelektrophoretisch nachweisbaren, zum PS II gehörenden Pigment-Proteinkomplexe, mit der Bildung der Granathylakoide korreliert ist.

Dieser Aspekt einer dimorphen Verteilung von PS I in den Primärthylakoiden, d.h. den späteren Stromathylakoiden, und dem PS I und PS II in den Granathylakoiden während der Chloroplastenontogenese entspricht den Vorstellungen von PARK und Mitarbeitern. Danach sind in ausdifferenzierten Chloroplasten nach Fraktionierung mit der French-Press und nachfolgender differentieller Zentrifugation von Grana- und Stromathylakoiden PS I-haltige Partikel und -aktivitäten in den Stromathylakoiden lokalisiert. PS I und PS II sind in den Granathylakoiden und den Kontaktzonen von Granathylakoiden mit Stromathylakoiden vorhanden (SANE et al. 1970, GOODCHILD und PARK 1971, SANE und PARK 1972). Analoge Verhältnisse liegen ebenfalls in den Chloroplasten der Leitbündelscheide von Pflanzen des  $C_4$ -dicarboxylsäure-Weges vor (KORTSCHAK et al. 1965, SLACK et al. 1969), deren Chloroplasten keine Granathylakoide (LAETSCH 1971) und angeblich keine PS II-Aktivitäten besitzen (WOO et al. 1970, vgl. SMILLIE et al. 1972).

Photoheterotrophe *Chlamydomonas* *stellata* bedarf nur des PS I, um ATP zur Photoassimilation von Acetat durch die cyclische Photophosphorylierung zu bilden: ihre Plastiden beinhalten im wesentlichen Stromathylakoide. Photoautotroph ernährte Flagellaten dieser Art benötigen das PS I und PS II zur photosynthetischen  $CO_2$ -Fixierung. In diesem Fall kommt es zur zusätzlichen Ausbildung von Grana (WIESSNER und AMELUNXEN 1969).

Die Entwicklung der Plastiden von *Phaseolus vulgaris* bei Anzucht der Pflanzen im Dunkelrotlicht (8 Tage) führt zu einer verzögerten Chloroplastenentwicklung: sie sind photosynthetisch aktiv, besitzen jedoch keine Grana (de GREEF et al. 1971). Zusätzliche Weißlichtgabe induziert die Granabildung (BUTLER et al. 1972). Möglicherweise weist die für die Granabildung benötigte kontinuierlich eingestrahelte hohe Lichtenergie (ERIKSSON et al. 1961) darauf hin, daß durch die Photophosphorylierung gebildetes ATP für die Ausbildung der Grana (stacking) nötig ist: CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon) hemmt die Photophosphorylierung und die Granabildung (BUTLER et al. 1972). Dabei werden fibrilläre Strukturen gebildet, die offensichtlich mit der Granabildung in Zusammenhang stehen. Ähnliche fibrilläre Stromakomponenten kommen auch unter natürlichen Entwicklungsbedingungen

Tab. I

Synthese und Syntheseprodukte von Stroma- und Thylakoidkomponenten während der Ergrünung etiolierter Primärblätter der Gerste <sup>1)</sup>

	Belichtungsdauer (Stunden)						
	0	2	4	6	8	10	12
Chlorophyll	0.0	3.9	8.5	14.9	17.0	20.2	35.4 %
<sup>14</sup> C-Intermediärprodukte <sup>2)</sup>	0.2	0.9	4.9	10.0	15.8	23.0	40.6 %
Stromaproteine <sup>3)</sup>	442				1370		6090
Membranproteine <sup>3,4)</sup>	81				320		980
Fraktion I-Protein <sup>5)</sup>	126				536		524
Phosphoribulokinase							
Phosphoribose-Isomerase	40500				53509		81266
RuDP-Carboxylase <sup>6)</sup>							

<sup>1)</sup> 7 Tage etioliert, Belichtung Dauer-Weißlicht, 5 kLux

<sup>2)</sup> 10' Photosynthese in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

<sup>3)</sup> 2 Stunden Photosynthese in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

<sup>4)</sup> SDS-Harnstoff-Extraktion, pH 4.2

<sup>5)</sup> Trennung nach Kannangara (1969)

<sup>6)</sup> Testansatz nach Steer et al. (1966)

<sup>3-6)</sup> Imp/mg Protein

in den Plastiden vor und wurden für *H. vulgare* in Zusammenhang mit der Granaausbildung gebracht (SPREY 1968).

Die folgende Untersuchung befaßt sich mit dem Vorkommen und der Verbreitung von zwei Stromabestandteilen der Plastiden von *H. vulgare*, die größenordnungsmäßig verschieden sind und offensichtlich sequentiell an der Bildung von Primärthylakoiden und Granathylakoiden beteiligt sind. Ihr Vorkommen wurde mit weiteren funktionellen, lichtinduzierten Veränderungen während der Chloroplastengenese korreliert.

Belichtung 7 Tage alter, dunkelgekeimter Primärblätter von *H. vulgare* induziert Synthesen und Aktivitätsänderungen von pufferlöslichen und membrangebundenen Proteinen sowie von Membranlipiden. Summarisch ist ein Teil der lichtinduzierten Synthesen in Tabelle I zusammengestellt. So verläuft die Plastidenentwicklung unter Lichteinfluß z.B. mit einer Nettosynthese des plastidenspezifischen Fraction I-Proteins und einer Aktivitätssteigerung der damit assoziierten RuDP-carboxylase (Kap. VI).

Die Aktivitäten der am Umsatz von Ribulose-5-Phosphat in Phosphoglycerinsäure beteiligten Enzyme Phosphoribulokinase, Phosphoriboisomerase und RuDP-carboxylase ist während einzelner Phasen der Chlorophyllsynthese erhöht (Tab. I, Kap. V).

Die Chlorophyllsynthese und die photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Assimilation treten nach zweistündiger Belichtung nicht oder nur unwesentlich in Erscheinung. Zum Ende der lag-Phase der Chlorophyllsynthese und mit Beginn der log-Phase (ca. 3-4 Stunden nach Belichtungsbeginn) liegen signifikante Chlorophyllmengen vor. Das Muster chromatographisch getrennter Intermediärprodukte des reduktiven Pentosephosphatweges ist komplett ausgebildet (Tab. IV). Plastiden dieses Entwicklungsstadiums enthalten wenige Reste des Prolamellarkörpers und überwiegend perforierte oder bereits geschlossene Stromathylakoide (Abb. 6-8).

Im weiteren Verlauf der log-Phase der Chlorophyllsynthese (6-12 Stunden nach Belichtungsbeginn) werden intensiv - etwa zeitgleich mit dem Erscheinen erster Granathylakoide und der Bildung von Grana(stapel)n - Chlorophylle, Membranlipide und Membran-

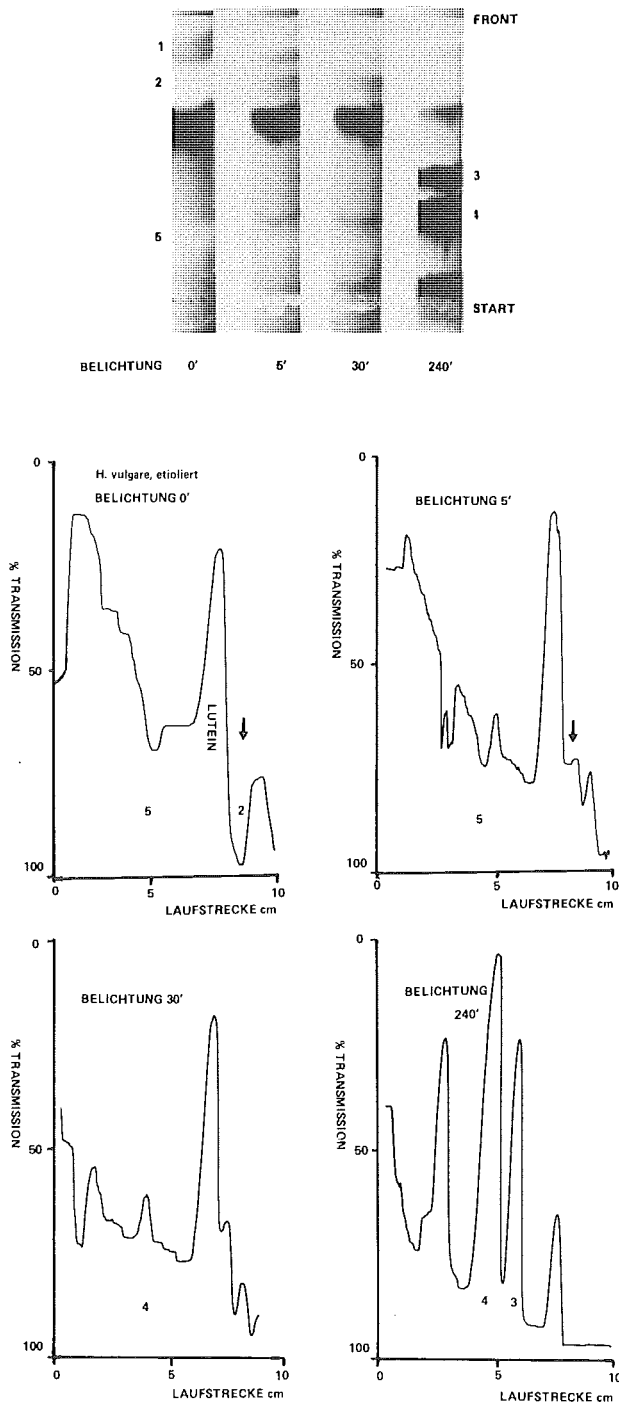


Abb. 2: Dünnschichtchromatographische Trennung von Chlorophyllid a (1), Protochlorophyllid (2), Chlorophyll b (3), Chlorophyll a (4) und Protochlorophyll (5) aus *H. vulgare*-Blättern nach verschiedenen Belichtungszeiten. Die dunkle Bande zwischen Chlorophyll b und Protochlorophyllid ist Lutein. Die dc-Trennungen wurden densitometrisch ausgewertet (unten)

proteine synthetisiert (Kap. IV, VII). Die Gesamtmenge extrahierbarer,  $^{14}\text{C}$ -markierter Photosyntheseprodukte ist in der log-Phase der Chlorophyllsynthese wesentlich erhöht (Tab. I).

Dünnschichtchromatographische Trennung von Chlorophyllvorstufen und Chlorophyllen nach verschiedenen Belichtungszeiten zeigt qualitative und quantitative Unterschiede im Pigmentspektrum. Etioplasten enthalten eine intensiv fluoreszierende Zone von Protochlorophyllid und eine schwach ausgeprägte Protochlorophyllbande mit geringer Fluoreszenz (Abb. 2). Nach 5 Minuten Dauerbelichtung ist das gesamte Protochlorophyllid photokonvertiert, während das Protochlorophyll noch vorhanden ist. Die Pigmente etiolierter bzw. belichteter Blätter zeigen in diesem Zeitraum nach Ätherextraktion eine Verschiebung der Absorptionsmaxima von 626 nm nach 663 nm.

Nach 30 Minuten Belichtung ist das phytilyerte Protochlorophyll dc-chromatographisch nicht mehr nachweisbar: möglicherweise als Folge von photooxydativer Zerstörung oder, in bezug auf das Protochlorophyllid, infolge einer langsameren Photokonversion (Abb. 2). Chlorophyll a ist nach diesem Belichtungszeitraum infolge seiner Fluoreszenz nachweisbar, Chlorophyll b konnte erst nach vierstündiger Belichtung dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Beide Pigmente nehmen danach mit zunehmender Belichtungsdauer rasch zu (Tab. I).

Die qualitative und quantitative Änderung der Zusammensetzung grüner Pigmente und Pigmentvorstufen wurde mit den Veränderungen der Membrananordnung in den Plastiden korreliert.

Glutaraldehyd-Osmium fixierte Blattstückchen aus 7 Tage alten Dunkelkulturen von *H. vulgare* besitzen Etioplasten mit Pro-lamellarkörpern in parakristalliner Anordnung ihrer Membranen. Die Doppelmembranen bilden die bekannte im Querschnitt hexagonale Anordnung. Das Ergebnis der optischen Diffraktion von elektronenmikroskopischen Mikrographien von Etioplasten mit parakristallinen Membranen bestätigt die Vorstellung von der hexagonalen Grundstruktur dieser protochlorophyllidhaltigen Membranen (Abb. 3).

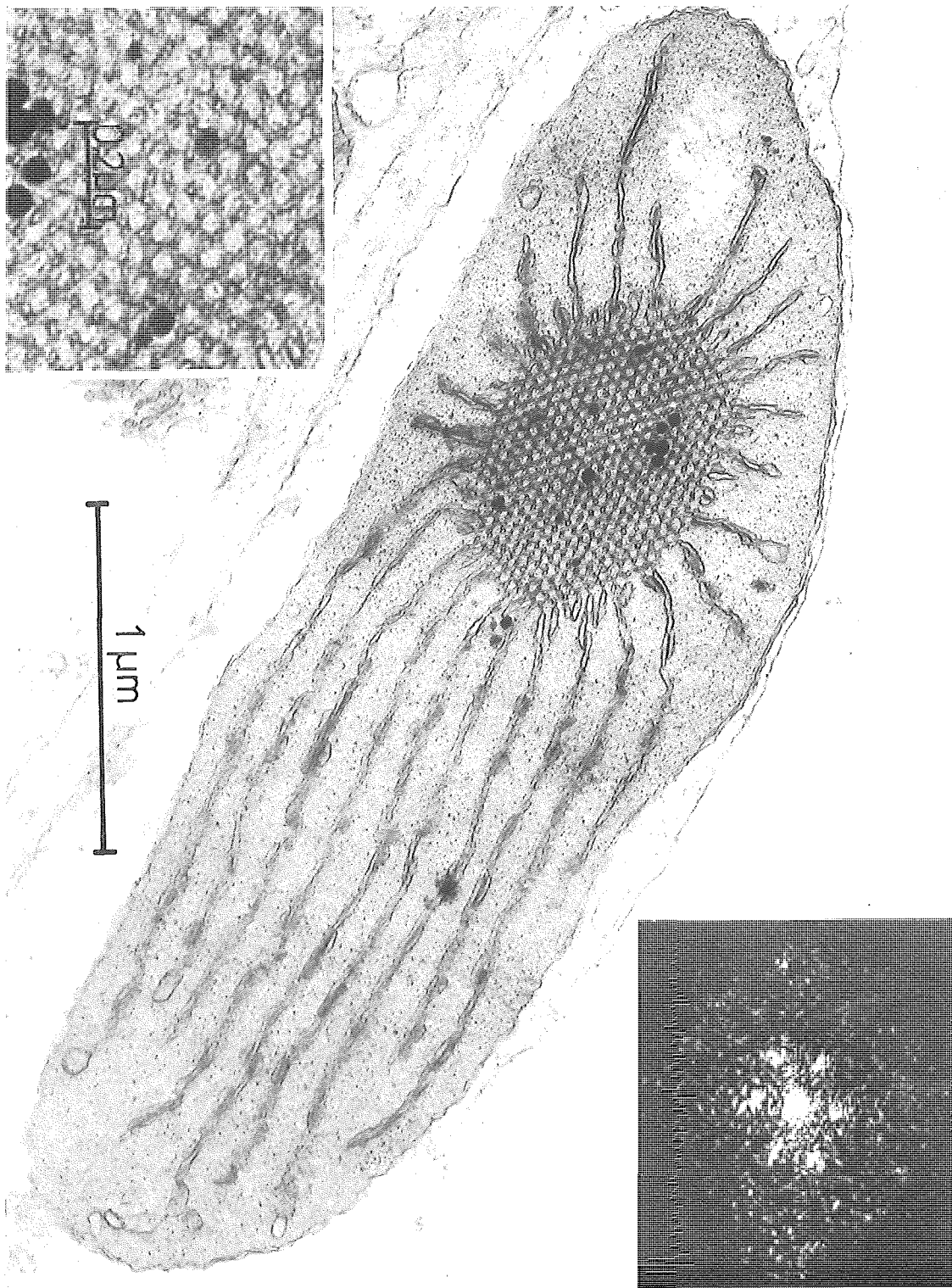


Abb. 3: Etioplast aus *H. vulgare* mit parakristalliner Membran-  
anordnung (Prolamellarkörper). Die optische Diffraktion  
(unterer Ausschnitt) der Prolamellarkörper (oberer Ein-  
satz) zeigt ein hexagonal angeordnetes Grundmuster

Eine Belichtungsdauer von 5 Minuten bewirkt die völlige Photo-konversion des Protochlorophyllids. Alle in diesem Zeitraum untersuchten Plastiden haben jedoch noch das parakristalline Membranismuster ihrer Prolamellarkörper. Die Protochlorophyllid-reduktion erfolgt also schneller als die Veränderungen im Kristallgitter der Prolamellarkörper (Abb. 4).

Nach 30 Minuten Belichtungsdauer, wenn weder Protochlorophyllid noch Protochlorophyll in den Dünnschichtchromatogrammen fluoro-metrisch nachweisbar sind, tritt eine Veränderung der Membran-anordnung der Prolamellarkörper auf. Sie verlieren ihre regel-mäßige hexagonale Anordnung. An der Peripherie der Prolamellar-körper treten die ersten perforierten Thylakoide auf. Diese stehen in direktem Zusammenhang mit dem Prolamellarkörper. In der Übergangszone von Prolamellarkörper und perforierten Mem-branen ist die Identität von Membranperforationen der Primär-thylakoide und den Interstitialräumen des Prolamellarkörpers erkennbar (Abb. 5, 6). Im Gegensatz zu den aus Prolamellarkörper-Membranen gebildeten, perforierten Primärthylakoiden können die bereits in den Etioplasten vorhandenen langen Thylakoide, die von der Peripherie der Prolamellarkörper ausgehen, durch ihre in sich geschlossenen Membranen von diesen unterschieden werden.

Mit längerer Belichtungsdauer (1,2 Stunden) werden die unregel-mäßigen Prolamellarkörperreste substantiell in perforierte Grana-thylakoide umgewandelt (Abb. 6). In diesen Entwicklungsstadien läßt sich nur Chlorophyll a dc-chromatographisch nachweisen.

Nach vierstündiger Belichtung liegen die Thylakoide überwiegend als in sich geschlossene Membranen vor. In seltenen Fällen tre-tten perforierte Thylakoide auf, die noch mit Resten unregelmäßig angeordneter Prolamellarkörper verbunden sind (Abb. 7). Diese Plastiden besitzen signifikante Mengen von Chlorophyll a und nur Spuren von Chlorophyll b. Granathylakoide in ihrer typischen Form sind noch nicht nachweisbar. Erste Überschiebungen der ge-schlossenen Primärthylakoide, die auf den Beginn der Granathyla-koidbildung hinweisen, lassen sich ultrastrukturell allerdings häufig nachweisen. Plastiden dieses Differenzierungsstadiums können beträchtliche photosynthetische CO<sub>2</sub>-Assimilation besitzen,

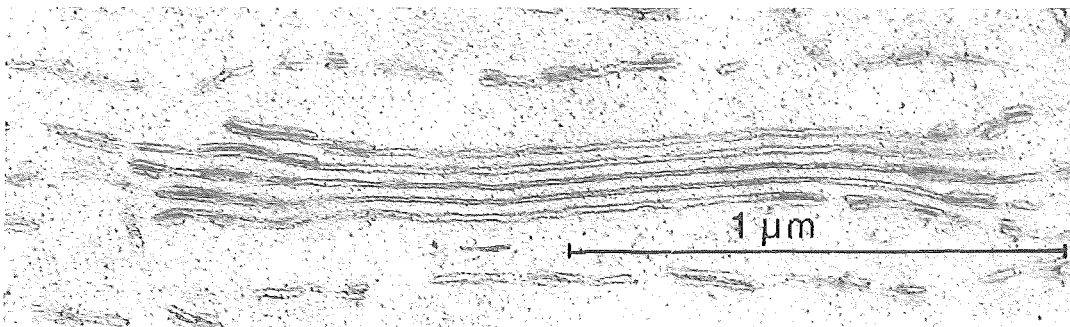
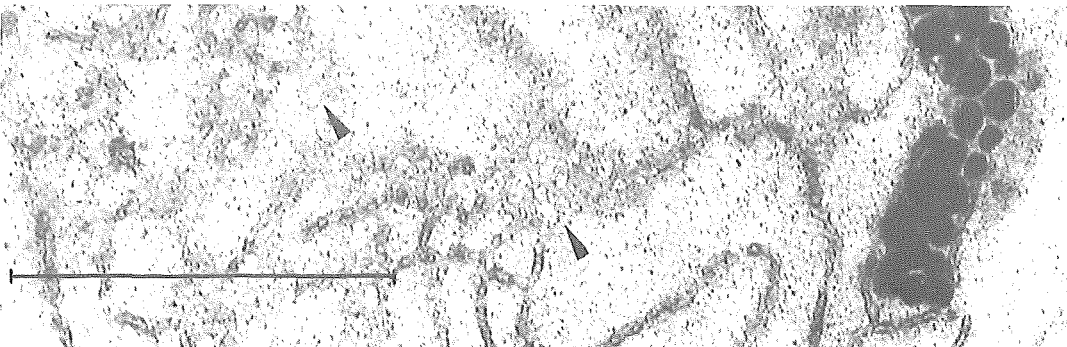
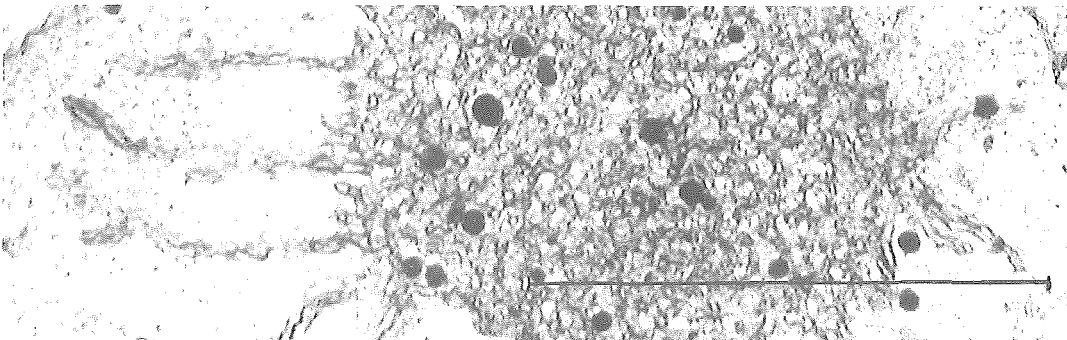
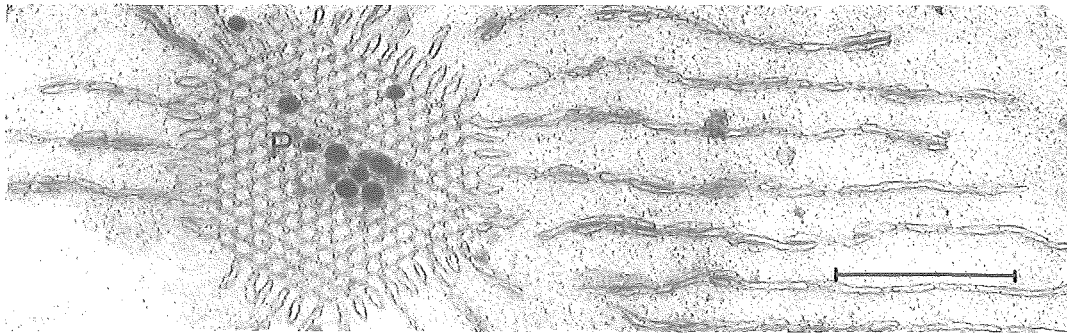


Abb. 4-7: Membranordnung in Plastiden der Primärblätter von *H. vulgare* nach verschiedenen Belichtungszeiten: 5 Minuten (Abb. 4), 30 Minuten (Abb. 5), 2 Stunden (Abb. 6) und 4 Stunden (Abb. 7)

ohne jedoch im Besitz von Granathylakoiden zu sein. Trotz quantitativer Unterschiede der  $^{14}\text{CO}_2$ -Einbaurate in die lösliche Gesamtfraktion - in bezug auf die Kontrollen - ist das qualitative Muster der  $^{14}\text{C}$ -markierten Intermediärprodukte bereits komplett ausgebildet (vgl. Kap. V).

Mit zunehmender Belichtungsdauer (6 Stunden) treten vereinzelte Granathylakoide auf, deren Zahl im weiteren Verlauf der log-Phase der Chlorophyllsynthese (8 und 12 Stunden Belichtungsdauer) ständig steigt (Abb. 8, 9). Die Grananeubildung, die Rate der Chlorophyllsynthese und der  $\text{CO}_2$ -Assimilation verlaufen in diesem Zeitraum in etwa parallel (Abb. 10, Tab. I).

Diese Resultate stimmen, was die strukturellen Veränderungen der Membranen während der Chloroplastengenese betrifft, weitgehend mit den Ergebnissen von MÜHLETHALER und FREY-WYSSLING (1959), EILAM und KLEIN 1962, ERIKSSON et al. 1961, GUNNING und JAGOE 1967, STETLER und LAETSCH 1969, WEYER et al. 1970) überein. Unterschiede in der Beurteilung des Erscheinungsbildes der perforierten Primärthylakoide und der Anordnung und Verschmelzung zu Vesikeln scheinen dabei fixationsbedingt ( $\text{KMnO}_4$  gegenüber Glutaraldehyd- $\text{OsO}_4$ ) und/oder eine Frage der, von den verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedlichen Lichtintensitäten für die Versuchsanstellung zu sein.

Daß die überwiegend Chlorophyll a-haltigen Plastiden mit Primärthylakoiden bereits photosynthetisch  $\text{CO}_2$  assimilieren können, wird durch die Untersuchungen von ARGYROUDI-AKOYUNOGLU und Mitarbeitern 1972, PHUNG NHU HUNG und Mitarbeitern 1970 b und REMY 1973 bestätigt. Danach ist das PS I in den Primärthylakoiden bereits photochemisch aktiv.

Während der lichtinduzierten Chloroplastengenese aus Etioplasten in *H. vulgare* treten zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien zwei fibrilläre Stromakomponenten unterschiedlicher Größe nach Glutaraldehyd-Osmium-Fixierung in Erscheinung. Der erste Typ fibrillärer Bündel zeigt im Längsschnitt eine deutliche Periodizität elektronentransparenter und elektronenstreuender Zonen (Abb. 11-13). Die Zahl der elektronenstreuenden Zonen schwankt in den Längsschnitten zwischen 6 - 10. Die Dicke der elektronen-

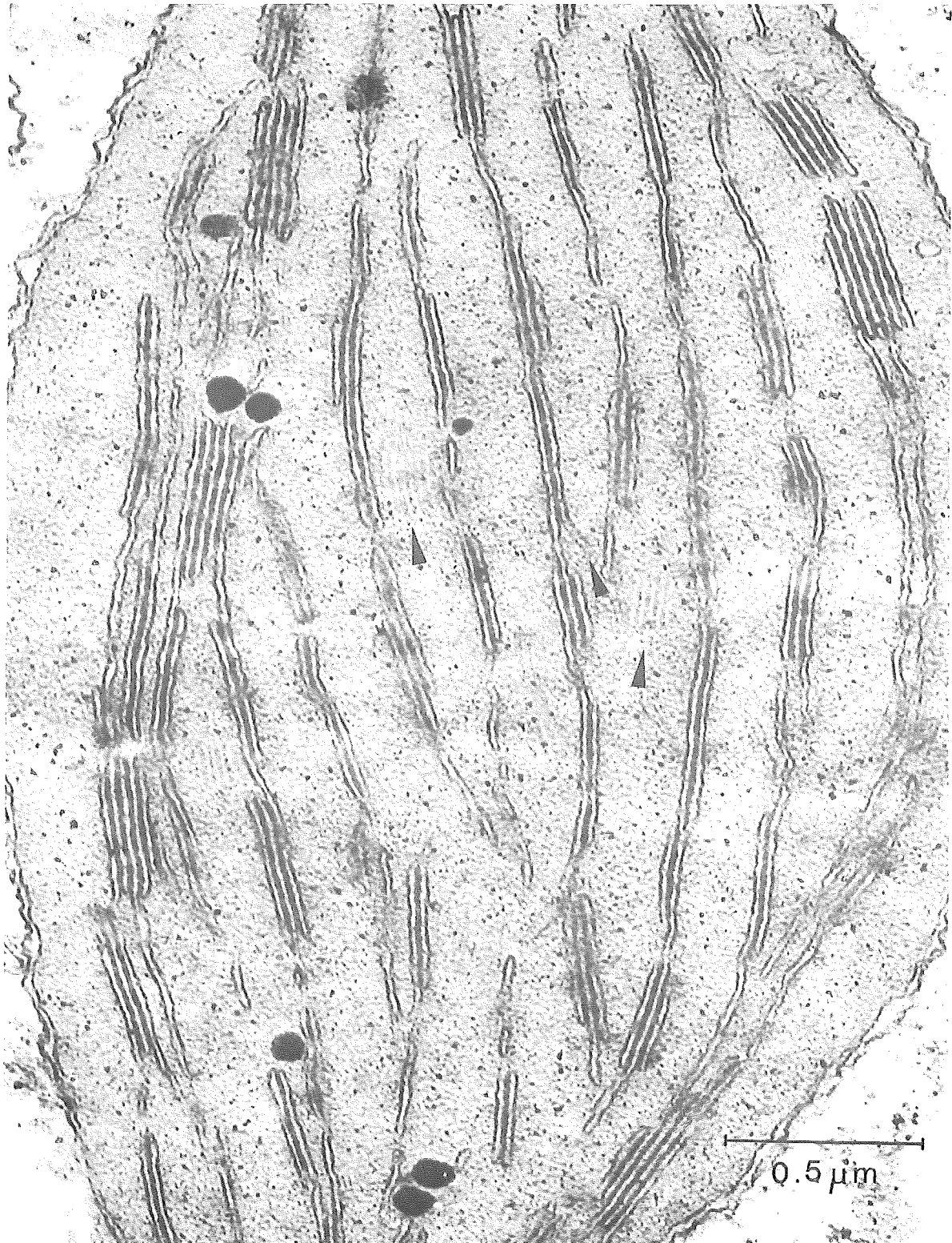


Abb. 8: Granathylakoidbildung in ergrünenden Plastiden von *H. vulgare* nach 8 Stunden Belichtung. Einige Granathylakoide sind 'offen' und scheinen Kontakt mit den fibrillären Bündeln des Stromas zu haben

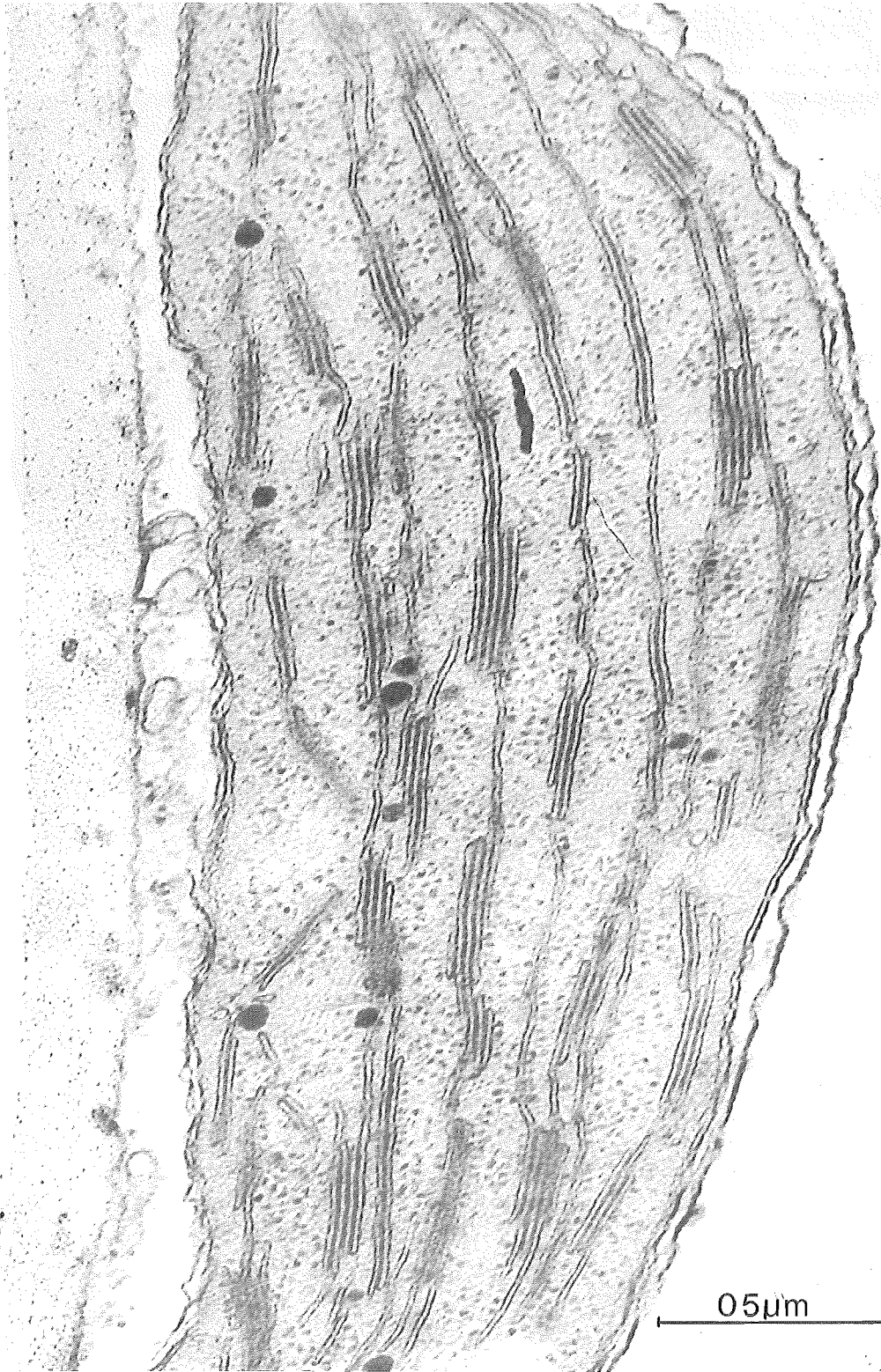


Abb. 9: Granathylakoidbildung in Plastiden während der log-Phase der Chlorophyllsynthese (Belichtungsdauer 12 Stunden)

streuenden Einzelfibrillen beträgt  $90 - 110 \text{ \AA}$ . Die elektronentransparente Zwischenzone ist  $165 \text{ \AA}$  breit. Die Länge der fibrillären Bündel variiert von  $0,1 - 2 \mu\text{m}$ . Größenordnungsmäßig sind die Maße der Einzelfibrillen und des Gesamtbündels mit dem von GUNNING (1965) beschriebenen Stromazentrum identisch. Das in Avena-Etioplasten auftretende Stromazentrum ist als kugeliges Bündelaggregat ausgeprägt, in Hordeum-Etioplasten dagegen als linear angeordnetes Bündel verbreitet (GUNNING et al. 1968).

Das Vorkommen dieses Typs von fibrillären Bündeln ist im wesentlichen auf Etioplasten und auf die Differenzierungsstadien der

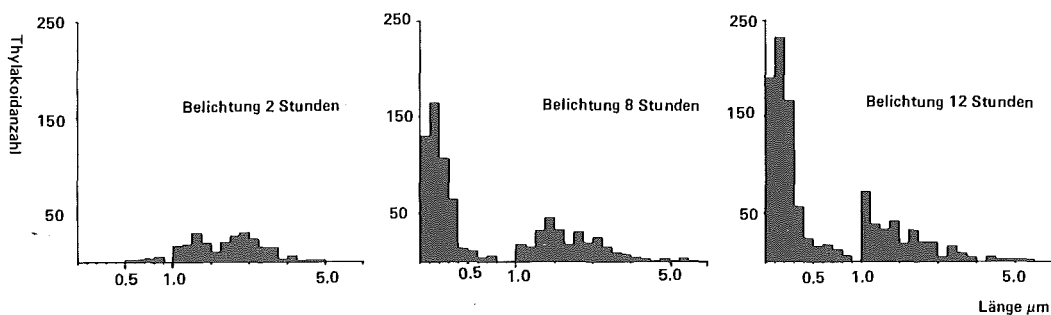


Abb. 10: Granathylakoidneubildung in Plastiden der Primärblätter von *H. vulgare* nach unterschiedlicher Belichtungsdauer

Plastiden in der lag-Phase der Chlorophyllsynthese beschränkt (Tab. II). Während der lichtinduzierten Umformung der Membranen des Prolamellarkörpers treten sie bevorzugt an der Peripherie der Prolamellarkörper auf. Es ist möglich, daß sie direkt oder indirekt am Prozeß der Bildung von perforierten Membranen beteiligt sind (Abb. 14).

Ihr Vorkommen im Plastidenstroma ist ebenfalls noch bei der weiteren Umbildung der perforierten Thylakoide in geschlossene Primärthylakoide nachweisbar. Die Schichtebenen sind parallel

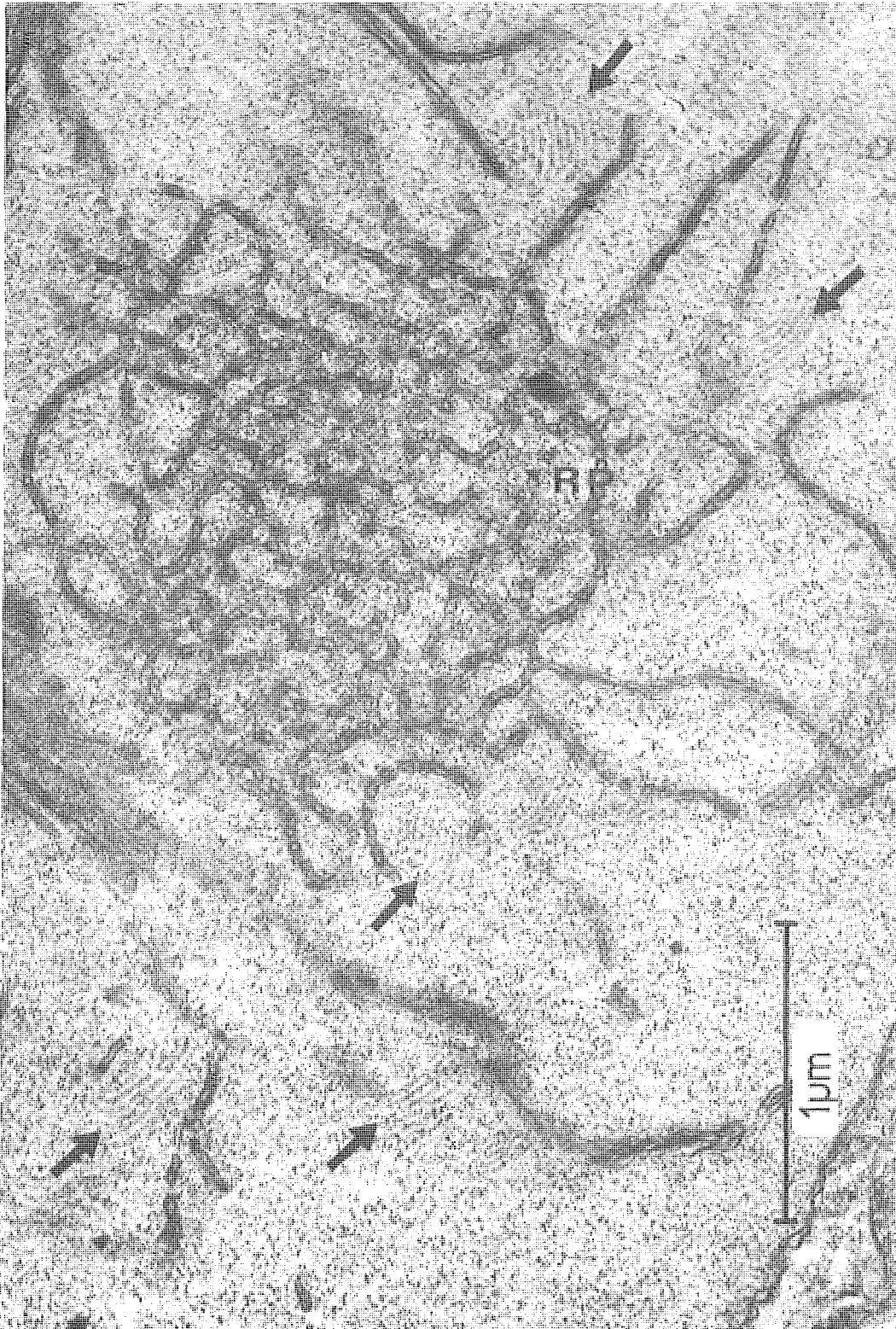


Abb. 11: Fibrilläre Bündel im Plastidenstroma von *H. vulgare*. Der (Rest-)Prolamellarkörper hat seinen kristallinen Aufbau verloren. Die Fibrillen befinden sich an der (Rest-)Prolamellarkörper-Peripherie auf den meist tangential angeschnittenen perforierten Primärthylakoiden

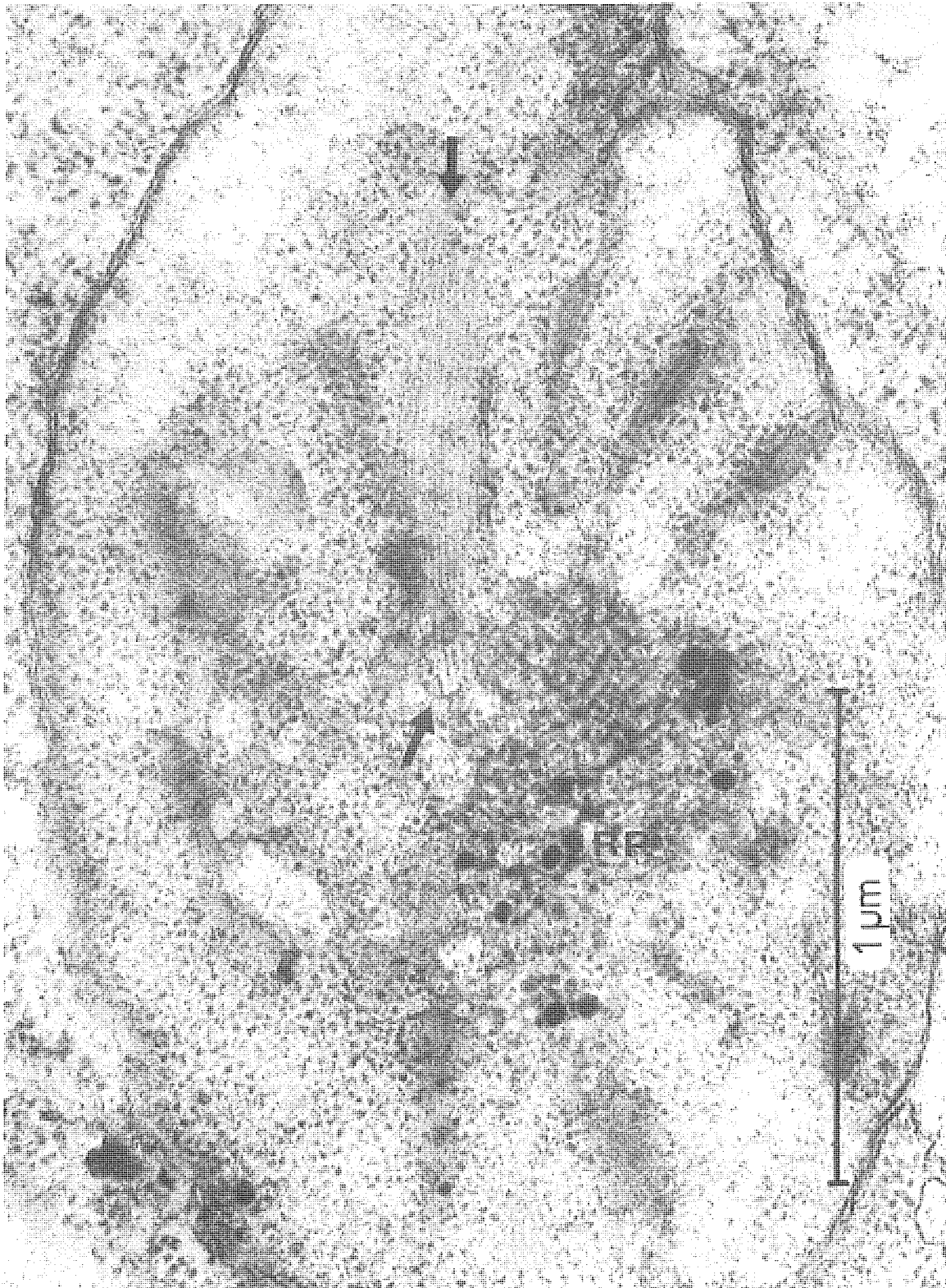


Abb. 12: Längsschnitt durch ein fibrilläres Bündel (Typ I) im Stroma einer Plastide von *H. vulgare* (Belichtungsdauer 2 Stunden). Die Fibrillen scheinen Kontakt mit dem (Rest-)Prolamellarkörper zu haben

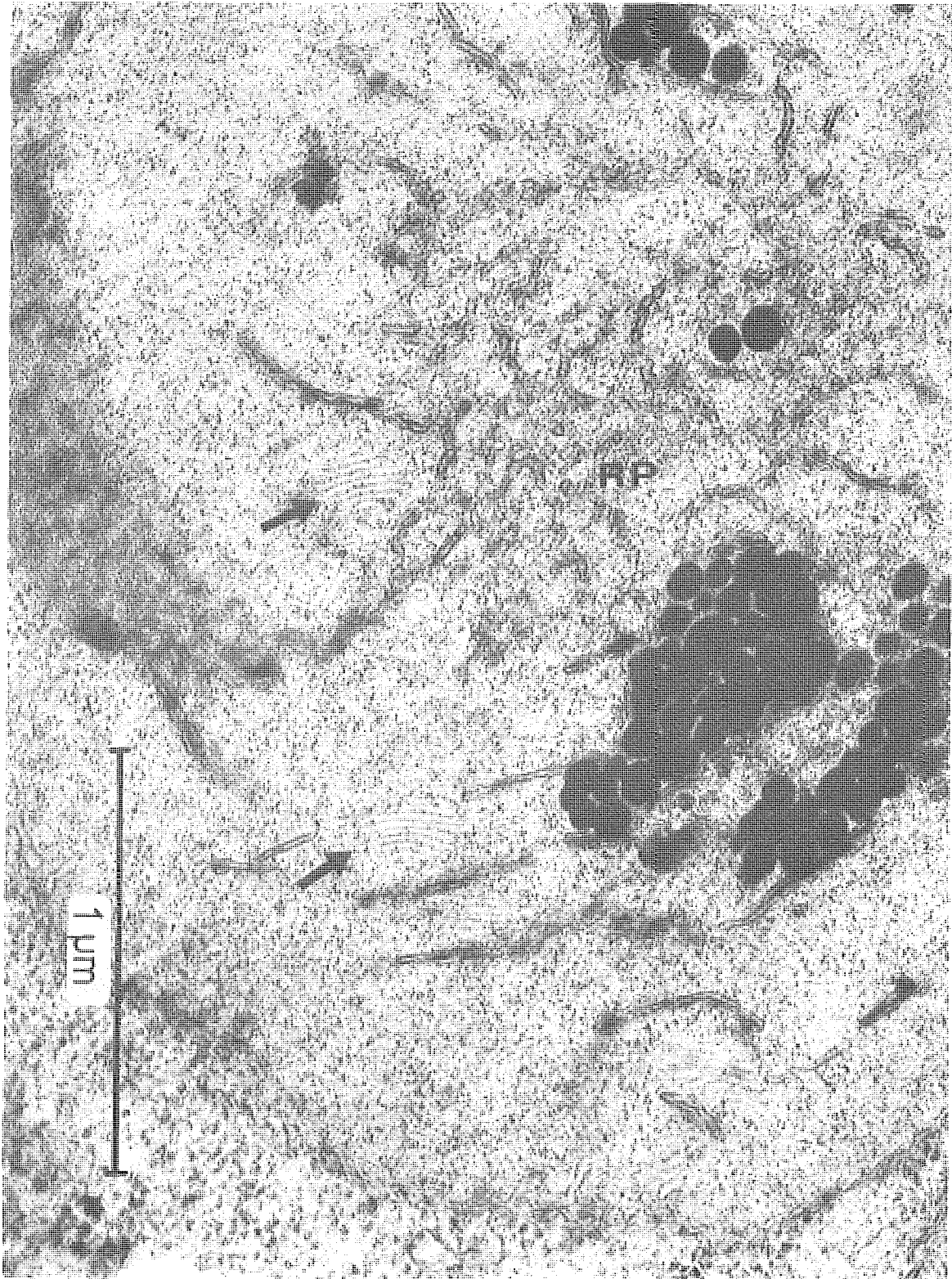


Abb. 13: Fibrilläre Bündel während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese an der Peripherie des (Rest-)Prolamellar-körpers

zu den Primärthylakoiden ausgerichtet.

Mit dem Beginn der log-Phase tritt eine weitere fibrilläre Stromakomponente in Erscheinung. Sie ist in dieser Form während der Bildung der Primärthylakoide nicht nachweisbar. Ihre Existenz fällt mit dem Auftreten erster Vorstufen von Granathylakoiden und von Granastapeln zu Anfang und während der log-Phase der Chlorophyllsynthese zusammen.

Im Gegensatz zum Aufbau der Einzelfibrillen des oben beschriebenen Typs (I) sind die Fibrillen dieses Typs (II) aus mit  $\text{OsO}_4$ -kontrastierbaren, zentralen, offenen Röhren aufgebaut (Abb. 15, 17). Ein Bündel setzt sich aus einer variablen Zahl von Einzelsträngen (20 - 60) zusammen. Im Querschnitt besteht ein Einzelstrang aus einem elektronendichten, röhrenförmigen Zentralstück ( $\varnothing 110 \text{ \AA}$ ), das ein elektronentransparentes Lumen ( $\varnothing 30 \text{ \AA}$ ) umgibt und von einer durch  $\text{OsO}_4$  nicht kontrastierbaren peripheren Hülle umgeben ist (Wandstärke  $35 \text{ \AA}$ ). Die Einzelstränge sind im Bündel in hexagonal dichtester Packung gelagert und haben im Querschnitt kristallinen Bau (Abb. 15). Die optische Diffraktion von elektronenmikroskopischen Mikrographien der quergeschnittenen Bündel bestätigt den Aufbau aus Einzelfibrillen mit hexagonal dichtester Lagerung (Abb. 15). Die Länge der fibrillären Bündel ist variabel. Es wurden Längen von  $0,5 \mu\text{m}$  bis zu einigen  $\mu\text{m}$  gefunden.

In einer früher veröffentlichten Arbeit hatten wir auf die mögliche Beteiligung dieses Typs an der de novo-Bildung der Grana hingewiesen (SPREY 1968). Für diese Annahme sprechen:

- der direkte Kontakt der elektronendichten Zentralstücke der Einzelfibrillen mit den offenen, kurzen Granathylakoiden zu Beginn und während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese (Abb. 8, 16). In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß Plastiden dieser Entwicklungsstadien nur nach Glutaraldehyd- $\text{OsO}_4$ -Fixierung an den Peripherien ihrer Thylakoide häufig offen sind (Abb. 8). Das bedeutet, daß ein Kontakt der beiden offenen Systeme möglich ist;
- ihr Auftreten während der log-Phase der Chlorophyllsynthese (Tab. II).

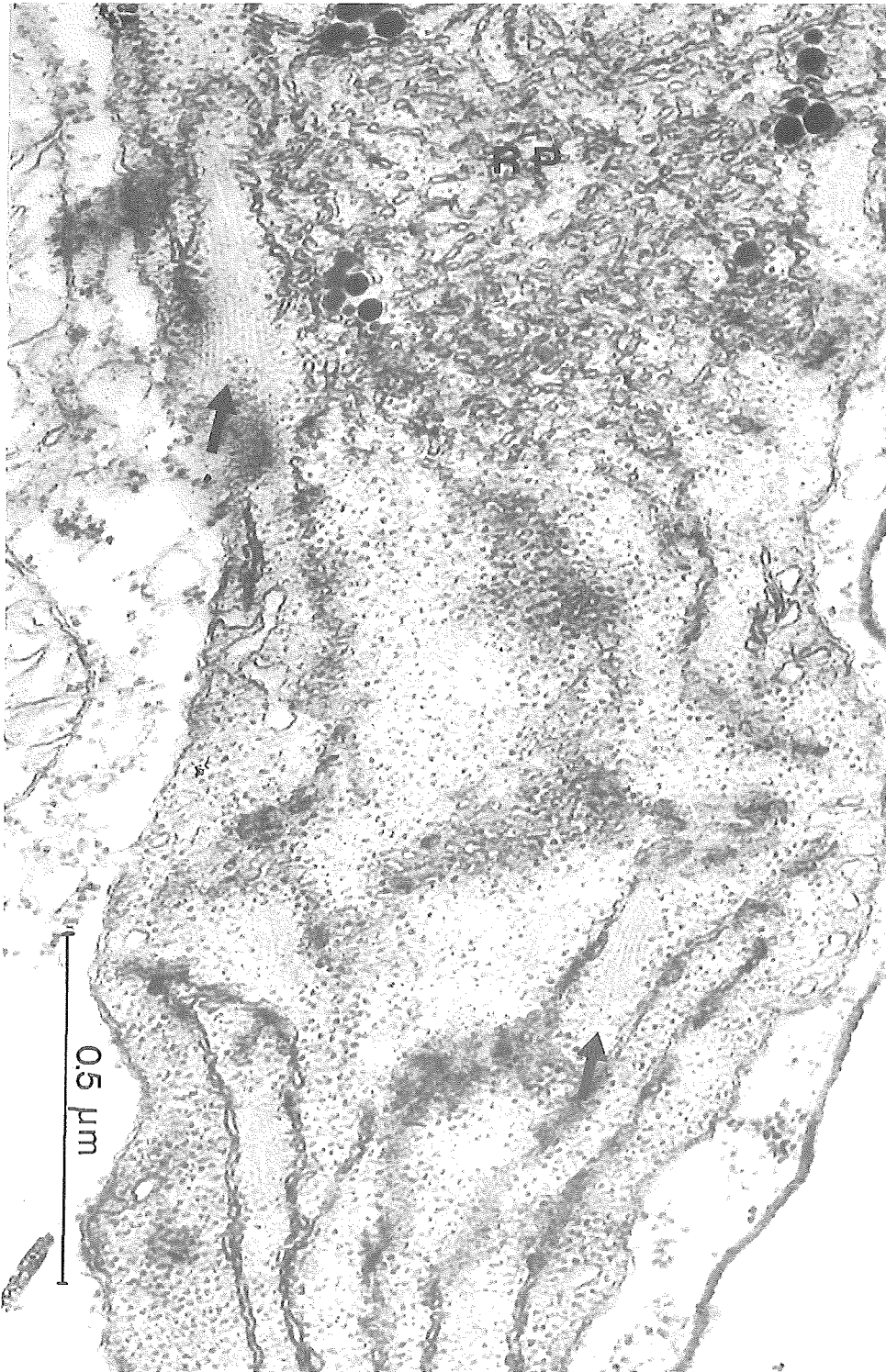


Abb. 14: Fibrilläre Bündel (Typ I) im Plastidenstroma von *H. vulgare* während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese (Belichtungsdauer: 1 Stunde). Der (Rest-)Prolamellar-körper hat seinen kristallinen Aufbau verloren. Die Schichtebenen der Fibrillen verlaufen parallel zu den Primärthylakoiden

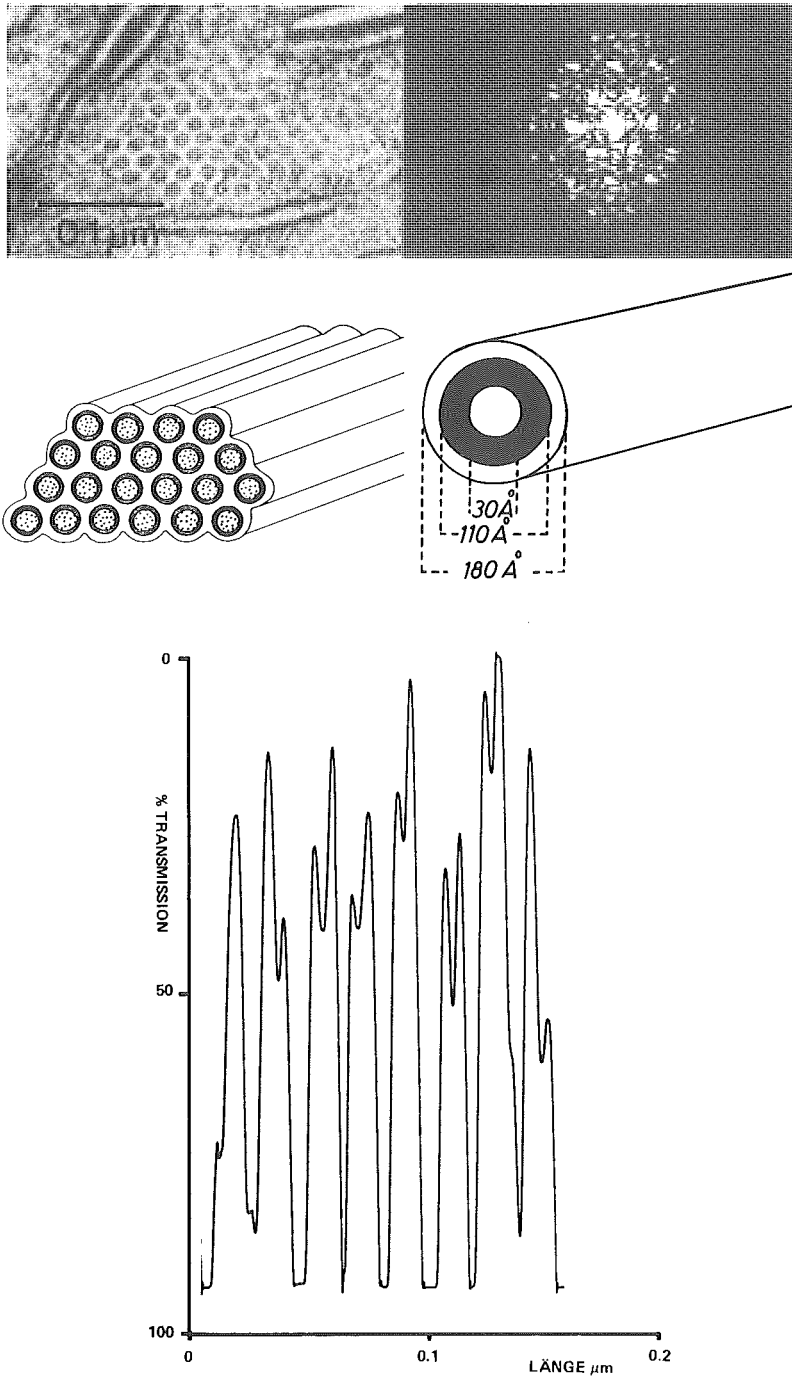


Abb. 15: Aufbau, Größe, Anordnung und Modell der fibrillären Stromakomponente (Typ II). Die optische Transformation der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Bündelquerschnitts (oben) verdeutlicht die hexagonale Anordnung der röhrenförmigen Zentralstücke. In den Densitogrammen durch die Schichtebenen ist der regelmäßige Aufbau der Einzelfibrillen (kontrastarme Peripherie; röhrenförmiges, elektronenstreuendes Mittelstück, transparentes Lumen) zu erkennen

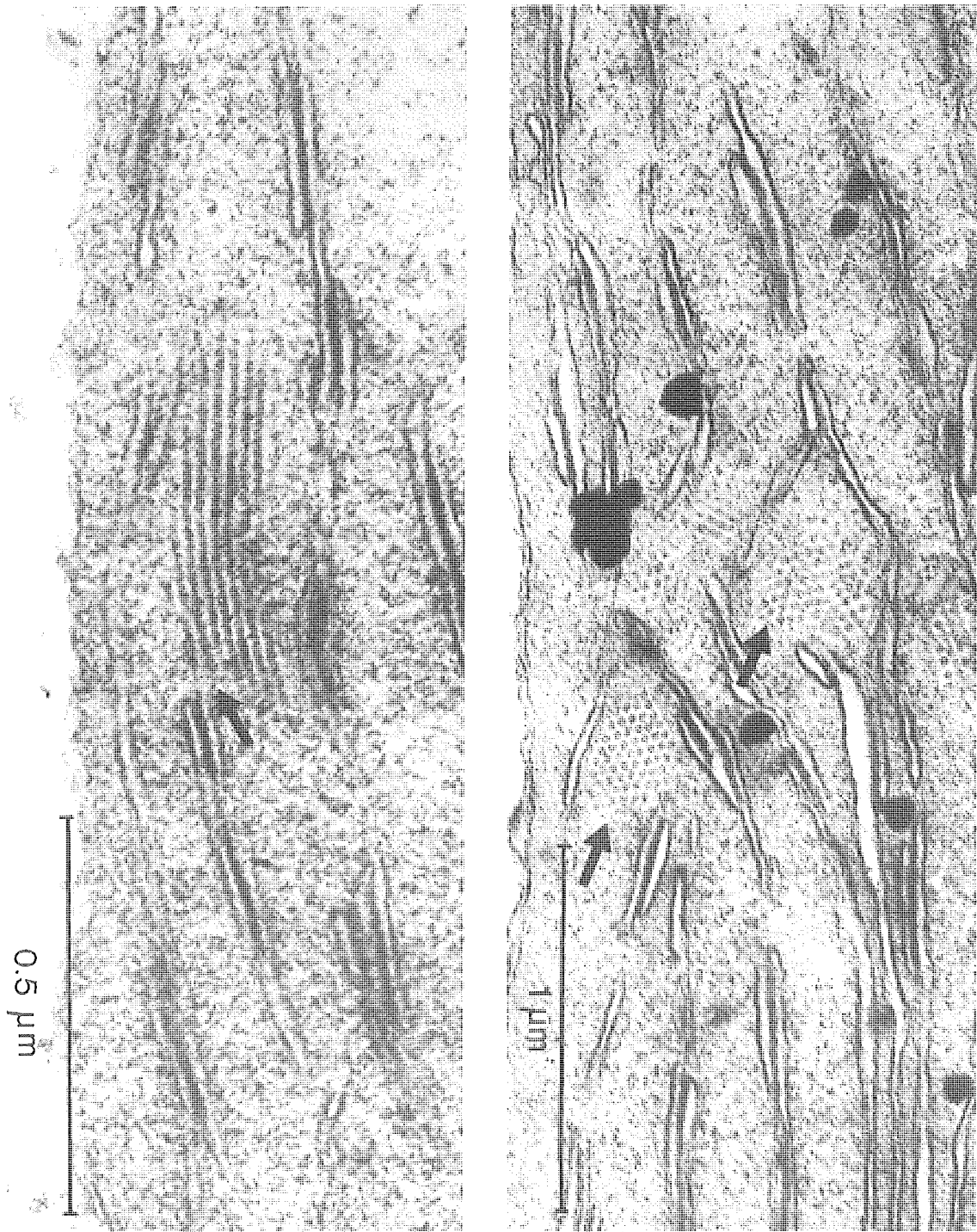


Abb. 16, 17: Fibrilläre Bündel (Typ II) im Plastidenstroma (log-Phase der Chlorophyllsynthese) im Längsschnitt (links) und Querschnitt (rechts). Die Fibrillen haben Kontakt mit den Thylakoiden während der Granathylakoidbildung. Der röhrenförmige Aufbau der Einzelfibrillen ist im Querschnitt erkennbar

Tab. II

Membranbildungsprozesse und Vorkommen fibrillärer Strukturen im System Etioplast → Chloroplast

Belichtungsdauer (Std.)	Chl.	<sup>14</sup> C-Ass.	Prolamellarkörpertransformation				Fibrillen Ø							
			"tube transformation"			"vesicle dispersal"	Stroma-thylakoide	Granabildung		110 Å	180 Å			
0	0.0	0.2	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	+	+
30'	0.0	0.2	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
1	0.1	0.3			+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
2	3.9	0.9						+	+	-	-	(+)	+	(+) +
4	8.5	4.9						(+)	+	+	-	-	+	+
6	14.9	10.0						+	+			+	+	+
8	17.0	15.8						+	+	+	+	+		+
10	20.2	23.0						+	+	+	+	+		+
12	35.5	40.0						+	+	+	+	+		(+)

Um zu zeigen, ob beide Bündeltypen Stromakomponenten bzw. membranassoziierte Bestandteile sind, wurden Plastiden aus der lag- und log-Phase der Chlorophyllsynthese isoliert (vgl. Kap. VIII), mit 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2) dreimal gewaschen und das Membranpellet auf Amoniumacetat gespreitet und unter einem Winkel von  $6^{\circ}$  Pt-C-kegelbedampft (Abb. 18, 19).

Es zeigte sich, daß in den Aufsichten eindeutig die lineare Anordnung dieser röhrenförmigen Strukturen nachweisbar war. Beide in den Ultradünnschnitten nachgewiesenen Bündeltypen ließen sich auch nach dieser Methode größenordnungsmäßig unterscheiden (Abb. 18, 19). Es liegt nahe - aufgrund der Präparationsmethode - anzunehmen, daß die Fibrillen mit den Thylakoiden zumindest oberflächlich assoziiert sein müssen. Andererseits wäre auch denkbar, daß sie integrierte Bestandteile der Thylakoidmembran selbst sind.

Unter den Bedingungen der Kegelbedampfung unter flachen Winkeln ( $6^{\circ}$ ) kann die aufgedampfte, elektronenstreuende Pt-C-Schicht nur auf den Kuppen der parallel verlaufenden Stränge abgelagert werden. Der Mittelpunktsabstand zweier benachbarter Fibrillen beträgt  $320 \text{ \AA}$ . Der um den Faktor 2 gegenüber den Verhältnissen in Ultradünnschnitten vergrößerte Mittelpunktsabstand kann durch die Präparationsbedingungen beim Spreiten sowie beim Antrocknen der Membranen auf Formvar-Trägerfolien artefiziell bedingt sein. Andererseits wäre denkbar, daß diese Mittelpunktsabstände den Verhältnissen in vivo entsprechen. In diesem Fall müßte ein Mischtyp von verschmolzenen, abgeflachten Tubuli und von Membranen vorliegen, wie er von WELLBURN und WELLBURN (1972) für Avena beschrieben worden ist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß während der Thylakoidgenese zwei fibrilläre Strukturkomponenten des Stromas von unterschiedlicher Größe an der Entwicklung der Thylakoide beteiligt sind. Wahrscheinlich wird der kleinere Fibrillentyp ( $\emptyset 90 - 110 \text{ \AA}$ ) in die Stromathylakoide eingebaut, während die größeren Fibrillen ( $\emptyset 180 \text{ \AA}$ ) in die Granathylakoide integriert werden.

Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung der von WELLBURN und WELLBURN (1972) gefundenen

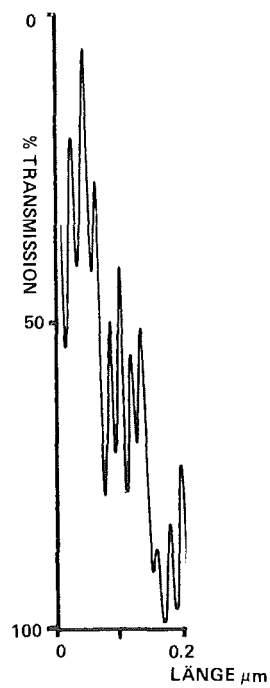
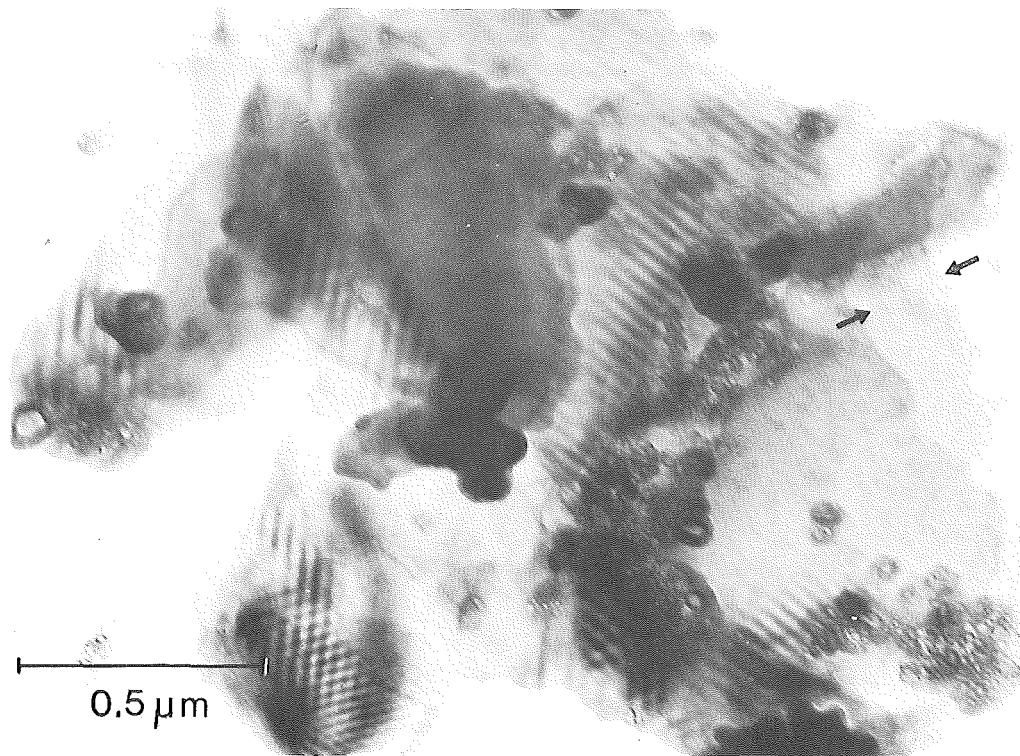


Abb. 18: Thylakoidmembranen aus isolierten Plastiden während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese. Die Membranen wurden unter  $6^{\circ}$  Pt-kegelbedampft. Die Breite beider Tubulitypen wurde densitometrisch ermittelt (unten)

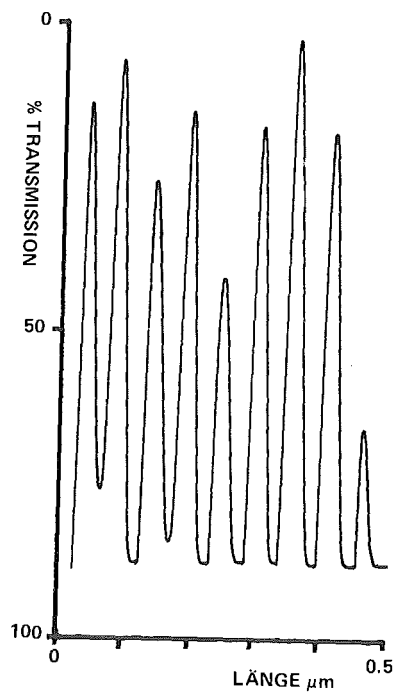
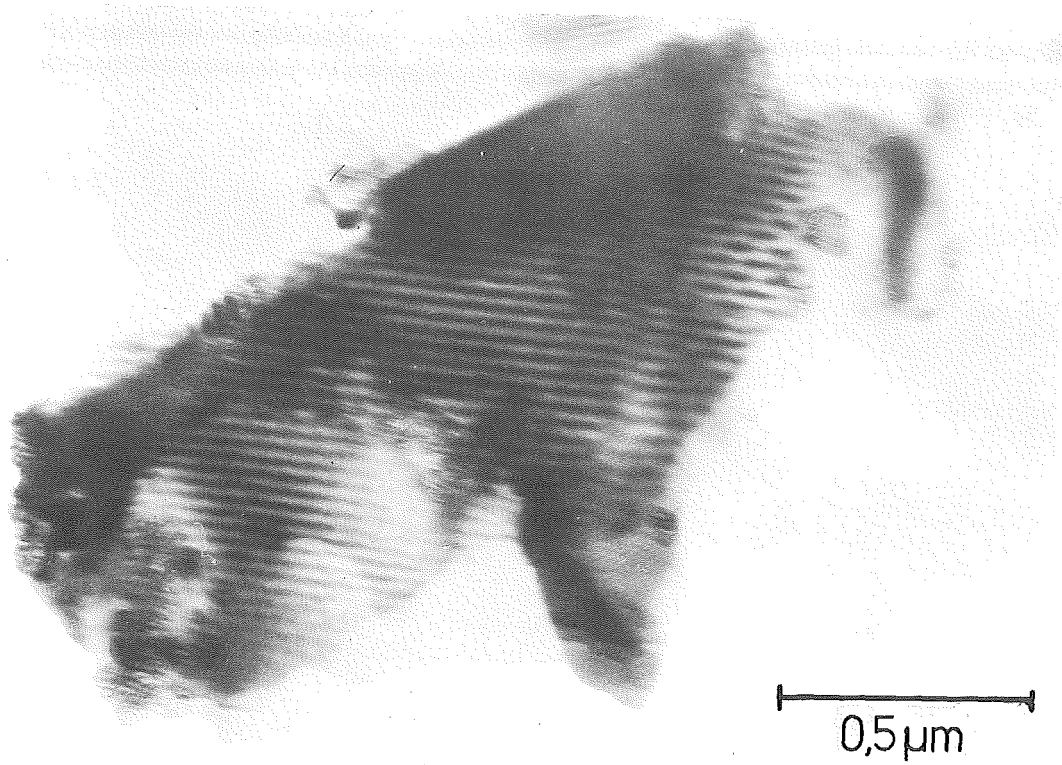


Abb. 19: Thylakoidmembranen aus isolierten Plastiden in der log-Phase der Chlorophyllsynthese. Präparation vgl. Abb. 18

Resultate und anderer Strukturanaloga (de GREEF et al. 1971) soll an anderer Stelle erfolgen.

In diesem Zusammenhang sollte aber darauf hingewiesen werden, daß beide Fibrillentypen in den Plastiden von *H. vulgare* unter natürlichen Entwicklungsbedingungen auftreten. Eine künstliche Induktion fibrillärer Plastideneinschlüsse, die wiederholt beschrieben wurde (vgl. SPREY 1968) oder die durch Welken oder durch Saccharose-Applikation induziert werden kann (GUNNING et al. 1968, WRISCHER 1972) ist hier auszuschließen.

Darüber hinaus wird an anderer Stelle auf die durch Gefrierätzung erhaltenen Strukturmerkmale der Membranen von Etioplasten und Chloroplasten eingegangen (Abb. 20, 21). Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden mit dem subunit-Modell der Thylakoide (PARK und PON 1961), dem Lipidmatrix-Modell (MÜHLETHALER et al. 1965, BRANTON und PARK 1967, ARNTZEN et al. 1969, MILLER und STAEHELIN 1973) und dem Kreuz-Menke Modell (MENKE und KREUTZ 1962, vgl. KREUTZ 1972) von ausdifferenzierten Chloroplasten verglichen (SPREY, in Vorbereitung).

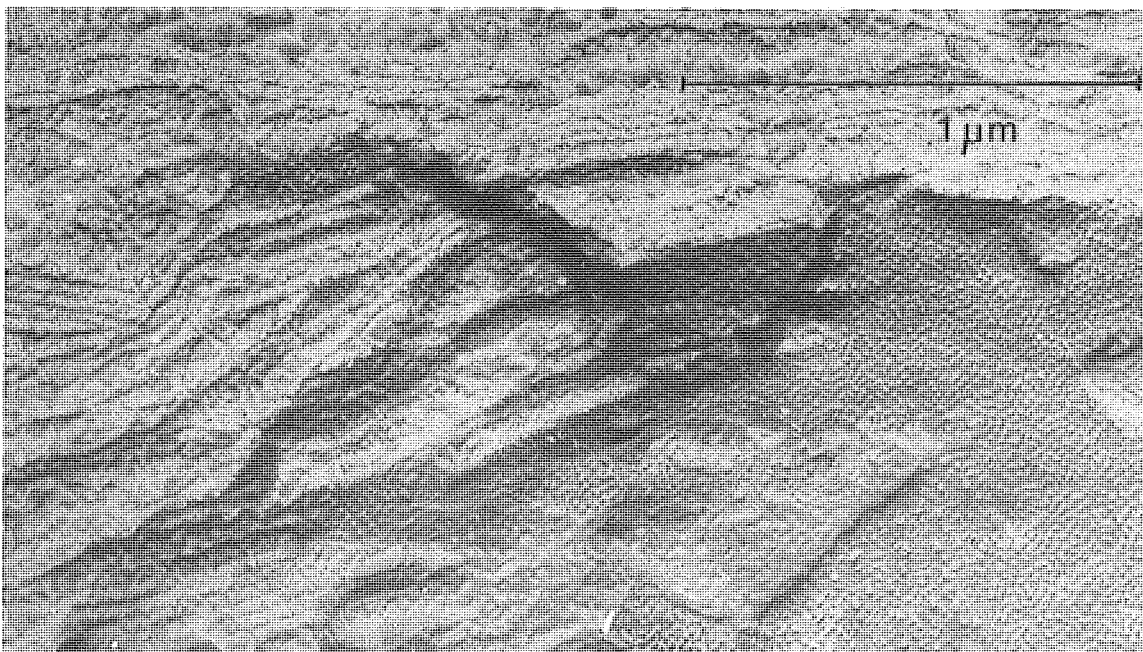
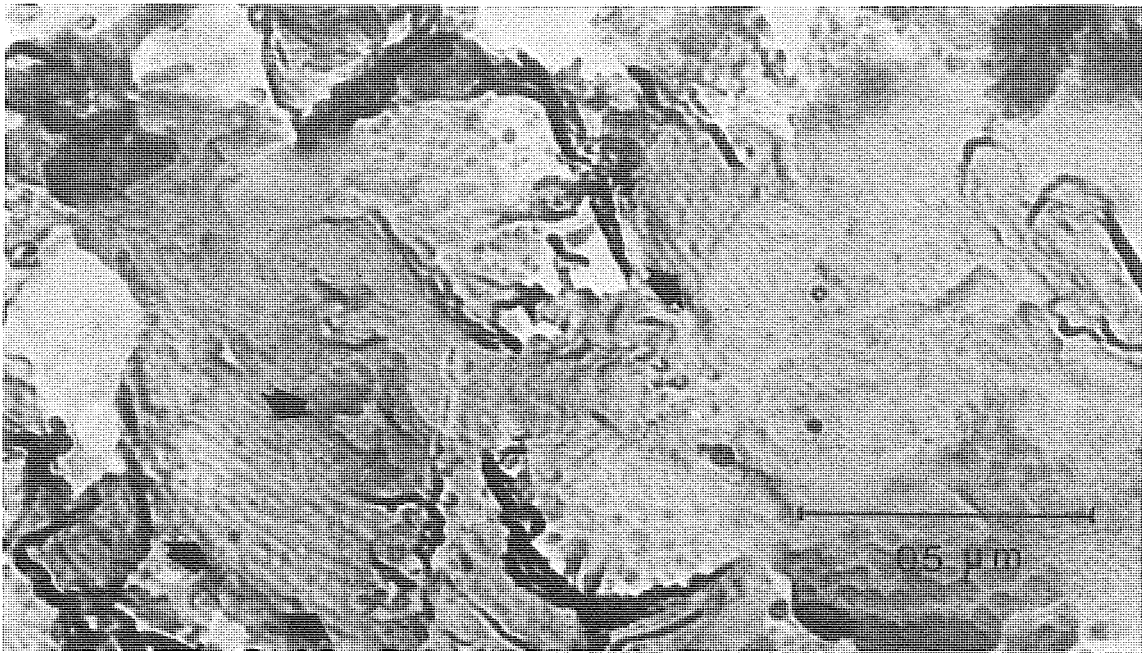


Abb. 20, 21: Gefrierätzabdrücke von Membranoberflächen aus Etio-  
plasten (oben) und Chloroplasten (unten) von *H.*  
*vulgare*. Die Plastiden wurden bei  $-196^{\circ}\text{C}$  fixiert  
und nach der Methode von MOOR und Mitarbeitern  
(1961) präpariert

#### IV. Membranproteine und Chloroplastenentwicklung

Die Frage, ob und inwieweit die Photokonversion des inneren Membransystems der Etioplasten während der Chloroplastenentwicklung mit einer qualitativen oder quantitativen Veränderung der Membranproteine korreliert ist, bleibt z.Z. aufgrund der aus der Literatur bekannten Ergebnisse noch offen. Es scheint plausibel, daß die lichtinduzierte Bildung von Primärthylakoiden in der lag-Phase der Chlorophyllsynthese keine Neusynthese, sondern eine Umorientierung der kristallin angeordneten Membransysteme der Prolamellarkörper ist. Die von GUNNING und JAGOE (1967) berechneten, weitgehend identischen Membranoberflächen der Prolamellarkörper und Primärthylakoide, sowie die von REMY (1973) durchgeführten Untersuchungen des Proteinmusters der Thylakoidmembranen aus den entsprechenden Differenzierungsstadien stützen diese Annahme.

Im weiteren Verlauf der log-Phase der Chlorophyllsynthese, die ultrastrukturell durch die Bildung von Granathylakoiden gekennzeichnet ist, soll im Falle von *Chlamydomonas* (OHAD et al. 1971, HOOBER et al. 1969, HOOBER 1972) eine de novo-Synthese, im Falle von *Triticum* nur eine quantitative Veränderung einzelner Membranproteine stattfinden (REMY 1973, REMY et al. 1972, PHUNG NHU HUNG et al. 1971). Alternativ zu diesen Ergebnissen wäre denkbar, daß qualitative und quantitative Unterschiede im Spektrum der Membranproteine aus Etioplasten und Chloroplasten vorhanden sind. So findet LÜRSEN (1971) in einer vergleichenden gelelektrophoretischen Untersuchung der Membranproteine von Etioplasten, ergrünenden Plastiden und Chloroplasten von *Zea mays* Unterschiede in der Bandenanzahl der einzelnen Differenzierungsstadien, wobei zwei dieser Proteine auf Grund kreuzreagierender Antigene mit Stromaproteinen identisch sind.

Die widersprüchlichen Ergebnisse von der Präexistenz der Membranproteine in Etioplasten und/oder die de novo-Synthese von Membranproteinen während der Chloroplastengenese dürfte sich vorwiegend durch Verwendung unterschiedlicher Extraktionspuffer, verschiedener Gelsysteme und erst sekundär durch artspezifische Unterschiede erklären lassen. So finden BRAUNITZER und BAUER-STÄB

(1969) in einer phylogenetischen Studie der Thylakoidproteine aus Grünalgen (*Chlorella*) und höheren Pflanzen (*Spinacia*, *Anthriscum*, *Lactuca* und *Hemerocallis*) keine Unterschiede im Bandenmuster der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine. Sie postulieren unter diesem chemotaxonomischen Aspekt eine einheitliche Verteilung der Proteinkomponenten in den Thylakoiden höherer Pflanzen, die sich jedoch von dem Proteinmuster der Lamellarproteine aus Prokaryonten (*Oscillatoria* und *Rhodospirillum rubrum*) unterscheiden.

Gebräuchliche Extraktionsmethoden und Gelsysteme zur Charakterisierung wasserunlöslicher Membranproteine von Thylakoiden verwenden den Zusatz des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bzw. Na-Benzol-Dodecylsulfonat (SDBS), das von SMITH und PICKELS (1941) zur Lösung unlöslicher Chloroplastenbestandteile erstmals gebraucht wurde. Lipidfreies, SDS-gelöstes Thylakoidprotein hat Sedimentationskoeffizienten von 2 - 5,5 S (BIGGINS und PARK 1965). SDS- oder SDBS-gelöstes Membranprotein ergibt in neutralen Gelsystemen 10 - 17 Proteinbanden (REMY 1973, MENKE und SCHÖLZEL 1971, MACHOLD 1971, LÜRSEN 1971, HERMANN 1972, LAGOUTTE und DURANTON 1971), deren relative elektrophoretische Beweglichkeit in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen umgekehrt proportional dem Logarithmus des Molekulargewichtes ist (SHAPIRO et al. 1967).

MENKE und SCHÖLZEL (1971) bestimmten aufgrund dieses Verhältnisses die Molekulargewichte von 16 Thylakoidproteinen durch Referenz mit Standardproteinproben zwischen  $7,5 - 11 \times 10^3$  Daltons.

In SDS-haltigen Gelsystemen lassen sich 4 - 5 chlorophyllhaltige Banden nachweisen (BAILEY et al. 1966), von denen zwei als Chlorophyll-Protein-Komplex Bestandteil des PS I und PS II sind (THORNER et al. 1967), während der Rest als freies Pigment vorliegt. Die Chlorophyll-Protein-Komplexe fehlen im Spektrum der Membranproteine aus Etioplasten (LÜRSEN 1971), in chlorotischen Plastiden nach Eisenmangel bzw. durch Inhibierung der Proteinsynthesen in Plastiden nach Behandlung mit Chloramphenicol, Streptomycin und Oxytetracyclin (MACHOLD 1971).

Ein weiteres, häufig verwendetes Lösungsmittel von Membranproteinen sind Phenol-Ameisensäure-H<sub>2</sub>O-haltige Solventien, die Membranproteine aus Chloroplasten (BRAUNITZER und BAUER 1967), aus Mitochondrien (SEBALD et al. 1968) und aus Erythrocyten (DEMUS und MEHL 1970) lösen. In Phenol-Ameisensäure-H<sub>2</sub>O-haltigen Flachgelen aus Polyacrylamid tritt bei der Trennung von Membranproteinen aus Chloroplasten eine schnell wandernde, blaugrüne Bande und eine gelbliche Bande mit geringer elektrophoretischer Mobilität auf: beide reagieren nicht mit Amidoschwarz. Zwischen diesen Pigmentbanden befinden sich im Falle der Eucaryonten drei von BRAUNITZER und BAUER-STÄB (1969) als  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Banden bezeichnete Proteine. Für Prokaryonten (Oscillatoria, Rhodospirillum, Rhodopseudomonas) scheint das Muster der gelelektrophoretisch getrennten Proteine weniger einheitlich zu sein (BRAUNITZER und BAUER-STÄB 1969, BIEDERMANN und DREWS 1968). Bei dem niedrigen pH-Wert des 'Phenolsystems' wird angenommen, daß Ladungsunterschiede ausgeglichen werden und daß die Trennung in Polyacrylamidgelen eher auf Molekularsiebeffekten als auf unterschiedlichen Ladungsverhältnissen beruht (vgl. DEMUS und MEHL 1970, THORUN 1971). BIEDERMANN und DREWS schätzen das Molekulargewicht der mit Phenol extrahierten Membranproteine von Rhodospirillum auf  $1 - 3 \times 10^5$  Daltons.

Im folgenden wird die gelelektrophoretische Trennung von Membranproteinen aus Etioplasten, ergrünenden Plastiden und Chloroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Schritten beschrieben. Zuerst wurden die gereinigten Thylakoide mit 8 M Harnstoff gelöst, Harnstoff-unlösliche Anteil wurde dann im 'Phenolsystem' solubilisiert. Ziel der Untersuchungen war, quantitative oder qualitative Unterschiede in den Elektropherogrammen getrennter Membranproteine aus unterschiedlichen Plastidendifferenzierungsstadien nachzuweisen.

Experimentell wurde dabei so verfahren, daß aus isolierten, gereinigten Plastiden (Kap. VIII) unterschiedlichen Differenzierungsgrades durch hypotonischen Schock und wiederholtes Waschen (bis 8x) und Zentrifugieren in destilliertem Wasser ein stromafreies Membransediment mit proteinfreiem Überstand gewonnen wurde. Der Überstand wurde auf das Vorkommen löslicher Proteine

überprüft (LOWRY et al. 1951). Das Sediment wurde in 8 M Harnstoff und der unlösliche Rückstand nach Waschen und Zentrifugieren in dest. H<sub>2</sub>O in Phenol-Ameisensäure-H<sub>2</sub>O gelöst. Anstelle der komplizierten Flachdiscelektrophorese in horizontaler Ebene verwendeten wir ein einfacheres Verfahren.

Dazu wurden die Polyacrylamidgele in Trennröhrchen (Ø 5 mm) wie üblich polymerisiert, nach der Polymerisation aus den Trennröhrchen entfernt und 24 Stunden im Phenol-Ameisensäure-H<sub>2</sub>O-System (2:1:1, w/v/v) äquilibriert. Die leicht gequollenen Gele wurden dann mit Unterdruck in Trennröhrchen aus Glas (Ø 6 mm) mit Hilfe eines Peleus-Balles gezogen und basal mit Dialysiermembran überzogen. Die Elektrodenpufferräume enthielten 10%ige Ameisensäure. Die Elektrophorese verlief vertikal in einer WTW-Trennapparatur (4 mA/Gel, 12 Stunden, 4°C). Die Anfärbung der Proteine erfolgte in 1%igem Amidoschwarz 10 B in 7,5%iger Essigsäure. Zur Auswertung der Elektropherogramme wurde die Absorption im Falle der angefärbten Gele bei 620 nm, im Falle der ungefärbten Gele bei 280 nm vermessen (Chromoscan, Firma Joyce und Loeb1). Die Berechnung der Molekulargewichte im 'Phenolsystem' geschah nach den bei THORUN (1971) angegebenen Bedingungen unter Verwendung von Eichproteinen der Fa. Boehringer (Combithek, Cytochrom c M.W. 13500; Chymotrypsinogen A M.W. 25000, Ovalbumin M.W. 45000, Rinder Serumalbumin M.W. 67000, Aldolase M.W. 147000, Catalase M.W. 240000, Ferritin M.W. 540000).

Primärblätter 7 Tage alter, etiolierter Gerste (var. 'Bido) wurde oberhalb der Coleoptile bei schwachem Grünlicht abgeschnitten und in 3 Proben im Gewichtsverhältnis 6:4:1 aufgeteilt und anschließend belichtet. Neben der Dunkelkontrolle erfolgte eine 4-Stunden-Belichtung und 12- bzw. 24-Stunden-Belichtung mit 2 500 Lux (Osram - L - Fluora 40 W/77) bei 21°C. Das kleingeschnittene Blattmaterial (1 cm Stücke) wurde mit der doppelten Gewichtsmenge an 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7.2), der 0,5 M Saccharose und 0,01 M. Mercaptoäthanol enthielt, im Omnimixer (Fa. Sorvall) 2 x 15 Sekunden mit 12000 Upm homogenisiert und die Plastiden im diskontinuierlichen Saccharosegradienten isoliert (vgl. Kap. VIII) und die Membranproteine extrahiert. Alle Präparationsschnitte erfolgten bei 4°C.

Bei Verwendung des von NEVILLE (1967) angegebenen Gelsystems (8 M Harnstoff, pH 5,1), das von BIEHL (1971) zur Trennung membranassoziierter Proteine aus Ultraschall-desintegrierten Thylakoidfraktionen von Chloroplasten verwendet wurde, ließen sich nach Amidoschwarz-Anfärbung 11 - 13 Proteinbanden reproduzierbar trennen (Abb. 22). Gemeinsam traten nach elektrophoretischer Auftrennung der membranassozierten Proteine im 7,5%igen Gel in allen untersuchten Entwicklungsstadien die Proteinbanden 1 - 3 und 5 - 10 sowie 13 auf. Die in der Dunkelkontrolle und in den ergrünenden Etioplasten nach Amidoschwarz-Färbung nur schwach ausgeprägte Bande 4 ließ sich nicht in der Trennung der Membranproteine aus Chloroplasten nachweisen. Ob es sich um ein für Etioplasten und für ergrünende Etioplasten-Thylakoide typisches Protein handelt, ist fraglich. Unklar ist, ob es sich im Falle der 12-Stunden-Probe bei den Banden 11 und 12 um nur zwei getrennte Proteine handelt und ob das Auftreten zusätzlicher, schwach ausgeprägter Peaks (Banden 14 und 15) mit dem Vorkommen weiterer Proteine während der Chloroplastenentwicklung erklärt werden kann. Weiter ließen sich bei der gelelektrophoretischen Trennung der Membranproteine aus Chloroplasten die Banden 11 und 12 auch optisch sicher nachweisen, während dies nach den Trennungen der Etioplasten-Proteine und der Proteine aus ergrünenden Etioplasten nicht der Fall war. Weiterhin ist auch die deutliche Verstärkung der Bande 10 in der für 12 Stunden belichteten Probe zu beachten, die auf eine vermehrte Synthese dieses Proteins hinweisen kann.

Während sich die relativen Konzentrationen der einzelnen Proteinbanden bei den pufferlöslichen, gesamten Proteinen aus Blättern mit verschiedenen Differenzierungsstadien der Plastiden nur wenig änderten, konnten bei den membranassozierten Proteinen mit fortschreitender Differenzierung von Etioplasten zu Chloroplasten zum Teil merkliche Unterschiede in den relativen Konzentrationen einzelner Proteinbanden festgestellt werden. Daraus kann auf eine Veränderung der quantitativen Zusammensetzung der membranassozierten Proteine in den verschiedenen Differenzierungsstadien geschlossen werden. Möglicherweise sind auch qualitative Veränderungen des Proteinspektrums vorhanden, doch ließen

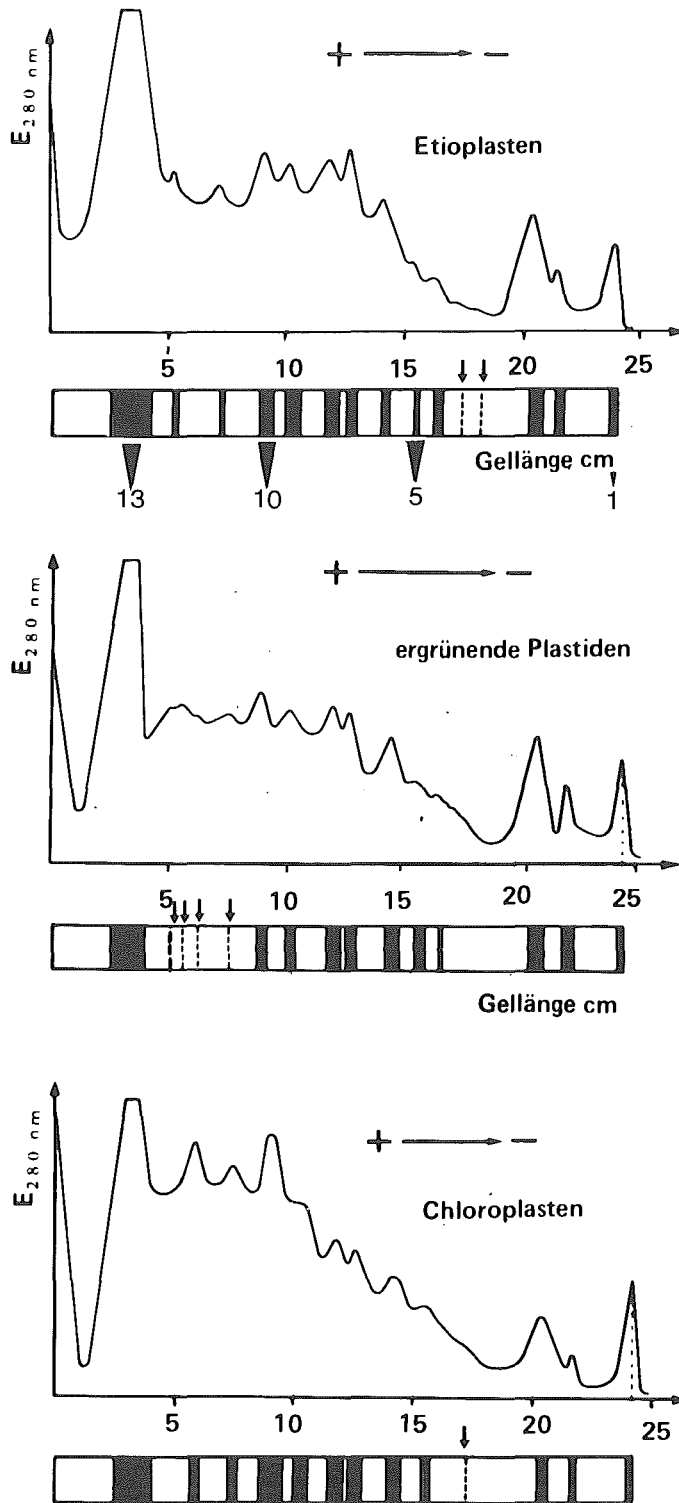


Abb. 22: Elektropherogramme membranassoziierter Proteine von Thylakoidmembranen aus Plastiden unterschiedlicher Differenzierung (Gelkonzentration 7,5% Polyacrylamid in 8 M Harnstoff, pH 5,1). Die Abzisse wurde im Maßstab 1:3 gestreckt

sich diese mit optischen Nachweismethoden nicht eindeutig identifizieren.

Dieses Ergebnis bestätigt im wesentlichen das von REMY (1973) gefundene Resultat. Danach existieren im Muster der Proteinbanden der Elektropherogramme von Polypeptiden aus Etioplasten, ergrünenden Plastiden und Chloroplasten keine qualitativen, sondern nur quantitative Unterschiede. Mit Beginn der linearen Phase der Chlorophyllsynthese setzt eine starke Nettozunahme der überwiegend Chlorophyll a-haltigen Proteinbande ein (M.W. 70 000, REMY 1973; M.W. 50 000 LAGOUTTE und DURANTON 1971), die als Bestandteil des Photosystems I (PS I) aufgefaßt wird (PHUNG NHU HUNG et al. 1971, REMY 1972). Intermittierende Blitzlichtgabe, die den Prolamellarkörper in Primärthylakoide umwandelt, ohne eine Granathylakoidbildung zu induzieren (SIRONVAL et al. 1968), und die selektiv die Synthese von Chlorophyll a bewirkt, ist mit einer Zunahme des, dem PS I zugerechneten, Pigment-Proteinkomplexes verbunden, der präparativ an Hydroxylapatit-Säulen oder analytisch in Polyacrylamidgelen getrennt werden kann (AGYROUDI und AKOYUNOGLU et al. 1972, REMY 1973).

Mit dem weiteren Verlauf der linearen Phase der Chlorophyllsynthese erfolgt parallel zur Granabildung die Zunahme der überwiegend Chlorophyll b-haltigen Proteinbande (M.W. 25 000, LAGOUTTE und DURANTON 1971; M.W. 23 500, REMY 1973), die als Bestandteil des PS II angesehen wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen entsprechender Differenzierungsstadien deuten darauf hin, daß Blitzlicht-gepulste, ergrünende Plastiden nur Chlorophyll a-reiche Proteinkomplexe des PS I besitzen (ARGYROUDI-AKOYUNOGLU et al. 1972), während die Nettozunahme des zum PS II gehörenden Chlorophyll-Proteinkomplexes später parallel zur Granathylakoidausbildung verläuft (REMY 1973).

Die Versuche von REMY und Mitarbeitern (1972) zeigen, daß in Plastiden mit Primärthylakoiden nur die cyclische Phosphorylierung vorliegt. Das läßt vermuten, daß nur das PS I funktioniert und das PS II noch nicht oder in einer möglicherweise inaktiven Form vorliegt. Diesen zeitlich aufeinanderfolgenden Aktivitäten des PS I und PS II entspricht die räumliche Verteilung der PS I-

und PS II-haltigen Partikel in den Thylakoiden von Chloroplasten (ARNTZEN et al. 1969) nach der Vorstellung von PARK und Mitarbeitern (SANE, PARK und GOODCHILD 1970, GOODCHILD und PARK 1971). Mit Hilfe der French-Press fraktionierte PS I-haltige Partikel sind überwiegend in den Stromathylakoiden, PS I- und PS II-haltige Partikel vornehmlich in den Granathylakoiden lokalisiert. Untersuchungen von BOARDMAN und HIGHKIN (1966), GOODCHILD et al. (1966) und HOMANN und SCHMID (1967) an Chlorophyll b-defekten Mutanten zeigen, daß Granathylakoide für die PS II-Aktivität notwendig sind.

Granalose Chloroplasten der Bündelscheiden von  $C_4$ -Pflanzen sollen keine PS II-Einheiten und kein PS II-Fluoreszenz-Signal enthalten (WOO et al. 1970). Ergrünende Plastiden von *Pisum* oder *Hordeum*, die keine oder nur wenige Granathylakoide besitzen (BOARDMAN et al. 1971, GYLDENHOLM und WHATLEY 1967) haben nur PS I-Aktivität. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Membranoberflächen aus Etioplasten zeigen nur 60 - 120 Å große Partikel (PHUNG NHU HUNG et al. 1970), die nach ARNTZEN, DILLEY und CRANE (1969) mit dem PS I assoziiert sind. In Gefrierätzabdrücken aus Plastiden in der Phase der Granathylakoidausbildung treten zusätzlich 120 - 170 Å Partikel auf (PHUNG NHU HUNG et al. 1970), die nach Ansicht von CRANE PS II-Aktivität enthalten. Der von uns an ergrünenden *Hordeum*-Plastiden durchgeführte Nachweis zweier fibrillärer Stromakomponenten (vgl. Kap. I), die mit den Membranbildungsprozessen in Zusammenhang stehen, könnte analog interpretiert werden.

Die Beispiele der Granaausbildung als Prärequisit der PS II-Aktivität scheinen nur in den Fällen relevant, bei denen in ausdifferenzierten Chloroplasten simultan Grana- und Stromathylakoide vorliegen. In Pflanzen mit ausschließlicher Verbreitung von Stromathylakoiden (z.B. die Rhodophyceen *Porphyridium cruentum*) sind PS I- und PS II-Aktivitäten in den Stromathylakoiden vorhanden (SMILLIE et al. 1972). Granathylakoidfreie Bündelscheiden-Chloroplasten von *Zea mays* zeigen ebenfalls PS II-Aktivität, jedoch werden höhere Lichtintensitäten für die maximale Rate der PS II-Aktivität benötigt (SMILLIE et al. 1972).

Die Unterschiede in der Verteilung und der Aktivität der PS I- und PS II-haltigen Partikel in den Thylakoiden können dreifach interpretiert werden. Nach PARK und Mitarbeitern ist vornehmlich das PS I ein Bestandteil der Stromathylakoide, während in den Granathylakoiden PS I- und PS II-haltige Partikel vorhanden sind (GOODCHILD und PARK 1970).

Nach der von CRANE entwickelten Vorstellung erfolgt nach Digitonin-Behandlung und durch Gefrierätzung eine Auftrennung der PS I- und PS II-haltigen Komponenten bzw. der Bruchhälften longitudinal, entlang der inneren Oberfläche der binär aufgebauten Thylakoidmembran (ARNTZEN et al. 1969).

GOODENOUGH und STAEHELIN (1971) stellen den Zusammenhang unterschiedlicher Partikelgrößen in den Gefrierätzabdrücken der Thylakoide (PS I und PS II - 'MARKER', ARNTZEN et al. 1969) zum PS I und PS II generell in Frage. Danach ist die unterschiedliche Verteilung von Partikelpopulationen in den Thylakoiden eine Folge des "stacking" der Granathylakoide und nicht eine Konsequenz unterschiedlicher photosynthetischer Parameter. So besitzt die ac-5 Mutante von Chlamydomonas PS I- und PS II-Aktivitäten unabhängig, ob die Thylakoide in "stacked" oder "unstacked"-Form vorliegen. Die Zahl der  $160 \overset{\circ}{\text{Å}}$ -Partikel nimmt in der Mutante mit "stacked"-Thylakoiden stark zu. In einer Euglena-Mutante mit einem Block in PS II ist ebenfalls kein Unterschied in Verteilung und Größe der Partikel gegenüber dem Wildtyp festzustellen (SCHWELITZ et al. 1972).

Dennoch ist der von GOODENOUGH gezogene Schluß, daß ein Ausfall oder ein genetischer Block des Elektronentransportes im PS I oder PS II gleichzeitig auch den Ausfall der PS I- und PS II-haltigen Partikel bedingen muß, kein Argument gegen die Zuordnung von Form und Funktion dieser Partikel. Denn das Fehlen einer bestimmten Funktion im PS I und PS II muß nicht unbedingt strukturell zu einem Ausfall der betreffenden PS I- bzw. PS II-haltigen Partikel führen.

Nach Lösung des Harnstoff-unlöslichen Thylakoidrückstandes im Phenolsystem nach BRAUNITZER und BAUER-STÄB (1968) und Trennung

der Proteine mit Hilfe der Gelelektrophorese ergeben sich für Etioplasten und ergrünende Plastiden (12-stündige Belichtung) je 6 Amidoschwarz-positive Banden von gleicher elektro-



Abb. 23: Elektropherogramm von Membranproteinen aus Etioplasten von *H. vulgare* in 7,5% Polyacrylamid nach Äquilibrierung der Gele in Phenol-Ameisensäure-H<sub>2</sub>O (2:1:1, w/v/v)

phoretischen Beweglichkeit (Abb. 23). Durch den Vergleich mit Eichproteinen von definiertem Molekulargewicht (Combithek, Fa. Boehringer) wurde das Molekulargewicht der einzelnen Banden in den Polyacrylamidgelen bestimmt (Abb. 23, vgl. THORUN 1971).

Tab. III

Molekulargewichtsbestimmung von Strukturproteinen aus Etioplasten und ergrünenden Plastiden<sup>+</sup> durch vergleichende Gelelektrophorese

Fraktion <sup>++</sup>	1	2	3	4	5	6
Etioplasten	12.700	19.400	27.000	32.000	40.000	168.000
Chloroplasten	12.500	18.700	26.800	29.600	41.900	178.000

<sup>+</sup> 12 Stunden Belichtung, 5 kLux, Weißlicht

<sup>++</sup> Mittelwerte aus 30 Disk-elektrophoretischen Trennungen im Phenol-Ameisensäuren-H<sub>2</sub>O-System (2:1:1), M.W. Bestimmung mit Referenzproteinen von bekanntem Molekulargewicht (Combithek II Eichproteine, Fa. Boehringer)

Das Muster gelelektrophoretisch (in zwei verschiedenen Gel-systemen) getrennter Membranproteine aus Etioplasten und er-grünenden Plastiden ist qualitativ weitgehend identisch. Während der Differenzierung zu Chloroplasten treten allerdings quantitative Unterschiede in der Breite der Einzelbanden auf. Aufgrund der von REMY und uns gefundenen Ergebnisse, die auf eine Präexistenz der Chloroplastenmembranproteine in den Etio-plastenmembranen hinweisen, bleibt zu überprüfen, inwieweit es sich bei dem von HOOBER (1969), EYTAN und OHAD (1971), OHAD und Mitarbeitern (1972) gefundenen L-Protein tatsächlich um eine de novo-Synthese oder nur um eine Nettozunahme dieses Membran-proteins handelt. Der schlüssige Beweis einer de novo-Synthese durch Dichtemarkierung mit  $H_2O^{18}$  und Trennung im Dichtegradien-ten (FILNER und WARNER 1967, ANSTINE et al. 1970) steht in diesem Fall noch aus. Serologische Methoden - wie sie LÜRSEN (1971) zur Charakterisierung der Membranproteine von Plastiden aus *Zea mays* verwendet - können weiterhelfen, noch offene Fragen über die Verbreitung löslicher Proteine des Stromas als Membranpro-teinvorstufen oder die de novo-Synthese von Membranproteinen während der Chloroplastengenese zu klären.

## V. Der reduktive Pentosephosphatweg und die Plastiden- differenzierung

Die Untersuchungen über den Zusammenhang der Plastidendifferenzierung auf der Ebene elektronenmikroskopisch nachweisbarer Veränderungen der Etioplasten durch Lichtinduktion und die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Assimilation, gemessen als <sup>14</sup>C-Einbau in die lösliche Fraktion ergrünender Primärblattspitzen von *H. vulgare* (in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, Belichtungsdauer 10 Minuten, 35 kLux), wurden unter folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- Wann und in welchen Plastidenentwicklungsstadien wird die Dunkelcarboxylierung durch Atmung in den etiolierten Blättern von der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Assimilation in ergrünenden Plastiden abgelöst?
- Inwieweit sind die Aktivitäten einiger Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges mit dem Differenzierungsgrad der Plastiden korreliert?

TOLBERT und GAILEY (1955) finden in *Triticum* eine signifikante Zunahme der CO<sub>2</sub>-Fixierung zwei Stunden nach Beginn der lag-Phase der Chlorophyllsynthese und weisen als erste <sup>14</sup>C-markierte Produkte Malat, Asparagin- und Glutaminsäure nach. <sup>14</sup>C-markierte Hexosephosphate treten vier Stunden nach Beginn der lag-Phase auf. In etiolierten *Hordeum*-Blättern werden im Dunkeln Malat, Citrat/Isocitrat, Asparagin- und Glutaminsäure gebildet. Nach ein- bis zweistündiger Belichtungsdauer können bereits Hexosephosphate, Phosphoglycerinsäure und Saccharose nachgewiesen werden (BIGGINS und PARK 1966).

Das Erscheinen <sup>14</sup>C-markierter Zwischenprodukte des reduktiven Pentosephosphatweges scheint zumindest zeitlich mit der Ausbildung eines funktionierenden Photosystems I und Photosystems II (PS I, PS II) bei der Chloroplastengenese aus Etioplasten korreliert zu sein. Nach zweistündiger Belichtung etiolierter Phaseolus-Blätter zeigt sich eine schwache Veränderung der Fluoreszenzausbeute nach Bestrahlung mit monochromatischem Licht (650 bzw. 710 nm, 800 erg/cm<sup>2</sup>sec); ein Hinweis, daß PS I und PS II funktionieren und ein erster Elektronentransport nach Ausbildung des PS I und PS II vorhanden ist (BUTLER 1965).

Die Dunkelcarboxylierung etiolierter Blätter von *H. vulgare* beträgt etwa 0,6% der Gesamteinbaurate der löslichen,  $^{14}\text{C}$ -markierten Fraktion. Infolge von Dunkelcarboxylierung lassen sich autoradiographisch in den Papierchromatogrammen neben  $^{14}\text{C}$ -markiertem Malat die Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure nachweisen.  $^{14}\text{C}$ -markierte Phosphoglycerinsäure, Hexosemono- und -diphosphat sind in den Autoradiographien von Blattextrakten etioplastenhaltiger, unbelichteter Primärblätter nicht vorhanden (Tab. IV).

Nach zweistündiger Belichtung - also noch während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese - ist die  $^{14}\text{C}$ -markierte, gesamte Einbaurate auf 2,4% erhöht. Phosphoglycerinsäure, Citrat, Alanin, Glycin, Serin und Saccharose sind in Spuren vorhanden (Abb. 24, Tab. IV). Dünnschichtchromatographisch lassen sich erste Spuren von Chlorophyll a durch ihre Fluoreszenz nachweisen. Alle Plastiden der Primärblätter von *H. vulgare* verlieren zum Ende der lag-Phase der Chlorophyllsynthese die kristalline Membrananordnung ihrer Prolamellarkörper. An der Peripherie der (Rest-)Prolamellarkörper werden perforierte Thylakoide ausgebildet. Die Perforationen in diesen Membranen sind identisch mit den Interstitialräumen der aufgelösten Prolamellarkörper. An der Membrantransformation sind fibrilläre Bündel beteiligt (Abb. 11).

Nach vierstündiger Belichtung - mit Abschluß der lag-Phase und dem Beginn der log-Phase der Chlorophyllsynthese - steigt der Anteil der gesamten, durch Photosynthese  $^{14}\text{C}$ -markierten Produkte auf 12%. Das Muster markierter Einzelprodukte der photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Assimilation ist - bis auf  $\alpha$ -Ketogluarat - komplett. Von den grünen Pigmenten können jetzt erste Spuren von Chlorophyll b dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Trotz des Fehlens von Granathylakoiden in den Plastiden dieses Entwicklungsstadiums können beträchtliche Mengen von  $\text{CO}_2$  fixiert werden. Die Ultrastruktur der Plastiden wird durch folgende Strukturmerkmale gekennzeichnet: vereinzeltes Vorkommen von Prolamellarkörperresten mit wenigen perforierten Thylakoiden und überwiegende Verbreitung von geschlossenen Primärthylakoiden (Abb. 7).

Tab. IV

Lichtabhängige Ergrünung etiolierter Primärblätter der Gerste und photosynthetischer  $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau

Belichtung Std.	Gesamt $^{14}\text{C}$	Sacch.	.Ser	Glu	Asp	Gly	Ala	Mal	Citrat	$\alpha$ -Keto	TP <sup>+</sup>	HD <sup>++</sup>	HMP <sup>+++</sup>	PGA
0	0.6	-	-	0.07	0.07	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-
2	2.4	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.04	-	-	-	-	0.1
4	12.2	2.6	1.3	0.8	0.1	0.8	0.6	0.3	0.08	-	0.1	0.1	0.1	0.1
6	24.6	6.8	2.8	1.9	0.2	1.6	1.4	0.8	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
8	39.7	13.1	6.6	2.2	0.2	4.3	2.2	0.8	0.3	0.5	0.5	0.3	0.2	0.3
10	56.7	22.9	8.1	2.8	0.3	4.1	3.0	1.6	0.3	0.6	1.1	0.4	0.3	0.6
12	100.0	54.2	14.8	4.2	0.3	8.2	7.8	2.9	0.3	0.8	1.5	0.8	0.4	1.3

+ Triosephosphat  
 ++ Hexosediphosphat  
 +++ Hexosemonophosphat

Während der log-Phase der Chlorophyllsynthese (Belichtungsdauer 6 Stunden) beträgt die photosynthetische  $\text{CO}_2$ -Fixierung ungefähr 25% der Kontrollen. Als typisches Merkmal in der Plastidenultrastruktur treten vereinzelt Granathylakoide, die mit röhrenförmigen Fibrillen verbunden sein können, in Erscheinung (Tab. IV, Abb. 16-19). Mit zunehmender Belichtungsdauer (8 und 12 Stunden) steigt die Anzahl der Granathylakoide. Gleichzeitig ist der Gesamteinbau  $^{14}\text{C}$ -markierter Produkte wesentlich erhöht (Tab. IV, Abb. 24).

Daß Plastiden ohne Granathylakoide befähigt sind, eine signifikante  $\text{CO}_2$ -Fixierung durchzuführen, findet eine Parallele in den Ergebnissen von AKOYUNOGLU und ARGYROUDY-AKOYUNOGLU (1972). Mit Blitzlicht-Dunkel-Zyklen wurde in etiolierten *Phaseolus vulgaris*-Blättern selektiv die Plastidenentwicklung so beeinflusst, daß bei fehlender Granathylakoidausbildung überwiegend Chlorophyll a in den Pigment-Proteinkomplexen des PS I ausgebildet wird. Der Malat/Hexosephosphat-Quotient ist in den mit Blitzlicht-'gepulsten' Blättern gegenüber den normal grünen Blättern der im Dauerlicht gewachsenen Pflanzen (mit Plastiden, die PS I- und PS II-Aktivitäten und Grana enthalten) erhöht. Denkbar wäre, daß, wie im Fall der mit kurzen Blitzlichtgaben behandelten Plastiden mit fehlendem Chlorophyll-Proteinkomplex des PS II, die  $\text{CO}_2$ -Fixierung nach dem Modus des  $\text{C}_4$ -dicarboxylat-Zyklus verläuft, während für den Ablauf des Calvin-Zyklus beide Photosysteme vorliegen und aktiv sein müssen. Inwieweit dieser interessante von AKOYUNOGLU vertretene Aspekt der zeitlichen Sequenz beider Typen der  $\text{CO}_2$ -Fixierung, zuerst in Form des Slack-Hatch-Zyklus und dann des Calvin-Zyklus, während der Ontogenese der Chloroplasten vertreten ist, muß durch weitere Untersuchungen über die Aktivität der Kardinalenzyme PEP-carboxylase und RuDP-carboxylase sowie über den Abbau des gebildeten  $^{14}\text{C}$ -Malats geklärt werden.

Um die Ursache für das verzögerte Auftreten von  $^{14}\text{C}$ -Phosphoglycerinsäure (nach 2 Stunden Belichtung) und von markierten Hexosephosphaten (nach 4 Stunden Belichtung) durch das Fehlen der entsprechenden Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges

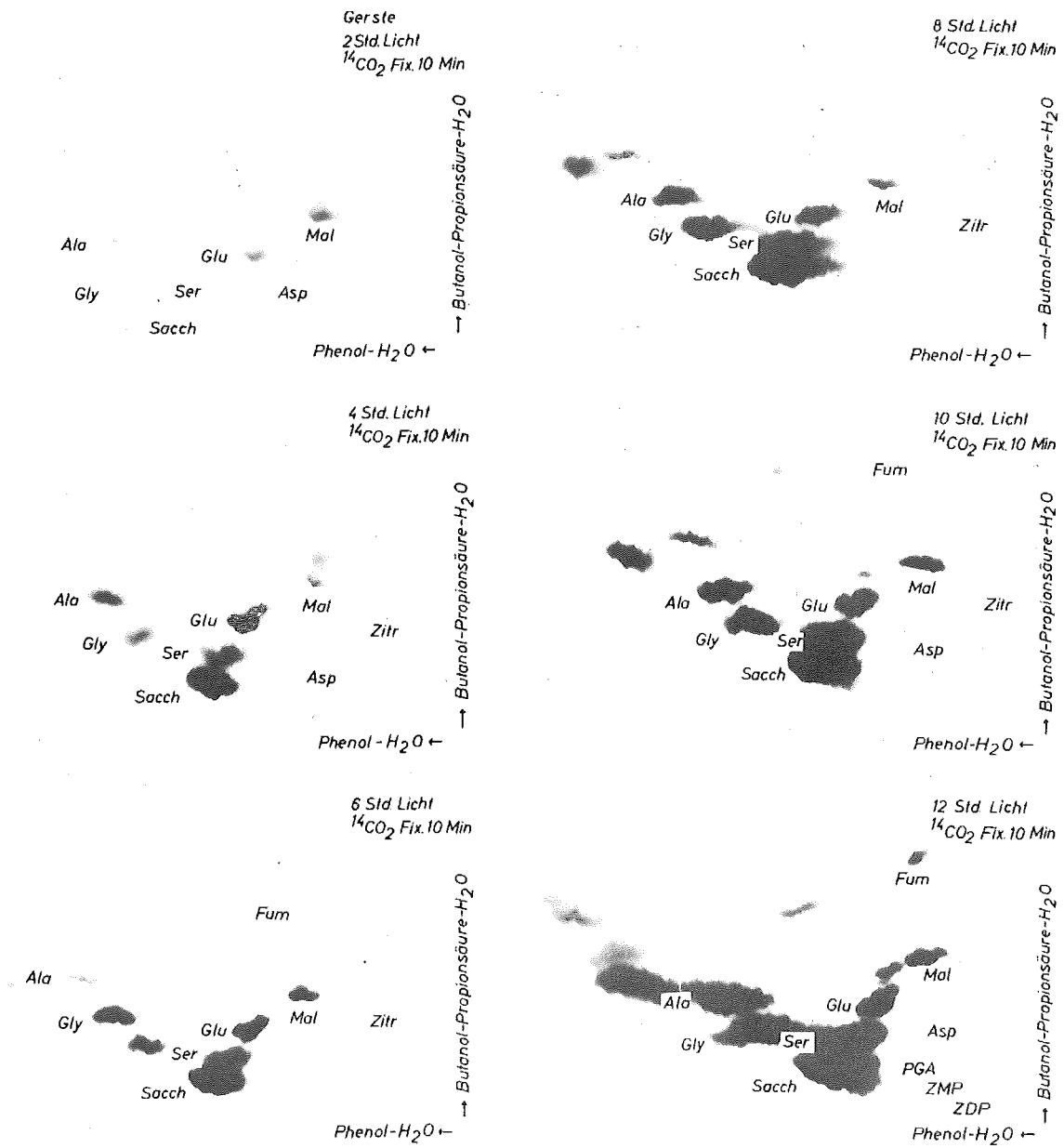
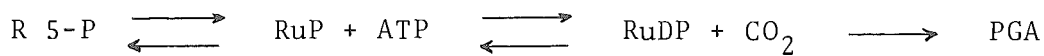


Abb. 24: Autoradiographien von  $^{14}\text{C}$ -markierten Intermediärprodukten der photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Assimilation zu verschiedenen Zeitpunkten der Plastidenentwicklung

oder durch mangelnde Energielieferung (ATP) oder durch das Fehlen von reduziertem NADP infolge des noch nicht ausgebildeten PS II zu erklären, wurde der Umsatz von Ribose-5-Phosphat (R 5-P) in Phosphoglycerinsäure (PGA) in Blättern mit Plastiden unterschiedlicher Differenzierung gemessen. Als Zwischenprodukte werden dabei gebildet: Ribulose-5-Phosphat (RuP), Ribulose-1,5-diphosphat (RuDP).

Die an der Enzymsequenz beteiligten Enzyme sind Phosphoriboisomerase (E.C. 5.3.1.6), Phosphoribulokinase (E.C. 2.7.1.19) und Ribulosediphosphatcarboxylase (E.C. 4.1.1.39, RuDP-carboxylase-Carboxydismutase):



Da RuDP in Gegenwart von Phosphatpuffer inaktiviert wird (WEISSBACH et al. 1956), wurden die Blätter in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, extrahiert. Das Homogenat wurde filtriert und zentrifugiert (4°C, 32.500 Upm, 15' Ti 50-Rotor, Spinco L 50-Zentrifuge, Fa. Beckman) und die Konzentration der pufferlöslichen Proteine des Überstands nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) bestimmt. Zum Testansatz (0,5 ml) wurden 4 µMol R 5-P, 8 µMol ATP, 20 µMol MgCl<sub>2</sub> in 1 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) gelöst und zu 0,2 ml des Überstandes plus 8 µMol Na<sub>2</sub><sup>14</sup>CO<sub>3</sub> als Substrat gegeben (STEER et al. 1966). Die Reaktion (25°C) wurde nach 5, 10 und 15 Minuten durch Zugabe von 0,03 ml 20%iger Perchlorsäure gestoppt, wobei der unfixierte Kohlenstoff als <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> frei wird. Nach Neutralisation mit kalter KOH und Fällung der Kaliumperchloratkristalle und der Proteine im Kühlraum wurde das Präzipitat abzentrifugiert und die Radioaktivität in aliquoten Teilen des Überstandes vermessen. Das Endprodukt <sup>14</sup>C-PGA wurde papierchromatographisch (Whatman I), zweidimensional (1. Dim.: Phenol-H<sub>2</sub>O, 2. Dim.: Butanol-Propionsäure-H<sub>2</sub>O) getrennt und autoradiographisch identifiziert. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tri-Carb, Fa. Packard). Die Kontrollansätze enthielten kein ATP oder R 5-P.

Die Einbaurrate von R 5-P in <sup>14</sup>C-markierte PGA verhält sich in allen drei Versuchsansätzen (etiolierte, unbelichtete Blätter,

2 bzw. 12 Stunden belichtete Blätter) im untersuchten Zeitraum linear (Abb. 25). Im pufferlöslichen Proteinextrakt etiolierter *H. vulgare*-Blätter (7 Tage Dunkelheit) liegen bereits signifikante Aktivitäten der Enzyme R 5-P-Isomerase, RuP-Kinase und RuDP-Carboxylase vor (Abb. 25). In vitro funktioniert die Enzymsequenz bereits in Proteinextrakten aus den unbelichteten, etiolierten Blättern. In vivo müssen die an der Sequenz von  $R\ 5-P \longrightarrow PGA$  beteiligten Enzyme in den etiolierten Blättern von *H. vulgare* vorhanden sein. Ihre Aktivität wird aber durch den limitierenden Faktor der Substratverfügbarkeit begrenzt.

Mit zunehmender Belichtungsdauer (2 und 12 Stunden) steigt die Einbaurate in markierte PGA (Abb. 25): die Aktivität der an dieser Sequenz beteiligten Enzyme aus belichteten Blättern ist stimuliert. Inwieweit die erhöhte Einbaurate in  $^{14}C$ -PGA außer auf lichtinduzierte Aktivitätsänderungen auch auf lichtinduzierte de novo-Synthesen zurückzuführen ist, wird im Zusammenhang mit den Ergebnissen über die mit Fraction I-Protein assoziierte RuDP-carboxylase diskutiert.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse über die Enzymsequenz Phosphoriboisomerase, Phosphoribulokinase und RuDP-carboxylase kann man folgern:

- Die am Umsatz von R 5-P zu PGA beteiligten Enzyme werden lichtunabhängig synthetisiert. In Gegenwart der Substrate R 5-P, ATP und  $Na_2^{14}CO_3$  als Kohlenstoffdonator werden in den pufferlöslichen Proteinen aus Dunkelkulturen von *H. vulgare* signifikante Mengen von  $^{14}C$ -PGA in vitro gebildet.
- Limitierender Faktor für das in vivo beobachtete erste Auftreten von PGA nach zweistündiger Belichtung von dunkelkultivierten Primärblättern von *H. vulgare* muß demnach mangelndes Substratangebot sein. Der Mangel an - vom PS II produzierter - photoreduzierender Aktivität von NADP und das verspätete Auftreten des durch cyclische Photophosphoryllierung gebildeten ATP mag eine Ursache für das verspätete Einsetzen der  $CO_2$ -Fixierung sein.

In *H. vulgare* sind erste photoreduzierende Aktivitäten von NADP nach zwei Stunden Belichtung nachgewiesen, während die cyclische

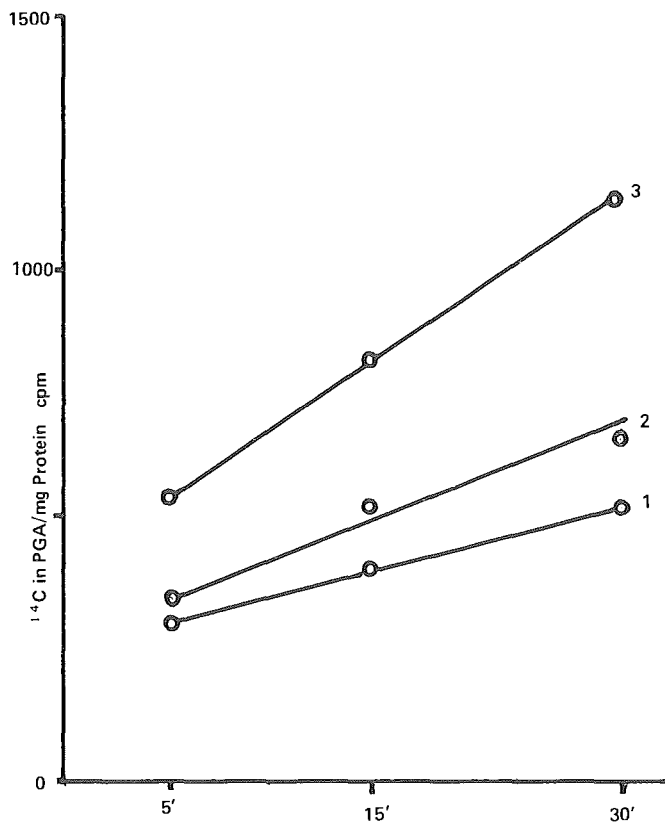


Abb. 25: Aktivitäten der Enzymsequenz Phosphoriboisomerase, Phosphoribulokinase, RuDP-carboxylase gemessen als Umwandlung von R 5-Phosphat in Phosphoglycerinsäure durch <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Incorporation. Die Radioaktivität wurde auf gleiche Mengen löslicher Blattproteine bezogen. Die Aktivitäten der Enzymsequenz in etiolierten, 7 Tage alten Blättern (1) und belichteten Blätter [Belichtungsdauer 2 Stunden (2) bzw. 12 Stunden (3)] wurden verglichen

Photophosphorylierung erst nach vierstündiger Belichtung etiolierter Blätter, die nichtcyclische Photophosphorylierung mit NADP erst nach 10 Stunden Belichtung auftritt (PHUNG NHU HUNG et al. 1970 b).

Die Ursache für den verzögerten Beginn des reduktiven Pentosephosphatweges und der ersten Bildung von PGA scheint damit weniger durch den Mangel an Cytochromen, noch durch das Fehlen des Kopplungsfaktors für Photophosphorylierung bedingt zu sein. Beide genannten Komponenten wurden in Etioplasten nachgewiesen

(PHUNG NHU HUNG et al. 1972, LOCKSHIN et al. 1971). Die Ursache dürfte vielmehr durch den Zeitpunkt des Zusammenbaues und des Funktionierens des PS I und des PS II in und an den Thylakoidmembranen bedingt sein. Da der Chlorophyll a-reiche Pigment-Proteinkomplex des PS I zeitlich vor dem PS II während der lichtabhängigen Ergrünung gebildet wird und in den noch grana-thylakoidfreien und PS II-freien ergrünenden Plastiden nachweisbar ist (ARGYROUDI-AKOYUNOGLU et al. 1972), könnte die Fertigstellung eines funktionierenden aktiven PS I Voraussetzung für den Beginn des reduktiven Pentosephosphatweges sein.

VI. Fraction I-Protein: Molekulargewicht, Untereinheiten,  
Aminosäurezusammensetzung und Aktivität der RuDP-carboxylase  
(E.C. 4.1.1.39)

Das Fraction I-Protein (WILDMAN und BONNER 1947) ist ein plastidenspezifisches Protein (LYTTLETON und TS'0 1958, HEBER et al. 1963, LATZKO und GIBBS 1968), das bei autotrophen Eukaryonten unterschiedlicher taxonomischer Stellung ubiquitär verbreitet ist (DORNER et al. 1948, SINGER et al. 1952). Das pufferlösliche Plastidenprotein kann etwa die Hälfte der Stromaproteine ausmachen.

Als Besonderheit des Fraction I-Proteins gegenüber anderen pufferlöslichen Proteinen können folgende Eigenschaften angesehen werden:

- Das einheitliche Verhalten des Fraction I-Proteins bei der analytischen Ultrazentrifugation. KIERAS und HASELKORN (1968) fanden bei *Brassica oleracea* (Angiospermae), *Chlamydomonas reinhardi* (Chlorophyceae), *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) und photoautotrophen Bakterien (*Chromatium*) Sedimentationskoeffizienten ( $S_{20,w}$ ) von 16 - 18 SVEDBERG-Einheiten.
- Ein bemerkenswert hohes und - soweit an photoautotrophen Eukaryonten untersucht - einheitliches Molekulargewicht von ungefähr  $5,5 \times 10^5$  Daltons.
- Die Fähigkeit, Dimere (26 S), Trimere (32 S) und linear angeordnete Oligomere bzw. Polymere zu bilden (MARKHAM 1962, TROWN 1965, KLEINKOPF et al. 1970 a).
- Die Assoziierung und/oder Identität mit RuDP-carboxylase (TROWN 1965, THORNER et al. 1965).
- Die Zusammensetzung des Fraction I-Proteins aus zwei Untereinheiten (RUTNER und LANE 1967) mit Molekulargewichten von  $5,2 - 5,6 \times 10^4$  für die größere Untereinheit bzw.  $1,2 - 2,5 \times 10^4$  Daltons für die kleinere Untereinheit (MOON und THOMPSON 1968, KAWASHIMA und WILDMAN 1972).

Anlaß für die folgende Untersuchung der Untereinheiten des Fraction I-Proteins von etiolierten *H. vulgare*-Primärblättern

waren die Ergebnisse von SUGIYAMA und AKAZAWA (1967) vom Fraction I-Protein bei Triticum, nach denen in Gegenwart von SDS ( $5 \times 10^{-3}$  M) drei - anstelle der bisher zwei in Dicotyledonen gefundenen Untereinheiten (Spinacia oleracea, Nicotiana tabacum, Beta vulgaris) - Untereinheiten bei dieser Monocotyledone vorkommen. Nach Sephadex-Chromatographie in Gegenwart von SDS (KAWASHIMA 1969, RUTNER und LANE 1967) bzw. von 8 M Harnstoff-haltigen basischen Puffern (pH 10,0) wurden bisher nur zwei Untereinheiten nachgewiesen. Die Frage war, ob bei der verwandten Graminee H. vulgare ebenfalls die gleiche Anzahl nichtkovalent gebundener Polypeptidketten vorliegt, wie das Molekulargewicht der zusätzlichen Untereinheit ist und ob die Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung der kleineren bzw. größeren Untereinheit von Spinacia und Nicotiana (KAWASHIMA 1968, RUTNER und LANE 1967) mit den Verhältnissen in Hordeum vergleichbar sind.

Blatthomogenate aus etiolierten 7 Tage alten Keimlingen von H. vulgare wurde nach differentieller Zentrifugation mit Hilfe von Sephadex-Chromatographie in eine schnell wandernde Fraktion I und eine langsamere Fraktion II getrennt (KANNANGARA 1969). Eine weitere, gelblich gefärbte Fraktion von geringerer Mobilität als die Fraktion II erscheint als deutlich abgesetzte, UV-absorbierende Schulter (Abb. 26). Die gelbliche Fraktion enthält weder mit Folin-Reagenz nachweisbare lösliche Proteine noch spektralphotometrisch erkennbare Carotinoide und - im Falle grüner Blätter - keine Chlorophylle. (Durch Dialyse gegen Tris-Puffer kann die Gelbfärbung entfernt werden. In diesem Fall fehlt die Schulter der Fraktion II).

Daß die Fraktion I mit dem Fraction I-Protein identisch ist, wurde durch folgende Ergebnisse gesichert:

- Fraction I-Protein enthält RuDP-carboxylaseaktivität (E.C. 4.11.39). Im Reaktionsgemisch - enthaltend Fraction I-Protein, RuDP und  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  - wird  $^{14}\text{C}$ -PGA gebildet (Abb. 27). Die Untersuchungen der Aktivitäten von der Enzymsequenz R 5 P-Isomerase (E.C. 5.3.1.6), RuP-Kinase (E.C. 2.7.1.19) und RuDP-carboxylase (E.C. 4.1.1.39) mit R 5-P und ATP als Substrat und Frac-

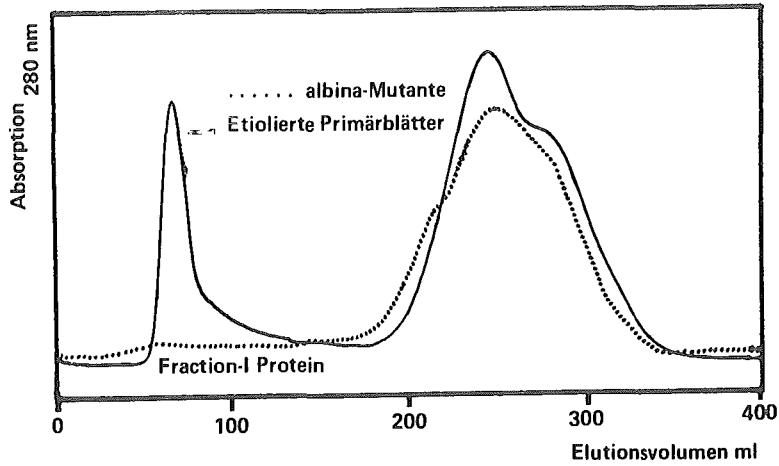


Abb. 26: Trennung von Fraction I-Protein aus etiolierten Blättern von *H. vulgare* und aus Primärblättern der chlorophyll-freien albina II-Mutante an der Sephadex (G-100)-Säule. Die Mutante enthält kein Fraction I-Protein

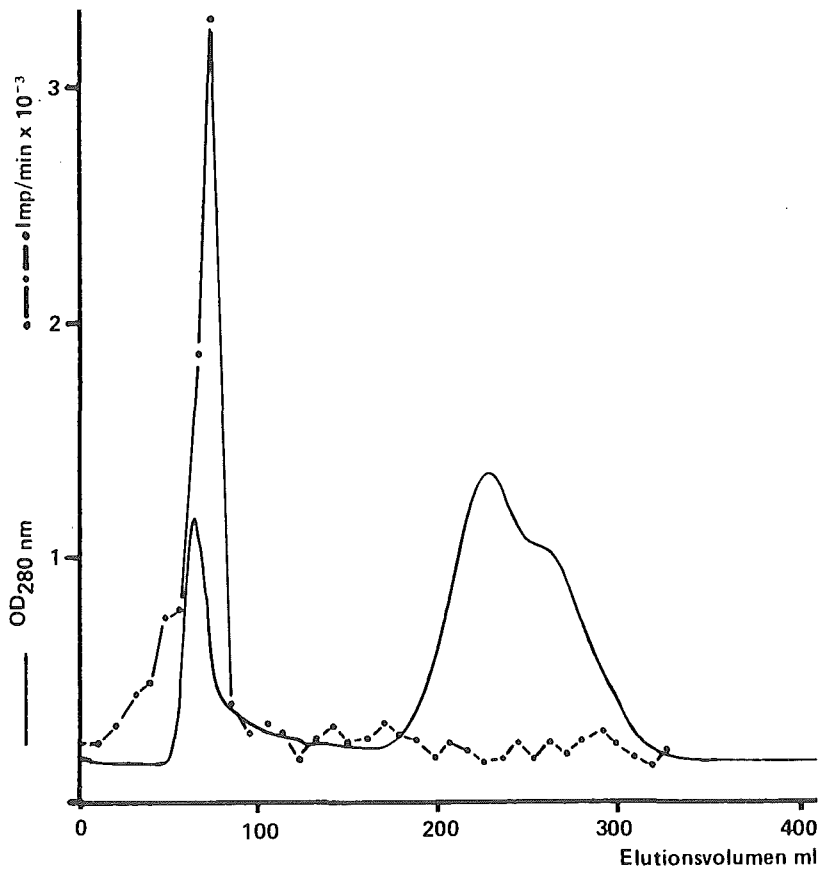


Abb. 27: Vorkommen von RuDP-carboxylase Aktivität im Fraction I-Protein ergrünender Blätter von *H. vulgare* (12 Stunden Belichtung; Bestimmung der Enzymaktivitäten nach KANNANGARA 1969)

tion I-Protein mit  $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$  im Testansatz verliefen negativ. Dies ist ein weiterer Hinweis gegen die Auffassung des Fraction I-Proteins als Sitz eines Multienzymkomplexes (vgl. AKAZAWA 1970).

- Das Molekulargewicht des Fraction I-Proteins von *H. vulgare* ist weitgehend identisch mit den bekannten Molekulargewichten des Fraction I-Proteins aus *Brassica* (M.W.  $5,1 \times 10^5$ , KIERAS und HASELKORN 1968), *Spinacia* (M.W.  $5,15 \times 10^5$ , TROWN 1965), *Beta vulgaris* (M.W.  $5,65 \times 10^5$ , THORNER et al. 1965, 5,83 und  $5,47 \times 10^5$ , THORNER et al. 1966). Bestimmungen des Molekulargewichtes durch Co-Chromatographie mit Eichproteinen unterschiedlicher, bekannter Molekulargewichte an Sephadex (G-100)-Säulen und Co-Elektrophorese in 7,0%igen Polyacrylamidgelen ergaben für das native Fraction I-Protein gleiches Elutionsverhalten und gleiche elektrophoretische Mobilität wie das Test- und Indikatorprotein Ferritin (M.W.  $5,4 \times 10^5$ ).
- Die albina II-Mutante, eine chlorophyllfreie Letalmutante von *H. vulgare* besitzt keine RuDP-carboxylase-Aktivität (SPREY 1972). Nach Gelfiltration der pufferlöslichen Proteine dieser Mutante fehlt die dem Fraction I-Protein entsprechende Fraktion im Elutionsprofil der Proteine des Wildtyps (Abb. 26).

Für die Trennung der Untereinheiten durch SDS-Diskelektrophorese zur Bestimmung ihrer Molekulargewichte und zur weiteren Analyse ihrer Aminosäurezusammensetzung wurde nur die erste Hälfte des Fraction I-Proteinpeaks des Eluates verwendet, weil - wie die gelelektrophoretische Trennung ergab - in der Schulter der zweiten Hälfte des Fraction I-Peaks bereits unspezifische Proteine enthalten sind. Nach Konzentrierung des Fraction I-Proteins (Desaga-Vakuumkonzentrationsapparat) tritt nach gelelektrophoretischer Trennung in den 7%igen Polyacrylamidgelen eine einheitliche, Amidoschwarz-positive Bande auf (Abb. 28). Sie hat gleiche elektrophoretische Mobilität wie co-elektrophoretisch wanderndes Ferritin.

In Anwesenheit von 0,1% SDS im Elutionspuffer, im 7%igen Gel und in der Probe dissoziiert das native Fraction I-Protein in zwei Polypeptide (Abb. 28).

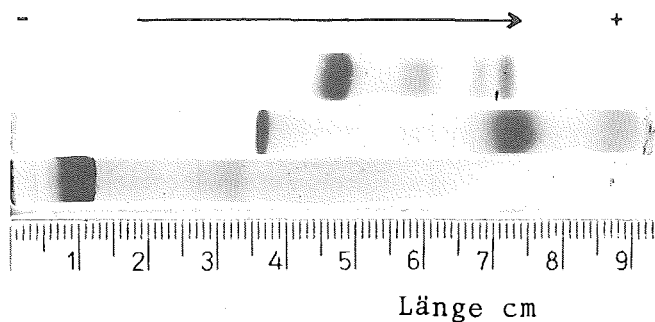


Abb. 28: Gelelektrophoretische Trennung von nativem Fraction I-Protein in 7% Acrylamid (Tris-Glycin Puffer, pH 8.9, unten), in Gegenwart von 0,1% SDS (Mitte) und 6 M Harnstoff plus 0,1% SDS (oben). Anfärbung der Proteine mit Amidoschwarz 10 B

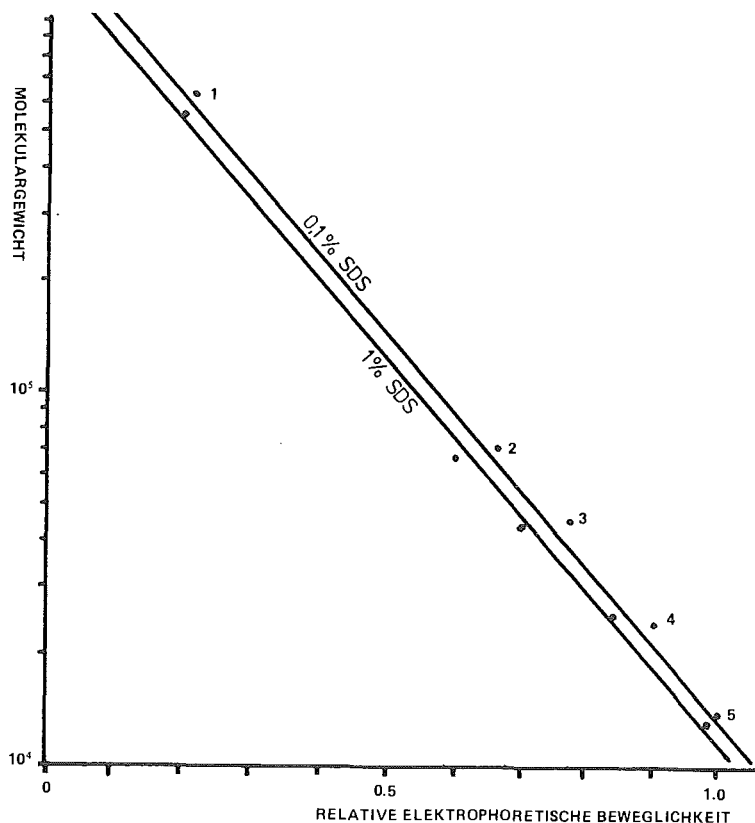


Abb. 29: Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten des Fraction I-Proteins in 7,0% Polyacrylamid in Gegenwart von 0,1 bzw. 1,0% SDS (Tris-Glycin Puffer, pH 8.9). Als Eichproteine wurden verwendet: Ferritin (M.W. 560 000, 1), Rinderserumalbumin (M.W. 67 000, 2), Ovalbumin (M.W. 45 000, 3), Chymotrypsinogen A (M.W. 25 000, 4) und Cytochrom c (M.W. 13 500, 5). Die Molekulargewichte der Untereinheiten des Fraction I-Proteins betragen 40 000 bzw. 17 000 Daltons

In SDS-haltigen Polyacrylamidgelen ist die relative elektrophoretische Beweglichkeit umgekehrt proportional dem Logarithmus des Molekulargewichtes (SHAPIRO, VINUELA und MAIZEL 1967, WEBER und OSBORN 1967). Unter Verwendung von Standardproteinproteinen bekannter Molekulargewichte (Combithek, Fa. Boehringer) wurde eine Eichkurve für 7%ige, 0,1% SDS-haltige Polyacrylamidgelle erstellt (Abb. 29). Die relative elektrophoretische Beweglichkeit wurde als Verhältnis der Wanderungsstrecke einer Proteinbande vom Gelanfang zum Indikatorprotein Cytochrom c (M.W. 13 500) definiert.

Bei der Beurteilung von Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten muß berücksichtigt werden, daß die nach dieser Methode berechneten Molekulargewichte bis maximal 10% variieren können. Für die 'kleine' Untereinheit mit der größeren elektrophoretischen Mobilität ergab sich ein Molekulargewicht von 17 000, für die größere Untereinheit mit der relativ geringeren Beweglichkeit ein Molekulargewicht von 40 000 Daltons (Abb. 28, 29).

In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß Anzahl und Lage der Banden aus etiolierten, ergrünenden (12 Stunden Belichtung) und grünen Blättern (7 Tage Belichtung) identisch waren.

Das Molekulargewicht der kleineren Untereinheit aus *H. vulgare* paßt gut zu den bisher bekannten Molekulargewichten der Untereinheiten von RuDP-carboxylase von *Beta vulgaris* (M.W. 16 000, MOON und THOMPSON 1969), *Spinacia* (M.W. 12 000, RUTNER 1970) und *Nicotiana* (M.W. 24 500, KAWASHIMA und WILDMAN 1971).

Das Molekulargewicht der größeren Untereinheit von RuDP-carboxylase aus *Hordeum* (M.W. 40 000) weicht von den bisher bekannten Molekulargewichten der größeren Untereinheit der oben genannten Arten ab: 54 000 (MOON und THOMPSON 1969),  $55\,800 \pm 2\,300$  (RUTNER 1970) und  $52\,000 \pm 5\,000$  Daltons (KAWASHIMA und WILDMAN 1971).

Es ist wahrscheinlich, daß der gefundene Unterschied der Molekulargewichte der größeren Untereinheit von RuDP-carboxylase nicht artspezifisch ist. Dafür sprechen die gut vergleichbaren

Zusammensetzungen der Aminosäuren der größeren Untereinheit von RuDP-carboxylase aus *Hordeum vulgare* (s.u.), *Beta vulgaris* (RUTNER und LANE 1967), *Nicotiana tabacum* und *Spinacia oleracea* (KAWASHIMA 1968). Die Differenzen sind eher durch die unterschiedlichen bei der Molekulargewichtsbestimmung verwendeten Methoden bedingt. MOON und THOMPSON (1969) trennen die RuDP-carboxylase-Untereinheiten bei Anwesenheit von 8 M Harnstoff im alkalischen Milieu (pH 10,0) durch Gelchromatographie an Sephadex. Nach unseren Erfahrungen ergibt die Anwesenheit von Harnstoff (6 M) - allerdings zusammen mit 0,1% SDS - bei der Trennung der Untereinheiten gegenüber SDS-Gelen ein anderes Trennmuster (Abb. 28). Die elektrophoretische Beweglichkeit beider Untereinheiten ist verändert, zusätzlich treten zwei schwach sichtbare Zwischenbanden auf.

Die von SUGIYAMA und AKAZAWA (1967) nach SDS-Behandlung nachgewiesene dritte Bande wurde in den Präparationen - nach Reinigung über Sephadex - im Fraction I-Protein aus *Hordeum vulgare* nicht immer gefunden (Abb. 30). Das Molekulargewicht dieser Proteinbande mit relativer elektrophoretischer Beweglichkeit wurde durch Vergleich mit den Proteinen definierten Molekulargewichts auf  $2,45 \times 10^5$  Daltons bestimmt.

Zwei Interpretationsmöglichkeiten für das sporadische Vorkommen dieser dritten Bande sind diskutabel. Es könnte sich um eine oligomere Form der beiden Untereinheiten handeln, die durch 0,1% SDS noch nicht vollständig in die beiden, nicht identischen Untereinheiten zerlegt wurde. Diese Annahme wird durch gewisse Ähnlichkeiten der molaren Verhältnisse der Aminosäuren dieser Proteinbande mit den beiden übrigen Untereinheiten gestützt (Tab. V). Dieses Polypeptid könnte aber auch als zusätzliche große Untereinheit aufgefaßt werden, die mit der von AKAZAWA beschriebenen Untereinheit mit der Sedimentationskonstanten von 15 S identisch ist. In Gegenwart von 4 M Harnstoff, RuDP,  $\text{NaHCO}_3$  und  $\text{Mg}^{++}$  soll Fraction I-Protein in eine große (15 S) und eine kleine (2 S) Untereinheit dissoziieren. Weitere Trennung im Saccharosegradienten ergab für die große Untereinheit RuDP-carboxylaseaktivitäten (AKAZAWA und SUGIYAMA 1969). Eine Überprü-

fung der nach SDS-Gelelektrophorese auftretenden großen Untereinheit (M.W.  $2,45 \times 10^5$ ) von *H. vulgare* auf RuDP-carboxylaseaktivität ist irrelevant, weil SDS die Enzymaktivität irreversibel blockiert.

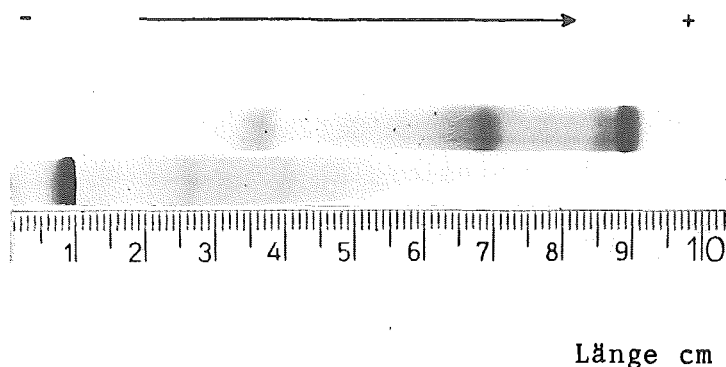


Abb. 30: Trennung von nativem Fraction I-Protein (unten in 7,5% Acrylamidgelen (3,5 mA/Gel, Tris-Glycin Puffer, pH 8,9) und nach Zusatz von 0,1% SDS (oben). Die zusätzliche dritte Bande mit der relativ geringen elektrophoretischen Beweglichkeit hat ein Molekulargewicht von  $2,45 \times 10^5$  Daltons

Bestimmungen der Aminosäurezusammensetzung der beiden Untereinheiten des Fraction I-Proteins sind von RUTNER und LANE (1967) an Beta und von KAWASHIMA (1969) an Nicotiana bzw. Spinacia durchgeführt worden. Dabei ergab sich in den molaren Verhältnissen (bezogen auf Phenylalanin) ein typisches Verhältnis von Phenylalanin : Tyrosin : Glycin. Es war von Interesse, inwieweit diese Relation auf die beiden nicht identischen Untereinheiten (M.W. 40 000 und 17 000) des Fraction I-Proteins bei *Hordeum vulgare* übertragbar war.

Nach gelelektrophoretischer Trennung der Untereinheiten des Fraction I-Proteins von *H. vulgare* in Anwesenheit von 0,1% SDS wurden die entsprechenden Proteinbanden von den ausgeschnittenen Gelscheiben ( $\varnothing$  2,3 cm) eluiert. Die Aminosäurezusammensetzung zeigt - im Vergleich mit den Analysen von RUTNER, LANE und KARASHIMA - weitgehende Ähnlichkeit in der Zusammensetzung des nativen Fraction I-Proteins (vgl. STEER et al. 1967, BAILEY et al. 1966) und der Untereinheiten (Tab. V).

Tab. V

Aminosäurezusammensetzung des nativen Fraction I-Proteins und der Untereinheiten nach gelelektrophoretischer Trennung in Gegenwart von SDS

Aminosäuren	Molares Verhältnis (bezogen auf Phe)			
	Natives Protein	Untereinheit M.W. $2,45 \times 10^5$	Untereinheit M.W. $4 \times 10^4$	Untereinheit M.W. $1,7 \times 10^4$
Phe	1.00	1.00	1.00	1.00
Lys	1.23	1.19	1.53	1.52
His	0.65	0.45	0.52	0.39
Arg	1.35	1.48	1.26	1.36
Asp	2.30	1.60	2.00	2.10
Thr	1.39	1.02	1.14	0.93
Ser	0.78	0.74	0.72	0.88
Glu	2.42	2.02	2.37	2.59
Pro	1.20	0.72	0.97	1.16
Gly	2.03	1.14	2.26	1.93
Ala	2.12	1.67	2.03	1.11
Val	1.48	1.24	1.21	1.42
Met	0.43	0.22	0.26	0.29
Ileu	0.72	1.14	0.97	0.88
Leu	2.21	2.40	2.19	2.40
Tyr	1.12	0.68	0.95	1.60

Das Verhältnis von Phe : Tyr : Gly in der großen Untereinheit von *Hordeum* ist 1,0 : 0,95 : 2,26, in *Beta* (RUTNER und LANE 1967) 1,0 : 0,93 : 2,10, in *Spinacia* (KAWASHIMA 1969) 1,0 : 0,91 : 2,43 und *Nicotiana* (KAWASHIMA 1969) 1,0 : 0,85 : 2,44.

Für die kleinere Untereinheit gilt für das Verhältnis Phe : Tyr : Gly in *Hordeum* 1,00 : 1,60 : 1,93, in *Beta* 1,00 : 1,57 : 1,15, in *Spinacia* 1,00 : 1,43 : 1,28 und *Nicotiana* 1,00 : 1,92 : 2,33. Der Vergleich zeigt, daß die Aminosäurezusammensetzung beider Untereinheiten des Fraction I-Proteins unterschiedlicher Herkunft aus Mono- und Dicotyledonen weitgehend identisch ist.

Das plastidenspezifische Fraction I-Protein photosynthetischer Eukaryoten hat von der experimentell-methodischen Seite (Isolierung des Proteins im großen Maßstab, Trennung seiner Untereinheiten und Funktionstest auf RuDP-carboxylase-Aktivität) Vorteile, die es zur Lösung phylogenetischer Zusammenhänge prädestinieren. Wichtig erscheinen zwei Fragen, die sich aus dem Ort der Codierung und der Synthese der Fraction I-Untereinheiten ergeben.

Die Ergebnisse der WILDMAN-Gruppe (KAWASHIMA und WILDMAN 1971 a, b, KAWASHIMA, KWOK und WILDMAN 1971, PAK-HOO CHANG und WILDMAN 1972) an *Nicotiana* haben gezeigt, daß die große Untereinheit des Fraction I-Proteins von der Chloroplasten-DNA codiert wird und die Kern-DNA die kleinere Untereinheit codiert. Aufgrund der selektiven Wirkung von Cycloheximid und Chloramphenicol auf die proteinsynthetisierenden Kompartimente mit 70 S bzw. mit 80 S Ribosomen kann man annehmen, daß die große Untereinheit des Fraction I-Proteins an den Chloroplastenribosomen, die kleinere Untereinheit an den Cytoplasmari-bosomen synthetisiert wird (CRIDDLE et al. 1970). Dieses Ergebnis wird ergänzt durch den Befund, daß in isolierten Chloroplasten in vitro <sup>14</sup>C-Leucin nur in die größere Untereinheit des Fraction I-Proteins eingebaut wird (BLAIR und ELLIS 1972). Abgesehen von dem interessanten Vergleich der Peptidmuster nach Trypsin-Abbau und Aminosäure-Sequentierung beider Untereinheiten aus Organismen unterschiedlich taxonomischer Stellung zur Klärung der Frage der Spezifität

von Aminosäure-Sequenzen und 'fingerprints' während der Phylogenese, scheint folgende Überlegung von größerer Bedeutung zu sein.

Innerhalb der chloroplastenhaltigen höheren Pflanzen, Chlorophyceen und bei Cyanophyceen scheint das Molekulargewicht der RuDP-carboxylase ( $5 - 6 \times 10^5$ ) und die Sedimentationskoeffizienten (16 - 18 S) einheitlich zu sein (AKAZAWA et al. 1969, KIERAS und HASELKORN 1968). Auffallende Unterschiede existieren im Molekulargewicht der RuDP-carboxylase von photoautotrophen und photoheterotrophen Bakterien. Die Molekulargewichte ihrer RuDP-carboxylase sind - bis auf Chromatium (Stamm D),  $5,5 \times 10^5$  (KIERAS und HASELKORN 1968) und Thiobacillus neapolitanus  $5 \times 10^5$  (McELROY und JOHNSON 1968) - kleiner als die photoautotropher Eukaryonten.

So beträgt das Molekulargewicht der RuDP-carboxylase von Hydrogemonas facilis ca.  $2 \times 10^5$  (KUEHN und McFADDEN 1968), Rhodospirillum rubrum  $1,1 \times 10^5$  (ANDERSON et al. 1967), Rhodopseudomonas spheroides  $2,6 - 3,6 \times 10^5$  (AKAZAWA et al. 1969, ANDERSON et al. 1968) Rhodospirillum rubrum  $1,2 \times 10^5$  (ANDERSON et al. 1968) bzw.  $6,8 \times 10^4$  (AKAZAWA et al. 1969).

Als ein Beweis oder Gegenbeweis der Symbiontentheorie - die photoautotrophe Eukaryontenzellen als Produkt aplastidischer Eukaryonten mit photosynthetisierenden Prokaryonten betrachtet (vgl. MARGULIS 1970) - wäre von Interesse, ob und inwieweit zwischen der größeren Untereinheit des Fraction I-Proteins der Chloroplasten und dem Fraction I-Protein photoautotropher Bakterien serologische Affinitäten, Analogien im Peptidmuster und Homologien ihrer Aminosäure-Sequenz bestehen.

Die zweite noch ausstehende Frage betrifft die eindeutige elektronenmikroskopische Identifizierung des Fraction I-Proteins im Plastidenstroma. Untersuchungen der Molekülstruktur des isolierten Fraction I-Proteins mit elektronenmikroskopischer Hochauflösung nach Negativkontrastierung gehen von 24 Untereinheiten pro Molekül aus, die bei Avena auf der Oberfläche eines Oktaeders mit maximalem Durchmesser von  $105 \text{ \AA}$  (STEER et al. 1968), oder bei

Brassica in kubischer Anordnung mit maximalem Durchmesser von  $120 \text{ \AA}$  (HASELKORN et al. 1965) angeordnet sein sollen. Abweichend von diesen Ergebnissen sind - neben weiteren elektronenmikroskopischen Strukturuntersuchungen von SUGIYAMA und AKAZAWA 1967 - die biochemischen Daten, die nach KAWASHIMA und WILDMAN (1971) 8 (7-8) größere und 6 (8-10) kleinere identische Untereinheiten pro Molekül vorsehen (RUTNER 1970).

Die eindeutige elektronenmikroskopische Identifizierung des Fraction I-Proteins im Plastidenstroma aufgrund der Kriterien Molekülgröße und mögliche Aggregation zu Polymeren müßte relativ leicht durchzuführen sein. Bisher steht ein elektronenmikroskopischer Nachweis in situ noch aus. Alle bisherigen Untersuchungen über Vorkommen und Verbreitung von Fraction I-Proteinen im Stroma sind auf Größenanalogien beruhende Hypothesen: z.B. das Stromazentrum (GUNNING et al. 1968) oder fibrilläre oder kristalline Stromakomponenten (SPREY 1968, BUTLER et al. 1973, WRISCHER 1972, TAKEBE und OTSUKI 1973). Die Methode der Wahl, um den eindeutigen Funktionstest für Fraction I-Protein im Ultradünnschnitt durchzuführen, sollte in Form der immunocytochemischen Lokalisierung von enzymgekoppelten Antikörpern mit Hilfe des Elektronenmikroskopes möglich sein (NAKANE und PIERCE 1967).

Über lichtinduzierte Synthesen und spezifische Aktivitätsänderungen der RuDP-carboxylase soll in einem anderen Zusammenhang berichtet werden. Dabei stand die Frage im Vordergrund, inwieweit die von CHEN et al. (1971) und KANNANGARA (1969) beobachtete relative Abnahme der Aktivität und Syntheserate von RuDP-carboxylase zu Beginn der lag-Phase der Chlorophyllsynthese in direktem Zusammenhang mit den Membranbildungsprozessen der Grana- und Stromathylakoide stand. Dazu wurden Blätter etiolierte, ergrünende (bis 24 Stunden Belichtung) und grüne Primärblätter (8 Tage Belichtung) mit  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren ( $5 \mu\text{Ci/ml}$ ) inkubiert und die Synthese des Fraction I-Proteins in den verschiedenen Differenzierungsstadien der Plastiden bestimmt (vgl. Tab. I). Über diese Ergebnisse wird in einem anderen Zusammenhang berichtet (SPREY, in Vorbereitung).



## VII. Lipidsynthesen und Membranbildungsprozesse

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die licht-induzierte Metamorphose der Etioplastenmembranen während ihrer Entwicklung zu Primärthylakoiden lassen vermuten, daß dieser Vorgang als Umformung präformierter Membranoberflächen des Prolamellarkörpers und nicht als Abbau und Neusynthese der Plastidenmembranen interpretiert werden muß. So zeigt die kristalline Membrananordnung der Prolamellarkörper, aus denen unter Lichteinfluß zusammenhängende perforierte und später geschlossene Stromathylakoide entstehen (SCHNEPF 1964, GUNNING und JAGOE 1967) und die dann zusammen mit den Granathylakoiden ein in sich geschlossenes Membransystem bilden (WEHRMEYER 1964), die Kontinuität dieses inneren plastidären Membransystems. In diesem Sinne nehmen BOARDMAN und Mitarbeiter (1972) an, daß die Membranen der Etioplasten die ersten Bausteine für die später auszubildenden, photosynthetisch aktiven Membranen der Chloroplasten sind.

Wie später gezeigt wird, haben Hemmstoffe der Proteinsynthese keinen Einfluß auf die Umwandlung der Prolamellarkörper in perforierte oder geschlossene Thylakoide. Die Proteinsynthese-Inhibitoren wirken erst während der log-Phase der Chlorophyllsynthese, indem sie indirekt die Granathylakoidausbildung und synchron die Chlorophyllsynthese unterdrücken. Dabei ist denkbar, daß die Hemmung der Strukturproteine in den Thylakoiden die Synthese und den Einbau der Membranlipide hemmt oder die Hemmung der Membranlipide durch Rückkopplung die Synthese und den Einbau von Membranproteinen reprimiert.

Unter der Voraussetzung, daß die Membranproteine und -lipide der Chloroplastenthylakoide - ausgenommen sind die Chlorophylle und Chlorophyll-Proteinkomplexe der Membranen - bereits qualitativ in den Etioplastenthylakoiden präformiert sind, ist zu erwarten, daß in der lag-Phase der Chlorophyllsynthese, in der die Umwandlung der Prolamellarkörper in geschlossene Stromathylakoide erfolgt, keine wesentlichen qualitativen wie quantitativen Neusynthesen von Membranproteinen und -lipiden stattfinden. Im Laufe der log-Phase der Chlorophyllsynthese, in der die Grana-

thylakoide gebildet werden, sollten signifikante quantitative Veränderungen durch erhöhte Lipid- und Strukturproteinsynthesen zu erwarten sein.

Die Thylakoide der Chloroplasten enthalten etwa 50% ihres Gewichtes an Lipiden (PARK und PON 1963, LICHTENTHALER und PARK 1963, MENKE 1966, JAMES und NICHOLS 1966, BENSON 1971). Hauptbestandteil der Glykolipide ist Monogalaktosyldiclycerid (MG) vor Digalaktosyldiglycerid (DG) und Sulfolipid (SL). Das Vorkommen der Galaktolipide ist im wesentlichen auf Plastiden beschränkt (JAMES und NICHOLS 1966), so daß Gehalt und Veränderungen der MG/DG-Quotienten häufig mit Einzelprozessen der lichtabhängigen Chloroplastengnese in Zusammenhang gebracht wurden. BLOCH und Mitarbeiter (1967) weisen auf die Korrelation von Chloroplastenmorphogenese und Galaktoglyceridsynthese nach Belichtung dunkelkultivierter Euglena-Stämme hin. MG- und DG-Synthese werden durch Licht stimuliert. Das MG/DG-Verhältnis steigt mit zunehmender Chloroplastendifferenzierung und steigendem Chlorophyllgehalt.

Veränderungen des Glyko- und Phospholipidgehaltes bei der lichtinduzierten Chloroplastengnese aus Etioplasten lassen summarisch folgende Tendenzen erkennen:

- Während der Chloroplastengnese ist im wesentlichen nur eine quantitative Veränderung farbloser Plastidenlipide erkennbar. Etioplasten enthalten bereits einen beträchtlichen Gehalt an MG und DG (LÜRSSSEN 1970, TEVINI 1972, TRÉMOLIÈRES und LEPAGE 1971, ROUGHAN und BOARDMAN 1972, BOARDMAN et al. 1972). Etiolierte Blätter von *H. vulgare* haben nach TEVINI (1972) folgende relative Lipidzusammensetzung: MG (35%), DG (25%), SL (10%), gesamte Phospholipide (30%).
- Lipidgehalt und das relative Verhältnis einzelner Plastidenlipide bleibt während der Prolamellarkörperumwandlung in Primärthylakoide konstant oder sinkt leicht ab (ROUGHAN und BOARDMAN 1972).
- Die Nettosynthese der Galaktolipide während der log-Phase der Chlorophyllsynthese und Granathylakoidausbildung verlaufen

parallel (TEVINI 1972, BOARDMAN et al. 1972). Die MG-Syntheserate übertrifft dabei die DG-Synthese.

Die von uns gefundenen Syntheseraten von MG und DG nach  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Markierung etiolierter und ergrünender Blätter entsprechen der von den oben genannten Autoren festgestellten Nettosynthese der Galaktolipide.

MG und DG werden lichtunabhängig in etiolierten Blättern synthetisiert. Die MG- und DG-Synthese ist ungefähr zum Ende der lag-Phase der Chlorophyllsynthese (4 Stunden nach Belichtungsbeginn) leicht erhöht und nimmt dann während der log-Phase der Chlorophyllsynthese und der Granathylakoidausbildung signifikant zu (Abb. 31, Tab. VI).

Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen über die Kinetik von Membranbildungsprozessen in Plastiden und der Galaktolipidsynthese in pflanzlichen Ein- und Vielzellern überein (*Euglena gracilis*, BLOCH et al. 1967, ROSENBERG 1966; *Chlamydomonas reinhardi*, ERWIN und BLOCH 1963; *Chlorella vulgaris*, NICHOLS 1965; *Hordeum vulgare*, LÜRSEN 1970, TEVINI 1972; *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris*, BOARDMAN et al. 1972, ROUGHAN und BOARDMAN 1972, TREMOLIERE und LEPAGE 1971).

Für die Verhältnisse in *H. vulgare* gilt, daß MG und DG bereits Lipidkomponenten der Prolamellarkörper der Etioplasten sind. Die Bildung der Primärthylakoide in Plastiden nach der lichtinduzierten Prolamellarkörperumwandlung ist mit einer geringen Steigerung der MG- und DG-Synthese verbunden.

Inwieweit ist die lichtstimulierte Zunahme von MG und DG mit der Granathylakoidbildung in der log-Phase der Chlorophyllsynthese korreliert? Ein Hinweis zur Lösung dieser Frage bietet sich durch die Verwendung von Chloramphenicol als Inhibitor während der Ergrünungsphase der Plastiden an.

Chloramphenicol (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hemmt die plastidären Eiweißsynthesen und die Ausbildung der Granathylakoide (vgl. Kap. XI). Nach zweistündiger Vorinkubation der abgeschnittenen, etiolierten Primärblätter im Dunkeln mit diesem Inhibitor und anschließender

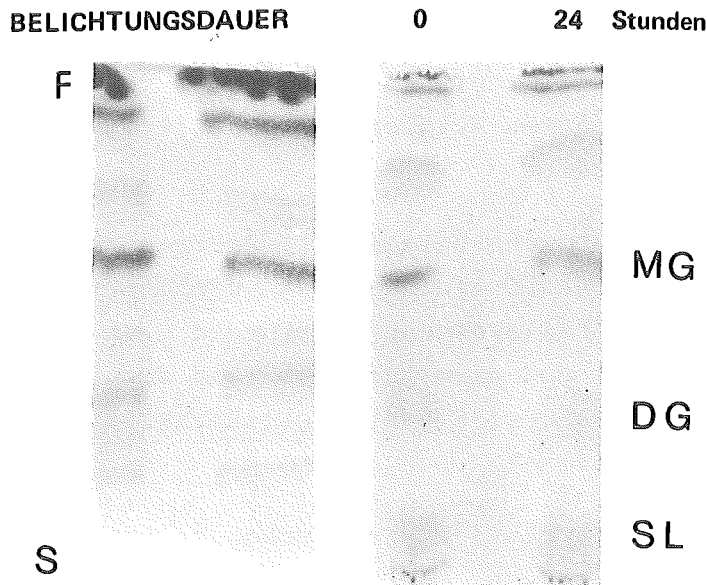


Abb. 31: Trennung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Glykolipiden (MG, DG, SL) auf Kieselgel-Platten mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol- $\text{H}_2\text{O}$  (75:24:1, v/v/v) aus 7 Tage alten, etiolierten Primärblattspitzen von *H. vulgare* nach unterschiedlicher Belichtung. Optischer Nachweis mit Phosphormolybdänsäure (links) bzw. durch Autoradiographie (rechts)

Tab. VI

Synthese von Galaktolipiden in etiolierten und ergrünenden Primärblättern von *H. vulgare* nach Markierung mit  $^{14}\text{C}$ -Natriumacetat<sup>+</sup>

Belichtungsdauer (Stunden)	0	4	12	24	12 + CA <sup>++</sup>
MG	657	1417	2396	2225	1536
DG	210	501	620	1030	532

<sup>+</sup>  $5 \mu\text{Ci/ml}$ , Applikationsdauer 2 Stunden vor Ende der Belichtung  
<sup>++</sup> Chloramphenicol ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), Applikationsdauer 3 Stunden vor Belichtungsende

12-stündiger Belichtung in Gegenwart von Chloramphenicol ist die MG- und DG-Syntheserate gegenüber den Kontrollen wesentlich gehemmt (Tab. VI). Sie entspricht der Synthese von MG und DG der Kontrollen während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese.

Chloramphenicol hat keinen Einfluß auf die lichtinduzierte Umwandlung des Prolamellarkörpers in Primärthylakoide (vgl. Kap. XI). Die Granathylakoidbildung wird aber in Gegenwart dieses Inhibitors gestoppt und die Galaktolipidsynthese entsprechend gehemmt. In diesem Sinne sind auch die Resultate von SMILLIE und Mitarbeitern (1972) zu verstehen, die eine Hemmung der Galaktolipidsynthese während der Chloroplastenentwicklung von *Euglena gracilis* nach Chloramphenicol-Zugabe beobachteten. Denkbar wäre, daß Chloramphenicol indirekt über eine Rückkopplung auf die Galaktolipidsynthese wirkt, d.h. mangelnde Synthese von Membranproteinen könnte zu einer verminderten Galaktolipidsynthese führen. Andererseits ist denkbar, daß Chloramphenicol direkt die Synthese der an der Galaktolipidsynthese beteiligten Enzyme hemmt.

Die unverhältnismäßig hohe Syntheserate von MG gegenüber DG während der Granathylakoidausbildung veranlaßte ROUGHAN und BOARDMAN (1972) zu der Annahme, daß MG spezifisch am Prozeß des Überschiebens von Granathylakoiden zu Granastapeln (stacking) beteiligt ist. Hinweise für diese Vermutung ergeben sich - außer dem oben beschriebenen Ergebnis der Wirkung von Chloramphenicol auf die Galaktolipidsynthese - aus den Untersuchungen von BOURDU und Mitarbeitern (1972), nach denen das MG/DG-Verhältnis in granahaltigen Chloroplasten des Mesophylls von *Zea mays* gegenüber den granafreien Chloroplasten der Leitbündelscheide erhöht ist. Ein weiteres Indiz für den Zusammenhang des MG/DG-Verhältnisses und der Verbreitung von Granastapeln geben die Untersuchungen durch v. WETTSTEIN und Mitarbeiter (1972) an sechs xantha-Mutanten von *Hordeum* mit gestörter Granathylakoidausbildung und reduziertem Galaktolipidgehalt.

Das Phospholipid Phosphatidylglycerin (PG) ist eine Komponente der Thylakoidmembran der Chloroplasten (WINTERMANS 1960, JAMES und NICHOLS 1966, BENSON 1971). Die Neubildung der Chloroplasten-

membranen heterotroph ernährter *Euglena gracilis*-Stämme durch Belichtung induziert die PG-Synthese (4-8% der Gesamtlipide). In Dunkelkulturen von *Euglena gracilis* ist PG nicht vorhanden (SCHANTZ et al. 1972) oder der PG-Gehalt liegt unter 1% der Gesamtlipide (van DEENEN und HAVERKATE 1966).

Die Syntheserate der einzelnen Phospholipide Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinosit (PI), Phosphatidyläthanolamin (PE), Diphosphatidylglycerin (DPG) in Primärblättern von *H. vulgare* mit Plastiden unterschiedlichen Differenzierungsgrades ist variabel. Da die Belichtung der Primärblätter nicht nur die Chloroplastengenese initiiert, sondern auch die Blattexpansion durch Vakuolenvergrößerung und damit mögliche Lipidsynthesen in extraplastidären Membransystemen bewirken kann, beschränken wir uns im folgenden bei der Interpretation der Ergebnisse auf Veränderungen des Phospholipids PG während der Chloroplastengenese.

Die PG-Synthese kann lichtunabhängig verlaufen. Ihre Syntheserate wird durch Belichtung stimuliert. Während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese ist die  $^{32}\text{P}$ -Einbaurrate in PG gegenüber der lichtunabhängigen Synthese in den Dunkelkulturen leicht erhöht. Nach 12 Stunden Belichtung ist die PG-Synthese stark erhöht (Abb. 32, Tab. VII). Das bedeutet, bezogen auf unterschiedliche Plastidendifferenzierungsprozesse, daß während der Phototransformation der Prolamellarkörper in Primärthylakoide nur eine geringe PG-Synthese stattfindet. Im Zeitraum der rapiden Chlorophyllsynthese ist die Granathylakoidbildung von einer relativ intensiven PG-Synthese begleitet.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von LÜRSEN (1970), TEVINI (1972), BOARDMAN et al. (1972) und ROUGHAN und BOARDMAN (1972) überein. Bei den Untersuchungen über die lichtinduzierte Chloroplastengenese in Angiospermen stellten diese Autoren während der lag-Phase der Chlorophyllsynthese nur eine geringe Nettosynthese von PG fest. Die PG-Synthese verläuft aber parallel zur Granathylakoidbildung in der logarithmischen Phase der Chlorophyllsynthese.

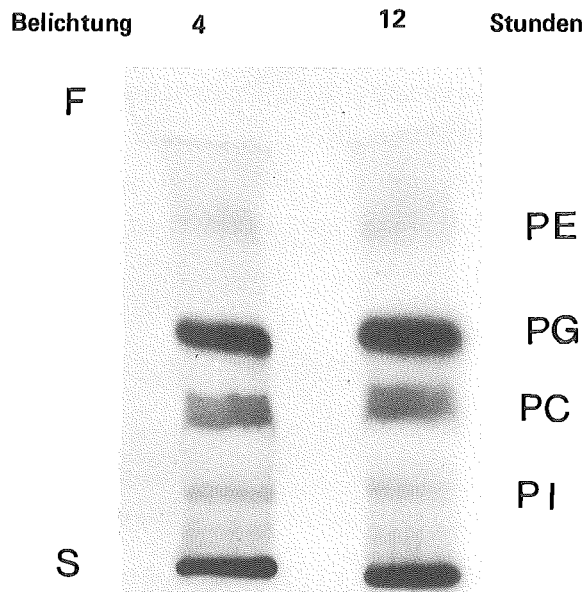


Abb. 32: Autoradiographien von DC-Trennungen  $^{32}\text{P}$ -markierter Phospholipide (PG, PC, PI, PE, DPG) auf Kieselgel-Platten aus Primärblättern etiolierter Gerste nach verschiedenen Belichtungszeiten (0, 4 und 12 Stunden)

Tab. VII

Synthese von Phospholipiden<sup>+</sup> in etiolierten, 7 Tage alten Primärblättern von *H. vulgare* nach unterschiedlicher Belichtung

Belichtungsdauer (Stunden)	0	4	12
PG <sup>++</sup>	804	1319	8629
PC	685	1219	2124
PI	329	1082	923
PE	516	1389	1558
DPG	220	417	932

<sup>+</sup> Markierung mit  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ ,  $50 \mu\text{Ci/ml}$ , 2 Stunden

<sup>++</sup> cpm/ $3 \mu\text{g}$  Lipid

Faßt man die Untersuchungsergebnisse über die plastidären Lipidsynthesen während der lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung aus Etioplasten zusammen, dann ergibt sich nur eine schwache MG-, DG- und PG-Synthese während des Umbaus der Prolamellarkörper in Primärthylakoide. Die Granathylakoidbildung verläuft mit einer intensiven MG-, DG- und PG-Synthese. In diesem Sinne wird die Vorstellung von BOARDMAN und Mitarbeitern (1972) bestätigt, daß die Prolamellarkörper die Bausteine für die Primärthylakoide sind.

#### VII. 1. Lichtinduzierte Veränderung der Plastoglobulianordnung

Plastoglobuli sind lipidreiche, osmiophile Stromabestandteile in Plastiden. Ihre chemische Zusammensetzung, Verbreitung und Vorkommen in verschiedenen Plastidentypen und -differenzierungsstadien ist intensiv durch LICHTENTHALER und Mitarbeiter untersucht worden. Seit ihrer Isolierung mit Hilfe der French-Press (BAILEY und WHYBORN 1963) oder Ultraschallbehandlung (PARK und PON 1961, LICHTENTHALER 1964) aus isolierten Chloroplasten durch differentielle Zentrifugation wurden zahlreiche Details über die Lipidzusammensetzung - speziell in Zusammenhang mit degenerativen Chloroplastenstadien und der Chromoplastengnese - publiziert. Als charakteristische Merkmale der Plastoglobulizusammensetzung in Chloroplasten können gelten

- die hohe Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocochinon und Plastochinon (LICHTENTHALER und SPREY 1966);
- der hohe Gehalt der Carotinoid-Vorstufe Phytoen (BAILEY et al. 1966);
- das Fehlen von Chlorophyllen und  $\beta$ -Carotin.

Bezüglich der Kinetik der Plastidendifferenzierung und des Plastoglobuligehaltes und der Plastoglobuligröße lassen sich

folgende Zusammenhänge aufführen:

- ubiquitäre Verbreitung von Plastoglobuli bei der monotrophen Plastidenentwicklung (LICHTENTHALER 1966);
- umgekehrte Proportionalität von Plastoglobuligröße und -gehalt gegenüber der Thylakoidmenge bei der Chloroplastendegeneration (BARTON 1966, LICHTENTHALER 1969 a), bei der Reversion von Chloroplasten in vergilbenden Blättern von *Nicotiana rustica* (LJUBESIC 1968), bei der Reversion von Chromoplasten zu Chloroplasten in *Citrus sinensis* (THOMSON et al. 1967) und wiederergrünenden Plastiden von *Cryptomeria japonica* (TOYAMA und FUNAZAKI 1971) und bei der Chromoplastengnese (SPURR und HARRIS 1968);
- erhöhter Carotinoidgehalt in degenerierenden Plastiden (LICHTENTHALER 1969 a, b), erhöhter Plastidenchinongehalt und (Sekundär-)Carotinoidgehalt in Chromoplasten (LICHTENTHALER und WEINERT 1970, KLEINIG und WRISCHER 1968, SPREY 1970).

Der Zusammenhang von Größe, Häufigkeit sowie Lipochinongehalt in alten Chloroplasten und Chromoplasten und das Verhalten der Plastoglobuli während der Chloroplastengnese aus Etioplasten (SPREY und LICHTENTHALER 1966) führte zu der Auffassung, die Plastoglobuli als Speicherorte für überschüssige Plastidenchinone anzusehen.

In der S 2-Fraktion (heavy fraction) von Plastoglobuli aus *Beta vulgaris* beträgt der Stickstoffgehalt 11 - 13,5%, in der G 2-Fraktion (light fraction) beträgt er nur 0,88% (BAILEY et al. 1966). Dies war der Anlaß für die folgende vergleichende Untersuchung über das Vorkommen von Proteinen in Plastoglobuli aus Etioplasten, ergrünenden Plastiden und Chloroplasten aus Primärblättern von *H. vulgare*. Darüber hinaus interessierte der Vorgang, wie die in hexagonal-dichtester Packung im Etioplastenstroma angeordneten Plastoglobuli im Zuge der Chloroplastengnese vereinzelt wurden.

Plastoglobuli wurden aus Etioplasten, ergrünenden Plastiden und Chloroplasten (aus 7 Tage alten Dunkelkulturen, 12 Stunden be-

lichteten und 7 Tage kontinuierlich belichteten Primärblättern) nach der von uns beschriebenen Methode isoliert (LICHTENTHALER und SPREY 1966). Um saubere, d.h. nicht durch Stromaproteine verunreinigte Plastoglobuli als Ausgangsmaterial für die folgende Untersuchung zu erhalten, wurde die Plastoglobuli-Fraktion solange mit Phosphatpuffer über Millipore-Filter gewaschen, bis das Eluat frei von löslichen Proteinen war (LOWRY et al. 1951). Es wurden nur Fraktionen verwendet, die nach elektronenmikroskopischer Prüfung frei von Thylakoidresten waren (Abb. 33) und die - im Falle der Chloroplasten - absolut chlorophyllfrei waren.

Nach Extraktion der Proteine aus der Plastoglobulifraktion mit 0,1% SDS-haltigen Phosphatpuffer (pH 6,8) und Trennung in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen erhält man zwei mit Amidoschwarz anfärbbare Banden. Anzahl und Lage der Proteinbanden aus den drei untersuchten Differenzierungsstadien (Etioplasten, ergrünende Plastiden und Chloroplasten) in den 7,0%igen Gelen waren identisch (Abb. 34).

Vorausgesetzt, es handelt sich im Falle der beiden Amidoschwarz-positiven Banden um Proteine und nicht um Lipoproteine, dann ist eine Bestimmung der Molekulargewichte durch Co-elektrophorese mit Eichproteinen möglich (vgl. Kap. VI). Die Bestimmung der Molekulargewichte beider Fraktionen durch SDS-haltige (0,1 bzw. 1,0%) Referenzgele mit Proteinen von bekanntem Molekulargewicht ergab für das Protein mit der höheren elektrophoretischen Beweglichkeit ein Molekulargewicht von 18 000, für das langsam wandernde Protein ein Molekulargewicht von 310 000 Daltons.

Da aufgrund der Isolierungsmethode auszuschließen ist, daß es sich um eine Verunreinigung von Stromaproteinen oder von Proteinen aus Thylakoidresten handelt, müssen beide Banden als (Lipo?-)Proteinbestandteil der Plastoglobuli angesehen werden. Ob die in den Plastoglobuli von *H. vulgare* gefundenen Amidoschwarz-positiven Proteinbanden auch in den Plastoglobuli anderer Arten verbreitet sind, sollen weiterführende Untersuchungen klären. Funktion und Zuordnung beider Proteine zu einem spezifischen Strukturmerkmal (periphere Membran?) der Plastoglobuli sind völlig unbekannt.

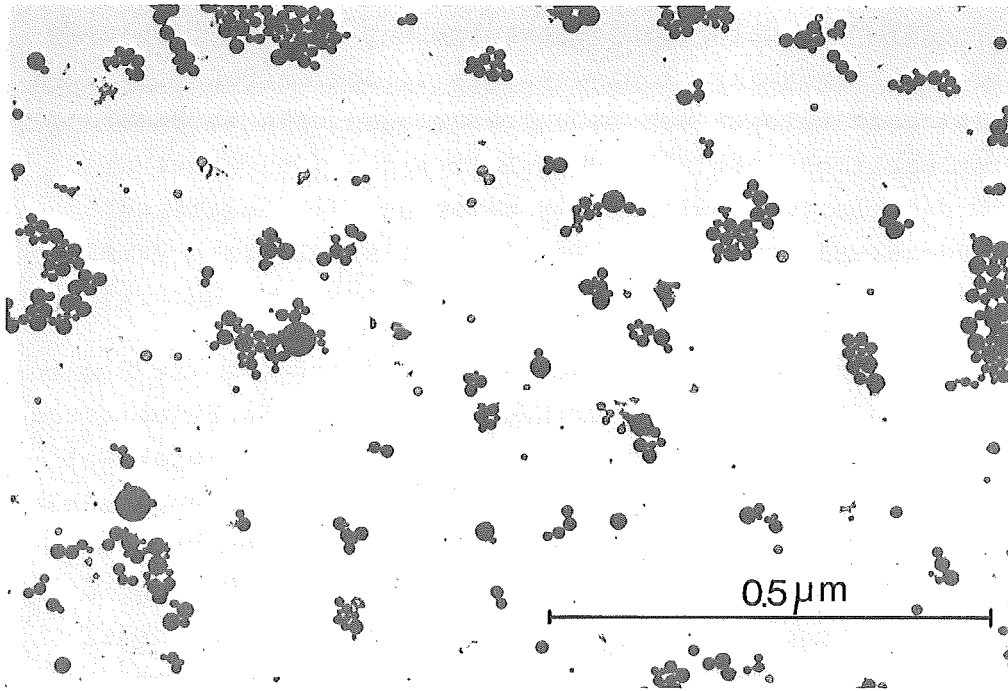


Abb. 33: Isolierte Plastoglobuli aus Etioplasten von *H. vulgare*. Isolationsbedingungen: s. Text;  $\text{OsO}_4$ -Fixierung

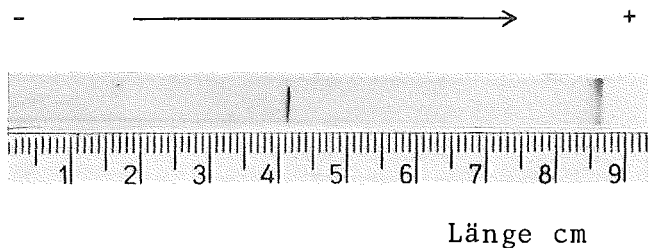


Abb. 34: Proteine aus isolierten Plastoglobuli von Etioplasten nach gelelektrophoretischer Trennung (7% Acrylamid) in Gegenwart von 0,1% SDS. Das Molekulargewicht der langsam wandernden Bande ist  $3,1 \times 10^5$ , das der schnell wandernden Bande beträgt  $1,8 \times 10^4$  Daltons

Im Zusammenhang mit Versuchen über die Funktion der Plastoglobuli und der Membranbildungsprozesse in ergrünenden Plastiden durch chase-Experimente mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat wurden Anordnung und Lageveränderung der Plastoglobuli in verschiedenen Differenzierungsstadien (Etioplast, ergrünende Plastide, Chloroplast) ultrastrukturell untersucht.

Um den Vorgang der Veränderung der Plastoglobulianordnung während

der lichtinduzierten Chloroplastenentwicklung zu quantifizieren, wurden die elektronenmikroskopischen Mikrographien von Plastiden mit quadratischen Feldern von  $0,25\mu^2$  überzogen. Die Veränderung der Plastoglobulizahl pro Flächeneinheit wurde prozentual als Verhältnis der Plastoglobulizahl in bezug auf die Gesamtzahl der Flächenquadrate von je 25 Plastiden aus etiolierten Primärblättern und aus 12 Stunden belichteten Blättern ausgedrückt.

Die Abbildung 35 zeigt die unterschiedliche Anordnung der Plastoglobuli in Etioplasten und ergrünenden Plastiden. In Etioplasten von *H. vulgare* sind die Plastoglobuli überwiegend in hexagonal dichtester Packung an der Prolamellarkörperperipherie angeordnet (Abb. 36). Im Zuge der lichtinduzierten Umordnung des Prolamellarkörpers wird die gruppenförmige Anordnung der Plastoglobuli verändert. Diese Umordnung ist eine Folge der Membranbildungsprozesse in den Plastiden und führt zur solitären Anordnung der Plastoglobuli im Stroma der Chloroplasten.

Dabei lassen sich - entsprechend den Veränderungen des Membransystems durch Belichtung - drei Phasen unterscheiden:

- Anordnung der Plastoglobuli in den Etioplasten in Kugelhaufen mit hexagonal dichtester Packung (Abb. 36).
- Umordnung der Plastoglobuli in Schichtebenen während der lag- und log-Phase der Chlorophyllsynthese. Dieser Zustand wird nach Durchdringung der kugelhaufenartigen Anordnung der Plastoglobuli mit Primärthylakoiden erreicht (Abb. 37).
- Vereinzelung der Plastoglobuli im Zuge der Granathylakoidbildung und der Granastapelausbildung in der logarithmischen Phase der Chlorophyllsynthese (Abb. 38, 39).

Als Fazit der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist die Umordnung der hexagonal dichtesten Packung der Plastoglobuli in den Etioplasten eine Folge lichtinduzierter Membranbildungsprozesse in den Plastiden, die zu der für Chloroplasten typischen, solitären Verbreitung der Plastoglobuli führt. Unter physiologischen Aspekten erscheint dies sinnvoll, weil die Plastoglobuli in Regionen aktiver Lipidsynthese an der Membranperipherie vorhanden und verbreitet sind.

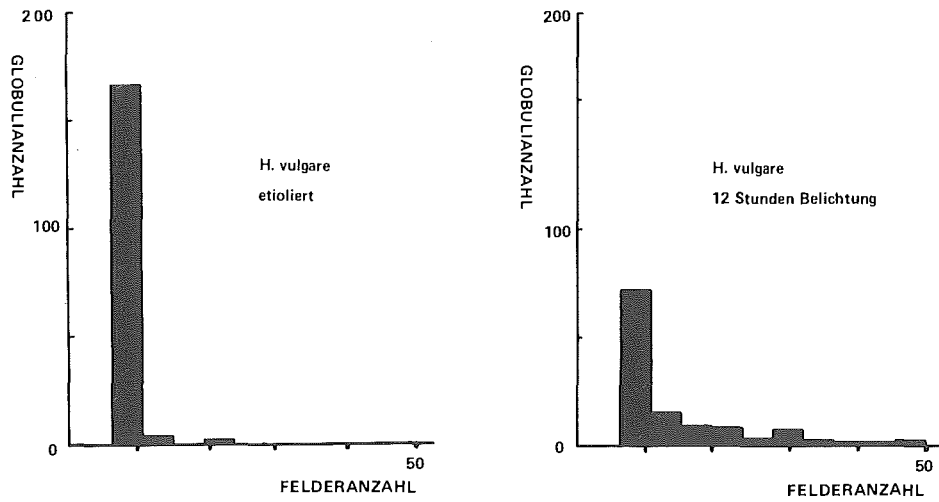


Abb. 35: Verteilung der Plastoglobuli in Etioplasten und Chloroplasten (12 Stunden Belichtung) von *H. vulgare*

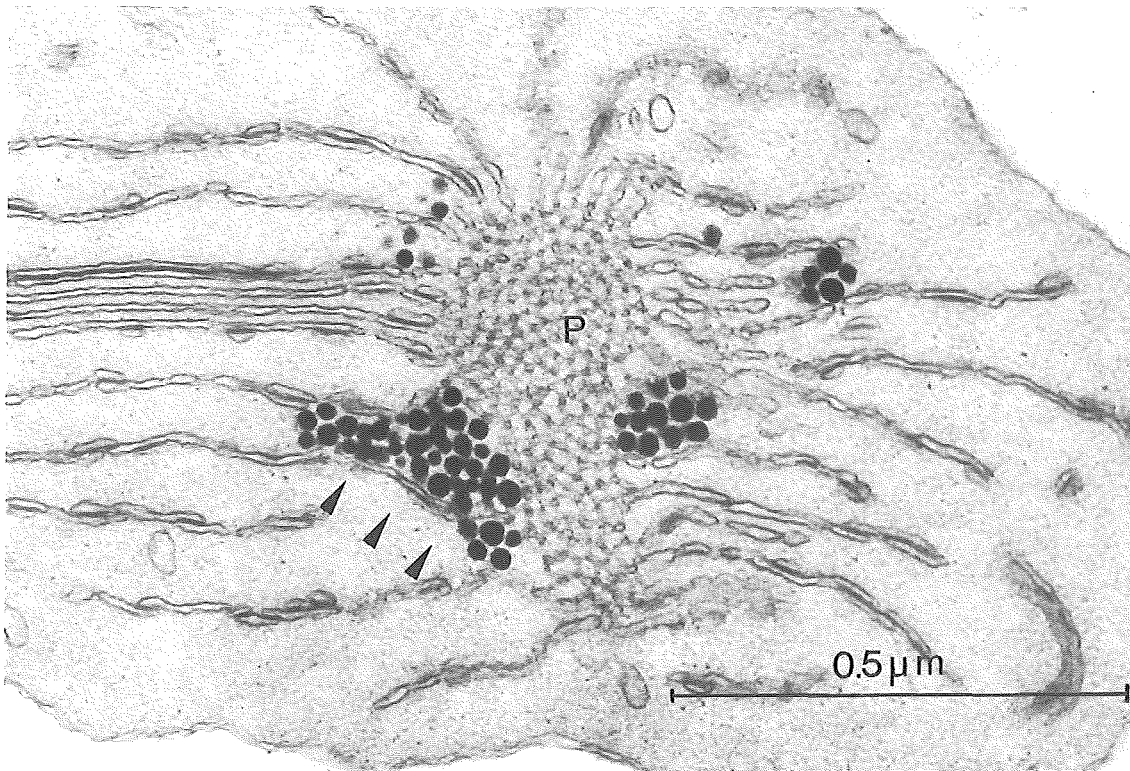


Abb. 36: Anordnung der Plastoglobuli in Etioplasten 7 Tage alter Primärblätter von *H. vulgare* an der Peripherie des Prolamellarkörpers

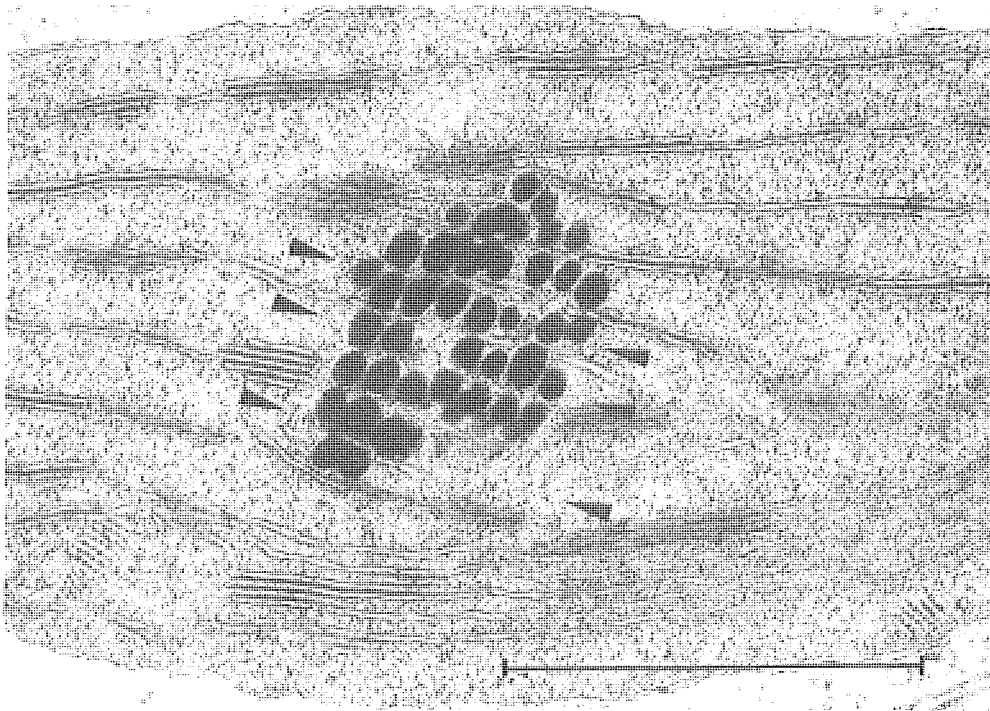


Abb. 37: Umordnung der Plastoglobuli in Schichtebenen durch Thylakoide zu Beginn der log-Phase der Chlorophyll-synthese

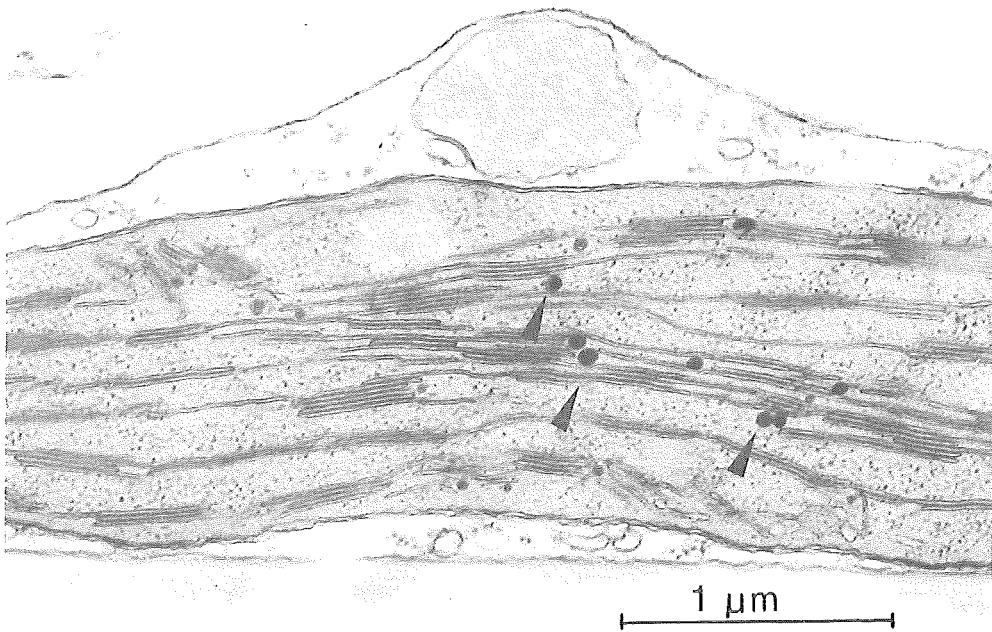


Abb. 38: Plastoglobuli der Plastiden von *H. vulgare* in solitärer Anordnung (12 Stunden Belichtung) infolge Granathylakoidbildung

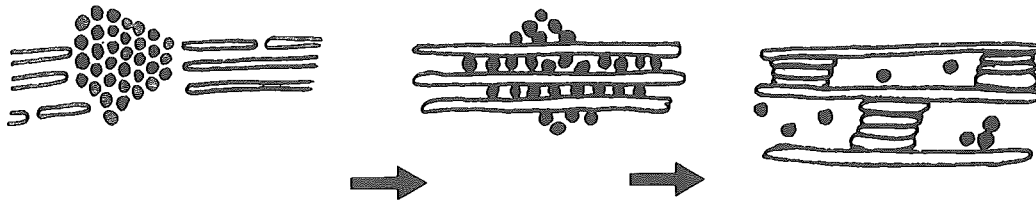


Abb. 39: Veränderung der Anordnung von Plastoglobuli in Etioplasten, ergrünenden Plastiden und Chloroplasten infolge von Membranbildungsprozessen

Weitere Hinweise über den Zusammenhang von Plastoglobulianordnung und Ausprägung des Thylakoidsystems ergeben sich aus Untersuchungen mutativ veränderter Entwicklung von Chloroplasten (v. WETTSTEIN et al. 1970; WALLEES 1971) oder durch strahlungsbedingte Blockierung der Chloroplastenentwicklung (SPREY 1972). Chlorophylldefekte Plastiden dieses Typs mit schwach ausgeprägtem Thylakoidsystem haben überwiegend gruppenförmig angeordnete Plastoglobuli.

### VIII. Membranassoziierte Plastiden-DNA: Isolierung und Abbildung

Chloroplasten-DNA ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen zum Nachweis des Autonomiegrades dieser Organelle in Eukaryontenzellen. Wenig Information ist über DNA in Etioplasten vorhanden: sie beschränkt sich auf den elektronenmikroskopischen Nachweis der DNA-Fibrillen im histonfreien Nucleoplasma des Stromas in Ultradünnschnitten mit Hilfe der selektiven Bindung von Uranylionen (GUNNING 1965, YOKOMURA 1967, SPREY 1968).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Herstellung weitgehend reiner, intakter Fraktionen von Etioplasten und die Extraktion und Spreitung ihrer DNA in Proteinmischfilmen. Die Isolierung reiner Etioplasten - d.h. unter elektronenmikroskopischen Aspekten - die Präparation von Plastiden mit geschlossener, doppelter Hüllmembran vergleichbar ihrer Form und Struktur in vivo - ist schwieriger als die Gewinnung intakter Chloroplastenfraktionen, weil den Etioplasten der stabilisierende Faktor eines ausdifferenzierten Grana- und Stromathylakoidsystems weitgehend fehlt. Im Saccharosegradienten erhielten wir eine reine Fraktion mit feinstrukturell gut erhaltenen Etioplasten. Diese wurden nach der Zentrifugation durch Waschen mit dest. Wasser osmotisch aufgebrochen und direkt - oder nach Pronasebehandlung - mit Cytochrom c versetzt und auf Ammoniumacetat gespreitet ('one step release'-Methode, KLEINSCHMIDT 1968). Alternativ dazu wurden die Nucleinsäuren der Etioplastenfraktion mit Phenol extrahiert. Lösliche und ribosomale RNA wurde enzymatisch mit RNase bzw. durch Fraktionierung auf der MAK-Säule von der Etioplasten-DNA entfernt. Die Methoden wurden in bezug auf die elektronenmikroskopisch abgebildeten Moleküllängen der kegelbedampften Etioplasten-DNA verglichen.

#### a) Etioplastenisolierung

Gerste der Sorte 'Bido' wurde 6 - 8 Tage in großen Petrischalen (23 cm Ø) auf feuchtem Filterpapier bei Zimmertemperatur dunkelkultiviert. Die Primärblätter (500 g Frischgewicht) wurden ober-

halb der Coleoptile abgeschnitten und mit destilliertem Wasser wiederholt gewaschen. Die Primärblattstückchen wurden mit der doppelten Gewichtsmenge an Extraktionspuffer versetzt. Der kalte ( $4^{\circ}\text{C}$ ), 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8) war 0,5 M an RNase-freier Saccharose und enthielt als Fixierungsmittel für die Elektronenmikroskopie 2,5% Glutaraldehyd (Ladd Res. Industries). Die Blattstückchen wurden 15 - 30 Sekunden in eisgekühlten Edelstahlbechern homogenisiert (Sorvall-Omnimixer, 12 000 Upm). Die Blatthomogenisierung für die Etioplastenisolierung und die weitere Untersuchung von Fraction I-Protein und Nucleinsäuren erfolgte im Glutaraldehyd-freien Extraktionspuffer. Das Homogenat wurde durch achtfache Mullgaze filtriert und 5 Minuten mit 2 000 g zentrifugiert und das Sediment in 2 - 6 ml Extraktionspuffer, der zusätzlich 0,01 M EDTA enthielt, suspendiert und durch vierfache Mullgaze filtriert.

Mit etwa 1 ml Probenvolumen wurde ein diskontinuierlicher, phosphatgepufferter Gradient aus RNase-freier Saccharose (10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) austariert. Der Gradient wurde kurz vor der Probenaufgabe im Kühlraum geschichtet. Dazu wurden je 7 ml 2,5 M; 2,0 M; 1,5 M und 8 ml 1,0 M Saccharoselösung in die 30 ml Cellulose-nitrat-Röhrchen des SW 25.1 Rotors der Beckman Spinco L 50-Zentrifuge überschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation mit 10 000 Upm (max. 14 500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sind vier Zellfraktionen vorhanden (Abb. 40). Alternativ wurden diskontinuierliche Saccharose-Gradienten mit Ficoll-Dextran-Zusatz (HONDA-Medium) verwendet (SPENCER und WILDMAN 1964, HADZIYEV et al. 1968). Saubere Trennungen der Zellorganelle erhält man nur, wenn der Gradient nicht überladen ist: wird zuviel Probenvolumen aufgetragen, trennen sich die Fraktionen 2 und 3 nicht auf, und die Fraktion 3 ist durch die Fraktion 4 kontaminiert (vgl. Abb. 40).

#### b) Isolierung von Fraction I-Protein

Als Kriterium für den Reinheitsgrad der Etioplastenfraktion wurde neben der elektronenmikroskopischen Kontrolle der Gehalt an plastidenspezifischem Fraction I-Protein bestimmt. Die abgetropften Fraktionen wurden gegen 0,015 M Tris, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,5 mM Cysteinhydrochlorid dialysiert (pH 8,3) und 30 Minuten

zentrifugiert (145 000 g). Fraction I-Protein wurde säulen-  
chromatographisch (Pharmacia K 15/45 Säule) an Sephadex G-100  
von den weiteren löslichen Stromaproteinen getrennt (KANNANGARA  
1969). Das Eluat wurde mit aquacide II eingengt, TCA-gefällt  
und der Proteingehalt colorimetrisch bestimmt (LOWRY et al.  
1951).

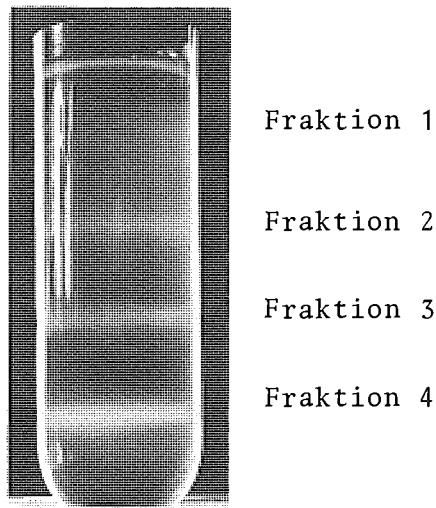


Abb. 40: Diskontinuierlicher Saccharosegradient mit zerbrochenen  
Etioplasten (Fraktion 2) und ganzen Etioplasten  
(Fraktion 3)

#### c) Nucleinsäureextraktion

Die Fraktion 3 (unzerbrochene Etioplasten) wurde abgetropft  
und mit der dreifachen Menge Saccharose-freiem Phosphatpuffer  
(0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,9) verdünnt, gegen  
Phosphatpuffer dialysiert und mit 25 000 Upm (max. 90 000 g)  
im SW 25.1 Rotor 60 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde  
mit Phenol extrahiert (KIRBY et al. 1967). Dazu wurde das Etio-  
plastensediment mit je 2 ml NPA (6% Natrium-p-aminosalicylat  
in dest.  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 2 ml Phenol-m-Kresol versetzt und 12 Stunden  
in einer Mischapparatur durch Drehung in vertikaler Ebene ge-  
mischt (24 Upm,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Äthanol-Kresol gefällten Etioplasten-  
nucleinsäuren ( $-20^\circ\text{C}$ ) wurden abzentrifugiert, in Phosphatpuffer,  
der 0,01 M EDTA enthält, gelöst, mit RNase abgebaut (1 mg/ml,

37°C, 90 Minuten) und mit gleichem Volumenanteil Isoamylalkohol-Chloroform (1:24, v/v) versetzt und in horizontaler Lage mit einem Rührmotor durchmischt (20 Minuten, 4°C). Nach Phasentrennung durch Zentrifugation wurde der Überstand direkt zur Spreitung verwendet.

#### d) Nucleinsäuretrennung

Alternativ zum enzymatischen RNA-Abbau wurden die phenolextrahierten Nucleinsäuren (50-200 O.D.) aus isolierten Etioplasten und etiolierten Primärblättern säulenchromatographisch mit methyliertem Albumin an Kieselgur (MAK) fraktioniert (SUEOKA und CHENG 1962). Die löslichen Nucleinsäuren wurden mit phosphatgepuffertem 0,5 M NaCl (pH 6,9) eluiert. Die DNA wurde im 0,1 M phosphatgepufferten (pH 6,9) Gradienten (0,5 M - 1,0 M NaCl) von der MAK-Säule eluiert. Anschließend wurde die gesamte ribosomale RNA mit phosphatgepuffertem 1,5 M NaCl eluiert. Die DNA wurde mit Isoamylalkohol-Chloroform gereinigt, mit Äthanol gefällt (-20°C) und in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,9) oder SSC-Puffer gelöst (0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,1) und sofort zur Spreitung benutzt (KLEINSCHMIDT 1968).

#### e) Spreitung in Proteinmischfilmen

Zur Spreitung der DNA in Proteinmischfilmen wurden 0,02 ml isolierte Etioplasten oder gelöste Etioplasten-DNA (Konzentration 2 µg/ml) mit 0,08 ml 3 M Ammoniumacetat (pH 5,0), 0,02 ml Cytochrom c (0,06% in bidest. H<sub>2</sub>O) und 0,001 ml Isopropanol (1,0% in bidest. H<sub>2</sub>O) gemischt. Davon wurde 0,1 ml mit Hilfe eines schräggestellten Glasobjektträgers auf einem mit 0,3 M Ammoniumacetat (pH 5,0) gefüllten, teflonbeschichteten Aluminiumtrog (Fusion Labs Division) gespreitet. Nach Adsorption der gespreiteten DNA an Formvar-befilmte Cu-Netzchen und Reinigung mit dest. H<sub>2</sub>O und Isopropanol wurde mit einer Kegelbedampfungseinrichtung (Edwards E12E2) im Hochvakuum (10<sup>-4</sup> Torr) enggewickelter Platindraht (6 cm Länge, 0,1 mm Durchmesser) von einem Wolframdraht (2 mm Durchmesser) unter einem Winkel von 6-8° aufgedampft (11-14 Umdrehungen des Probentellers während der Bedampfung).

Neben der Lysis isolierter Etioplasten und der Spreitung ihrer DNA wurde die gereinigte Plastidensuspension mit DNase-freier Pronase (4 mg/ml in 1% NaCl, CHATTORAJ 1971) behandelt.

#### f) Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Abbildung der DNA (Siemens Elmiskop I, Kondensoraperturblende 100  $\mu$ m, Objektivblende 15  $\mu$ m, Hochspannung 60 kV) wurde eine 10 000-fache Primärvergrößerung benutzt. Auf der IBM-370-Rechenanlage der Kernforschungsanlage Jülich (Zentralinstitut für Angewandte Mathematik) wurde die Längenverteilung von 568 Einzelobjekten berechnet. Die Endvergrößerung wurde mit Hilfe eines Eichgitters (E. Fulham, NY.) bestimmt. Das Eichgitter wurde bei gleicher Primärvergrößerung photographiert und sekundär gleich stark vergrößert. Die Benutzung verschiedener Projektoren (Anfertigung eines Zwischenpositivs und Vergrößerung mit einem Episkop) ergab einen maximalen, durch die Vergrößerung bedingten Fehler von 3%. Dieser Fehler wurde im benutzten FORTRAN-Programm berücksichtigt. Die Moleküllängen wurden nach der bei KLEINSCHMIDT und Mitarbeitern (1962) angegebenen Methode bestimmt. Die Gesamtvergrößerung betrug 269 000.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der mit Glutaraldehyd fixierten und im Saccharose-Gradienten getrennten Etioplasten wurden die Fraktionen abgetropft, in OsO<sub>4</sub> fixiert und in Epon eingebettet (SABATINI et al. 1968, SPURR 1971). Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat kontrastiert (REYNOLDS 1963) und elektronenmikroskopisch untersucht.

Nach Homogenisierung etioliertes Gerstenblätter und Zentrifugation erhält man im diskontinuierlichen Saccharosegradienten vier sauber getrennte Fraktionen (Abb. 40). Direkt auf der Gradientenoberfläche schwimmt eine nicht sedimentierbare, graugelbliche Lipidschicht aus Plastoglobuli. Eine schmale graue Zone (Fraktion 1), die überwiegend Mitochondrien, Membranreste, Ribosomen und lösliche Proteine enthält, befindet sich im Überstand.

Über der Grenzschicht von 1,0 - 1,5 M Saccharose befindet sich eine gelbe Zone (Fraktion 2) aus zerbrochenen Etioplasten und

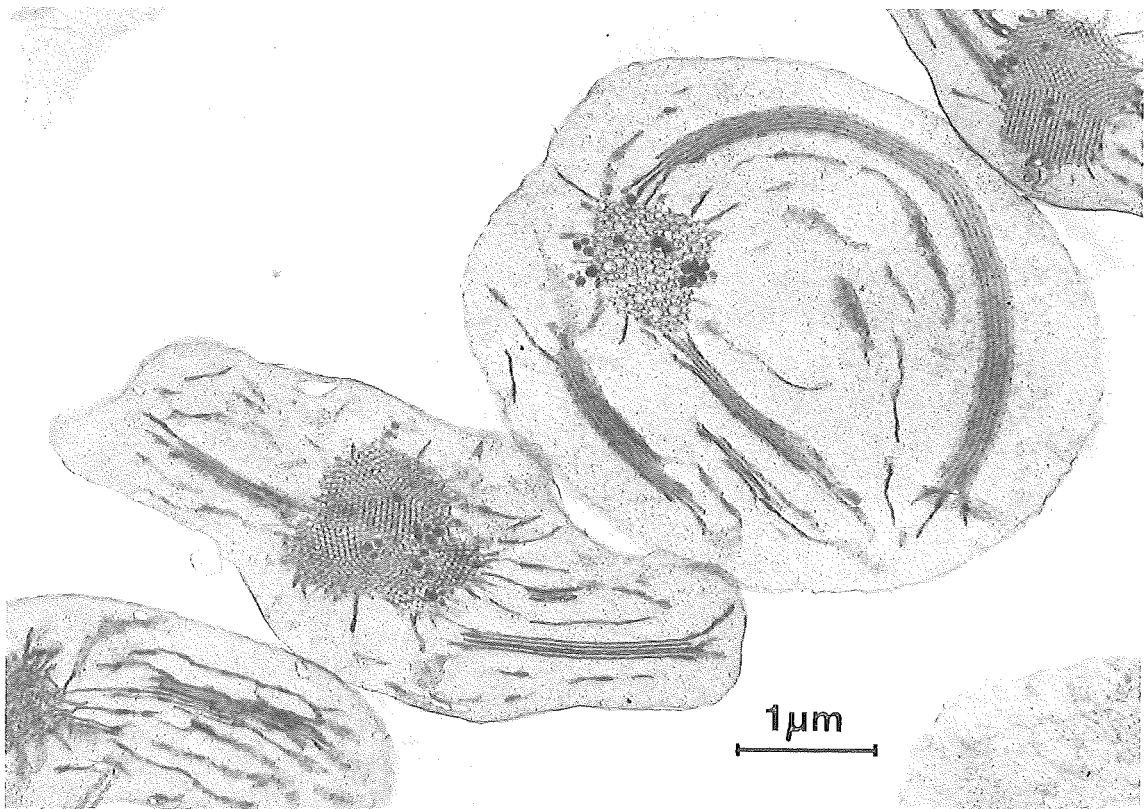
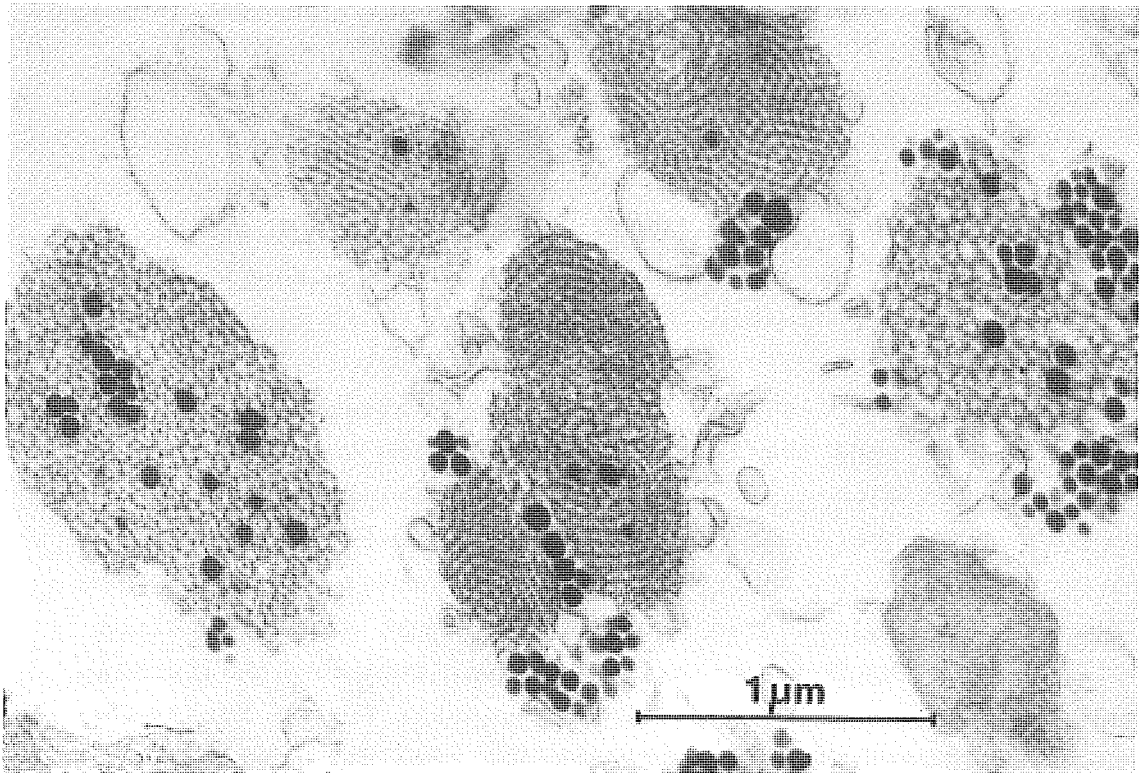
wenigen morphologisch intakten Etioplasten (Abb. 40). Sie enthält nach Vorfixierung mit Glutaraldehyd überwiegend ultrastrukturell gut erhaltene Prolamellarkörper, Stromathylakoide, Mitochondrien und nicht näher identifizierbare Zellbestandteile. Die Etioplastenmembranen aus dieser Fraktion sind nach elektronenmikroskopischer Untersuchung weitgehend frei von anhaftenden Stromaresten (Abb. 41, Tab. IX). Die intensiv gelb gefärbte dritte Zone in der Schicht von 1,5 M Saccharose enthält einen hohen Prozentsatz ultrastrukturell gut erhaltener Etioplasten, die nur durch wenige Mitochondrien verunreinigt sind (Abb. 42, Fraktion 3). Diese Fraktion ist - falls der Gradient nicht mit zuviel Probenvolumen überladen wird - frei von Kernen. Bakterienkontaminationen ließen sich elektronenmikroskopisch weder in der Fraktion 2 noch in der Fraktion 3 nachweisen. Die Etioplasten dieser Zone gleichen in ihrer Ultrastruktur weitgehend dem Aussehen der Etioplasten *in vivo*: sie sind mit einer doppelten Plastidenhülle umgeben, enthalten ein oder zwei Prolamellarkörper und wenige Stromathylakoide. Im Gegensatz zu den linsenförmigen Etioplasten der Mesophyllzellen sind die isolierten, glutaraldehyd-fixierten Etioplasten häufig etwas angeschwollen. Im Plastidenstroma sind Plastoglobuli, Ribosomen, fibrilläre Bündel (des Fraction I-Proteins?) und DNA-haltige Stromaareale vorhanden (Abb. 43). Etwa 18% dieser Fraktion sind zerbrochene Etioplasten, d.h. in erster Linie stromafreie Plastidenreste, die nur aus Prolamellarkörpern, Stromathylakoiden und Hüllmembranresten bestehen. Das Stroma und die Plastoglobuli sind infolge der Beschädigung der Plastidenhüllen bei der Isolierung weitgehend ausgeflossen. Die Verunreinigung dieser Fraktion 3 ist mit 11% relativ hoch. Es handelt sich jedoch in erster Linie um Membranreste nicht plastidärer Herkunft, die bei der Partikelanzählung pro Flächeninhalt mit berücksichtigt wurden.

Eine im Aussehen graue Zone (Fraktion 4) befindet sich über der

---

Abb. 41: Isolierte Prolamellarkörper aus der Fraktion 2 nach Glutaraldehyd-Zusatz (2,5%) zum Extraktionspuffer

Abb. 42: Isolierte Etioplasten aus der Fraktion 3. Isolierungsbedingungen unter Glutaraldehydzusatz



Sprungschicht von 2,0 - 2,5 M Saccharose. Diese Zone ist frei von Etioplasten (Abb. 40).

Die Untersuchung des Fraction I-Proteins und der Nucleinsäuren nach Plastidenisolation mit Glutaraldehyd-freien Extraktionspuffern führt zu diesen Ergebnissen. Die Verteilung des Fraction I-Proteins in den vier Einzelfraktionen zeigt folgende Verteilung nach säulenchromatographischer Trennung an Sephadex G-100. Erwartungsgemäß war die Konzentration des Fraction I-Proteins im Überstand (Fraktion 1) mit 65,6% am höchsten. Fraktion 2 (zerbrochene Etioplasten) enthielt 10,9% Fraction I-Protein gegenüber 23,4% in der Fraktion 3 (intakte Etioplasten). Fraktion 4 war völlig frei von Fraction I-Proteinen.

Tab. IX

Prozentuale Verteilung von Etioplasten im Saccharosegradienten nach Glutaraldehyd-Zusatz

	Etioplasten		Mitochondrien	Cytoplasmat. Bestandteile
	intakt	zerbrochen		
Fraktion 2	4,5	73,5	17,3	4,7
Fraktion 3	64,0	17,9	6,9	11,2

Nach Fraktionierung der phenolextrahierten Nucleinsäuren aus der Etioplastenfraktion 3 auf der MAK-Säule (Abb. 44) und Spreitung der gereinigten DNA ergaben sich folgende Verhältnisse für die Längenverteilung der Etioplasten-DNA (Abb. 47): Bei Berücksichtigung aller Bruchstücke liegt das Maximum der Längenverteilung der Etioplasten-DNA bei 3 - 5  $\mu$ m. Etwa 10% der DNA hatte Längen von über 10  $\mu$ m. Die größten, linearen Moleküle waren 27  $\mu$ m lang (Abb. 45, 46).

Das Verteilungsdiagramm ist für phenolextrahierte Etioplasten-

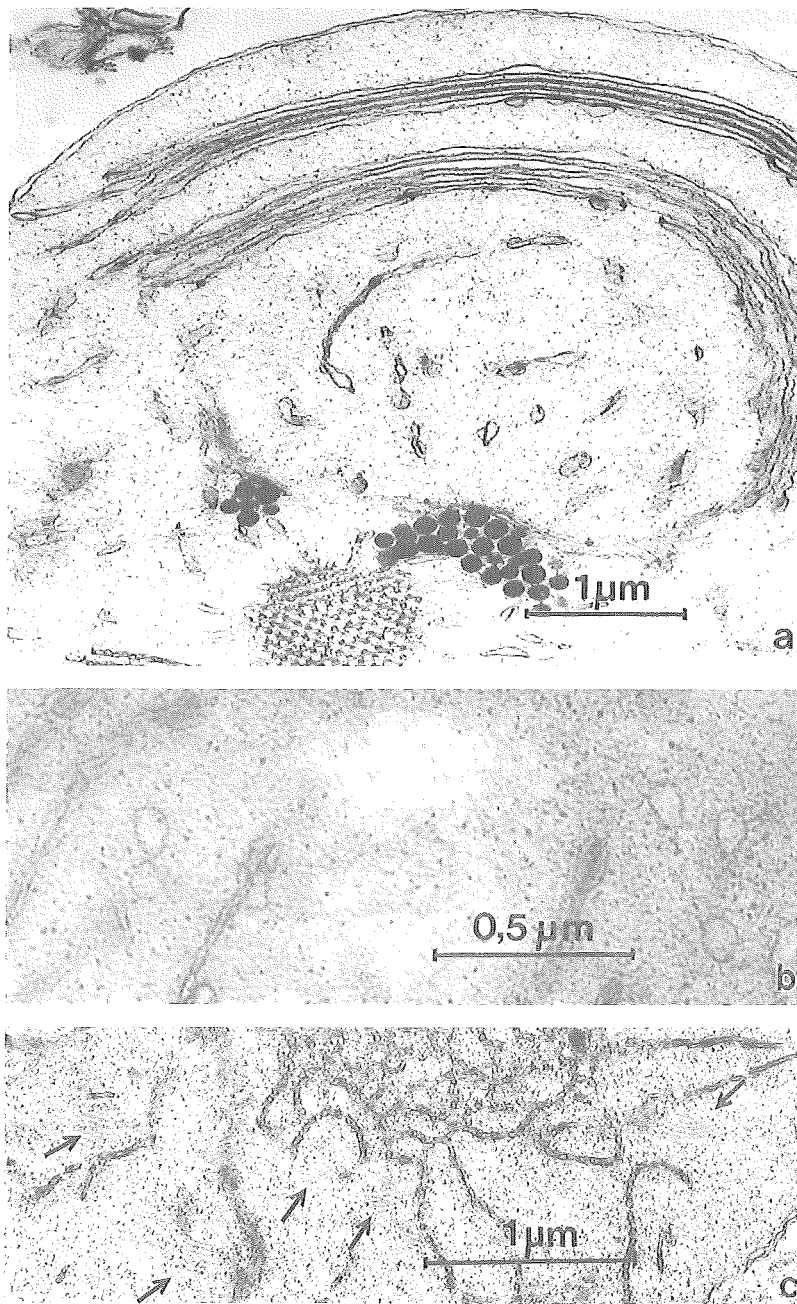


Abb. 43: Ausschnitte aus isolierten Etioplasten der Fraktion 3 mit doppelter Plastidenhüllmembran, Prolamellarkörper, Plastoglobuli (Abb. 43a), mit DNA-haltigen Stromaarealen nach Uranylacetatkontrastierung (Abb. 43b) und mit parakristallin angeordnetem (Fraction I ?) Protein (Abb. 43c, s. Hinweispfeile). Isolierungs- und Fixierungsbedingungen wie in Abb. 41, 42

nucleinsäuren, deren RNA enzymatisch abgebaut wurde, identisch. In allen Fällen ist die Etioplasten-DNA nach dreimaliger Phenol-extraktion frei von anhaftenden Membranen bzw. Membranresten. Ringförmige DNA wurde nach Phenolextraktion der Etioplasten-DNA selten gefunden. In den meisten Fällen war die DNA linear und ließ sich durch DNase ( $10\mu\text{g/ml}$ , 30 Minuten,  $35^{\circ}\text{C}$ ) abbauen.

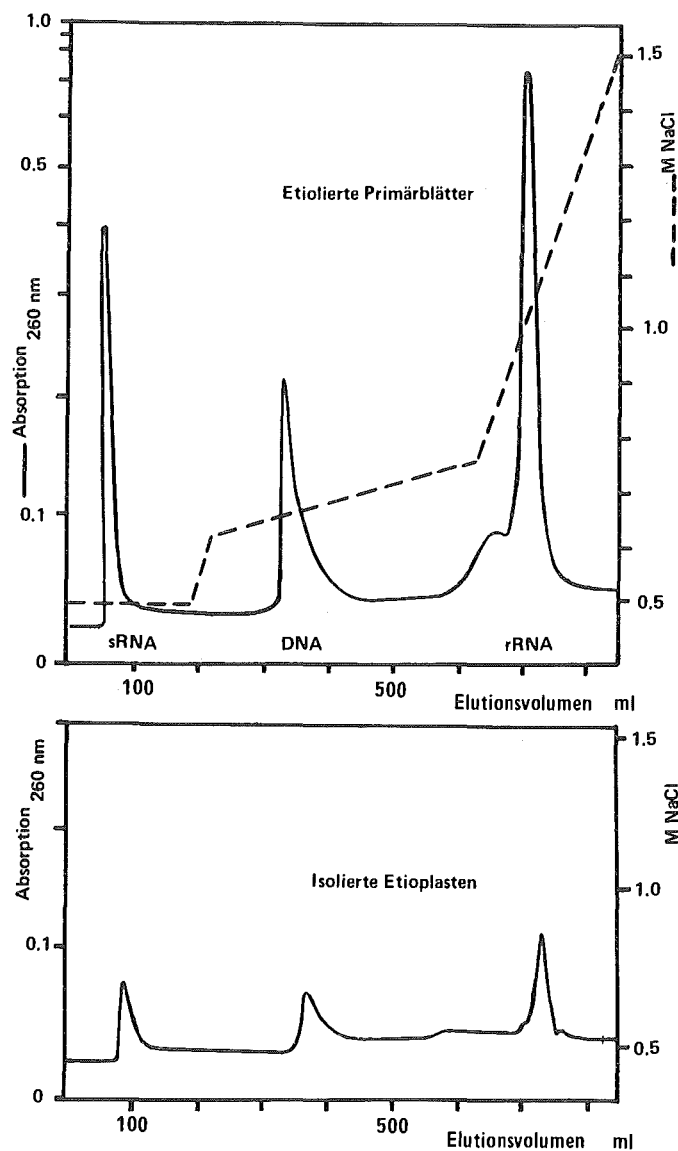


Abb. 44: Trennung von Nucleinsäuren aus etiolierten Primärblättern und isolierten Etioplasten (Fraktion 3) im diskontinuierlichen NaCl-Gradienten auf MAK-Säule

Die direkte Spreitung nach Lysis der gereinigten Etioplasten und nach teilweise enzymatischen Abbau der Plastidenproteine durch Pronase ergibt eine Vielzahl von Objekten, die denen in Abbildung 48 und 49 vergleichbar sind. Sofern die Moleküllängen nach der oben beschriebenen Methode der Längenverteilung überhaupt meßbar sind und nicht durch Überlagerung von Membranen

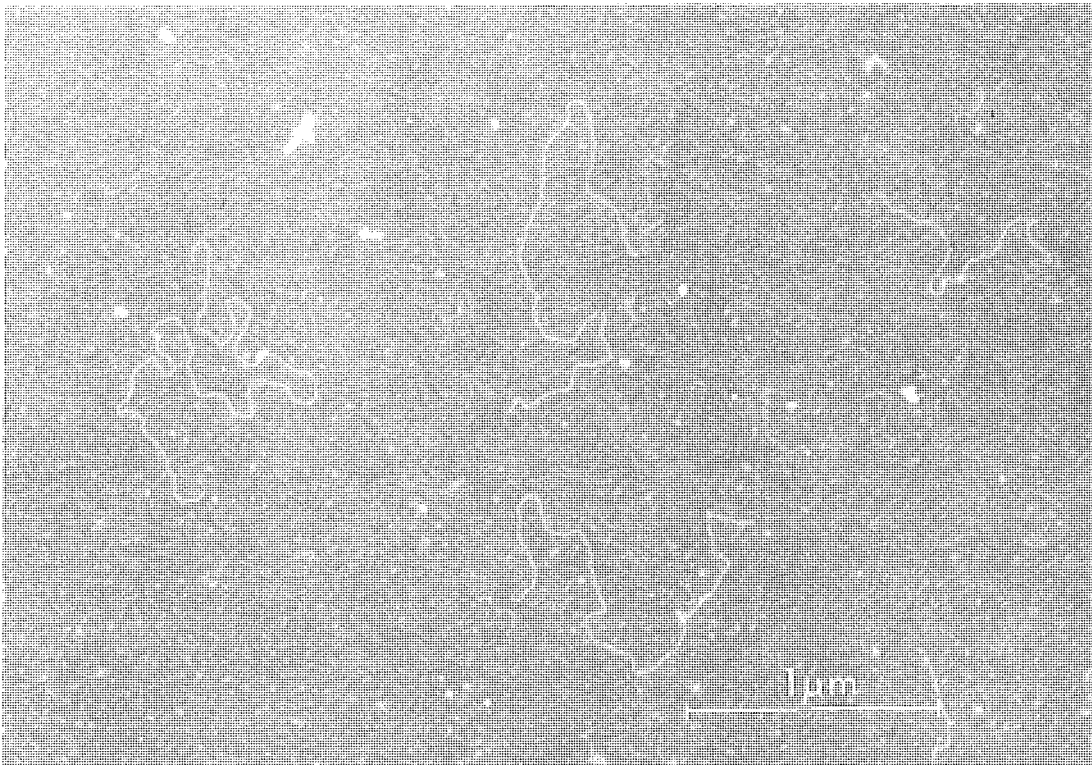


Abb. 45: Bruchstücke gespreiteter Etioplasten-DNA nach Phenol-extraktion isolierter Etioplasten (Fraktion 3). Die DNA wurde mit Uranylacetat positiv kontrastiert und im Negativkontrastverfahren elektronenmikroskopisch abgebildet (vgl. KLEINSCHMIDT 1968)

oder Membranresten unauswertbar waren, liegen die DNA-Längen der Etioplasten im Bereich von 20 - 400  $\mu\text{m}$ . Das Maximum der Längenverteilung liegt bei etwa 40  $\mu\text{m}$ . Etwa 10% der Moleküle sind länger als 100  $\mu\text{m}$  (Abb. 47). Die DNA aus Etioplasten ist zum Teil mit Membranen und Membranresten assoziiert (Abb. 49). Freie Enden der gespreiteten Etioplasten-DNA wurden nach der

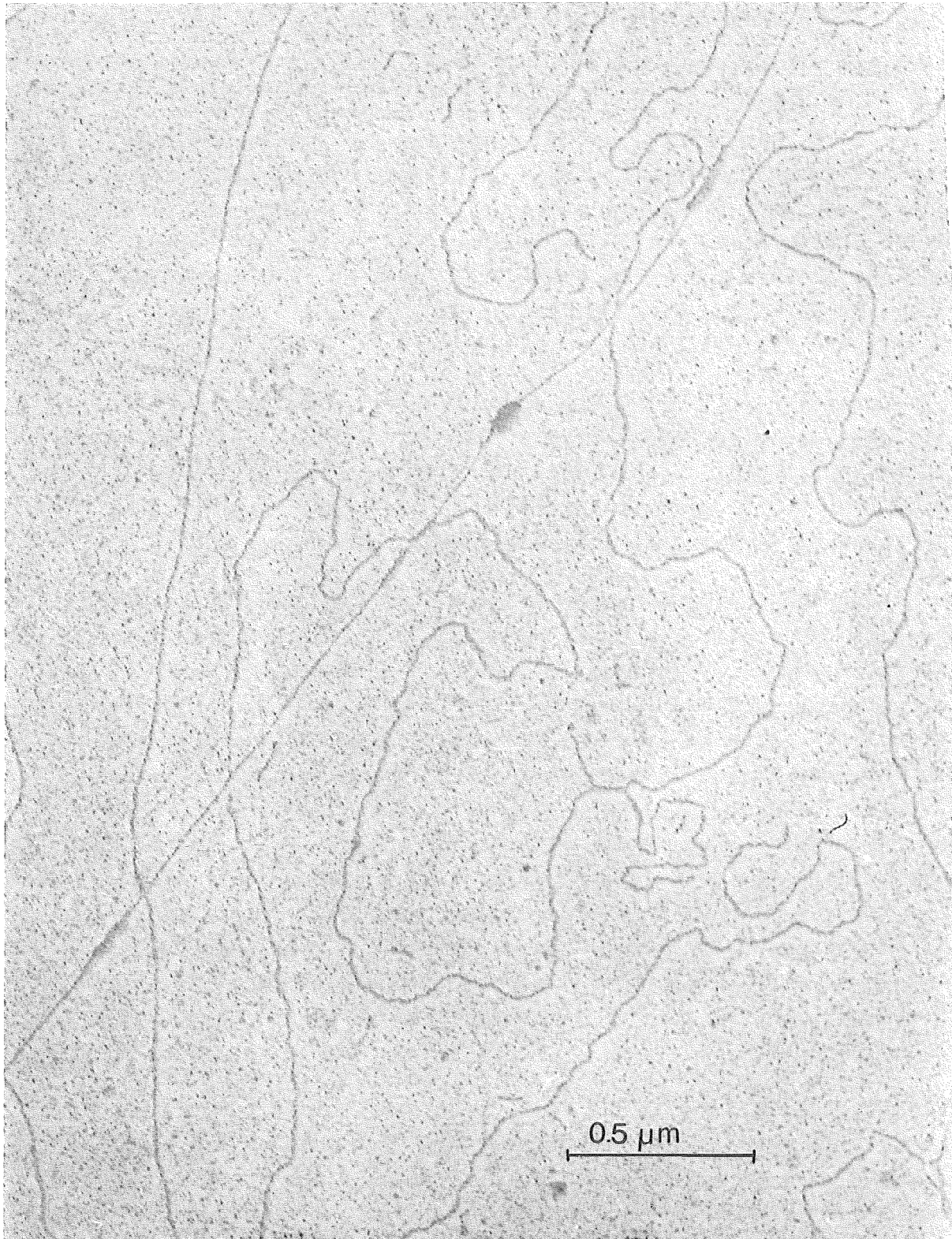


Abb. 46: Pt-kegelbedampfte DNA aus isolierten Etioplasten nach Phenolextraktion und Spreitung in 0,3 M Ammoniumacetat (pH 5,0)

'one step release'-Methode selten gefunden.

In unmittelbarer Nähe der Membran sind die meist vielsträngigen DNA-Fibrillen mit mehreren getrennten Stellen membranassoziiert, verlaufen dann mehrsträngig, d.h. meist als zwei stark verdrehte Doppelstränge, und liegen erst an der Peripherie als ein geschlossener Doppelstrang vor (Abb. 49). Auf einen prozentualen Vergleich membranassoziiierter und freier DNA aus Etioplasten wurde verzichtet, weil durch die Isolierung und Spreitung der Etioplasten-DNA wahrscheinlich die in vivo-Verhältnisse verschoben werden.

Ein methodischer Vergleich phenolextrahierter Etioplasten-DNA mit DNA, die nach direkter Spreitung aus isolierten, osmotisch aufgebrochenen Etioplasten und teilweise nach enzymatischer Hydrolyse der Plastidenproteine durch die Proteinase "Pronase P" gewonnen wurde, läßt folgende Aussage zu.

Die längsten DNA-Moleküle erhält man nach der 'one step release'-Methode der isolierten Etioplasten in Proteinmischfilmen auf Ammoniumacetat. Die teilweise nach Pronase-Abbau der Etioplastenproteine gewonnenen DNA-Moleküle zeigen nach Spreitung mit Cytochrom c keine oder nur sehr selten freie Enden. Setzt man voraus, daß die nach Phenolextraktion kürzere, lineare DNA zerbrochene DNA ist, die durch Scherkräfte bei der Extraktion oder durch Entfernung von 'linker'-Proteinen durch Phenolextraktion entstanden ist, dann dürfte die durch osmotisches Aufbrechen der Plastiden gewonnene DNA den Längenverhältnissen in vivo entsprechen. Unter diesem Aspekt ist diese direkte Methode schonender: sie ergibt lange Moleküle (mittlere Länge 40  $\mu$ m), die - da kaum freie Enden vorhanden sind - wahrscheinlich ringförmig ist.

Die allgemeine Vorstellung, daß die histonfreie Plastiden-DNS ausschließlich frei im Plastidenstroma vorkommt, bedarf somit einer wichtigen Einschränkung: Etioplasten-DNA ist oder kann zumindest zeitweilig membranassoziiert oder membrangebunden sein.

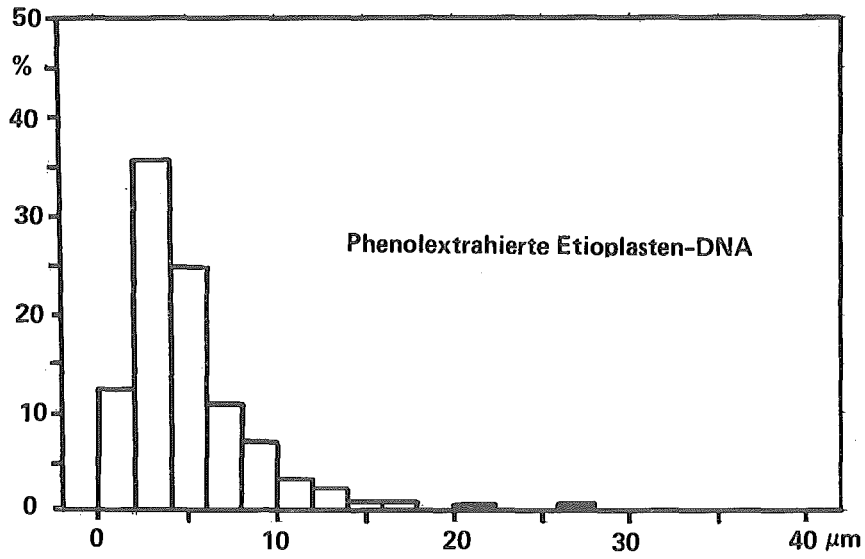
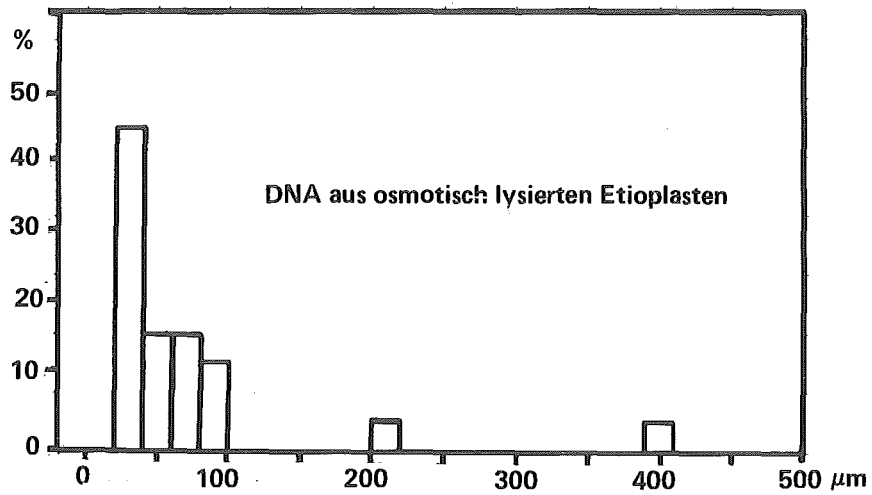


Abb. 47: Längenverteilung von Etioplasten-DNA nach Phenol-extraktion und MAK-Chromatographie (oben) und nach Lysis der Etioplasten durch osmotischen Schock (unten). Isolierung der Etioplasten unter Glutaraldehyd-freien Bedingungen



Ähnliches gilt für *Acetabularia*-Chloroplasten und *Sphacelaria*-Chloroplasten, die nach osmotischem Schock gespreitet wurden (BOGORAD und WOODCOCK 1970, GREEN et al. 1970, BISALPUTRA und BURTON 1969). Über die Art der Bindung der Plastiden-DNA, den Bindungsort und seine Funktion ist nichts bekannt. Bezüglich der Lokalisierung des DNA-Membrankomplexes ergeben sich folgende Möglichkeiten: er könnte Bestandteil der inneren Membran der Plastidenhülle oder/und Teil des inneren Membransystems der Etioplasten (Prolamellarkörper, Stromathylakoide) sein.

In bezug auf die Funktion des Bindungsortes der DNA und der Membranen wären zwei Möglichkeiten diskutabel: er könnte u.a. membrangebundene Enzyme besitzen, die an der Initiation der DNA-Synthese und an der Verlängerung und Replication der Plastiden-DNA beteiligt sind. Wenn diese Annahme zutrifft, wäre eine weitere Parallele zwischen dem System der Plastiden und der Bakterien zu ziehen. Bakterien besitzen innere Membranınvaginationen (Mesosomen, JACOB et al. 1966). Diese DNA-Membrankomplexe (RYTER et al. 1968) sind wahrscheinlich am Start, an der Verlängerung der DNA und der Beendigung der Replication des *Bacillus subtilis* Chromosoms beteiligt (SUEOKA und QUINN 1968, ROSENBERG et al. 1968).

Darüber hinaus könnte der DNA-Membranbindungsort eine Art 'Trägerfunktion' für die DNA-Replication in der Plastide besitzen. Es ist anzunehmen, daß die Weitergabe der langen Plastiden-DNA Moleküle während der Plastidenteilung an und mit Hilfe einer oder mehrerer spezifischen Membranstellen erfolgt. Replizierte, frei im Plastidenstroma vorkommende DNA würde - vor allem, wenn sie in 'polyenergider' Form vorliegen sollte - zufällig auf die Plastidenhälften bzw. Tochterplastiden bei der Plastidenteilung verteilt. Eine kontinuierliche Weitergabe informativer Plastidengene wäre so nicht gewährleistet. Unter diesem Aspekt wäre es denkbar, daß der Modus der Regulation der DNA-Replication und der Plastidenteilung nach dem von CLARK (1968) an *E. coli* entwickelten Modell der DNA-Replication, der Nucleoid- und Zellteilung verläuft.

Eine Bestätigung dieser Vorstellung scheint bisher in all den

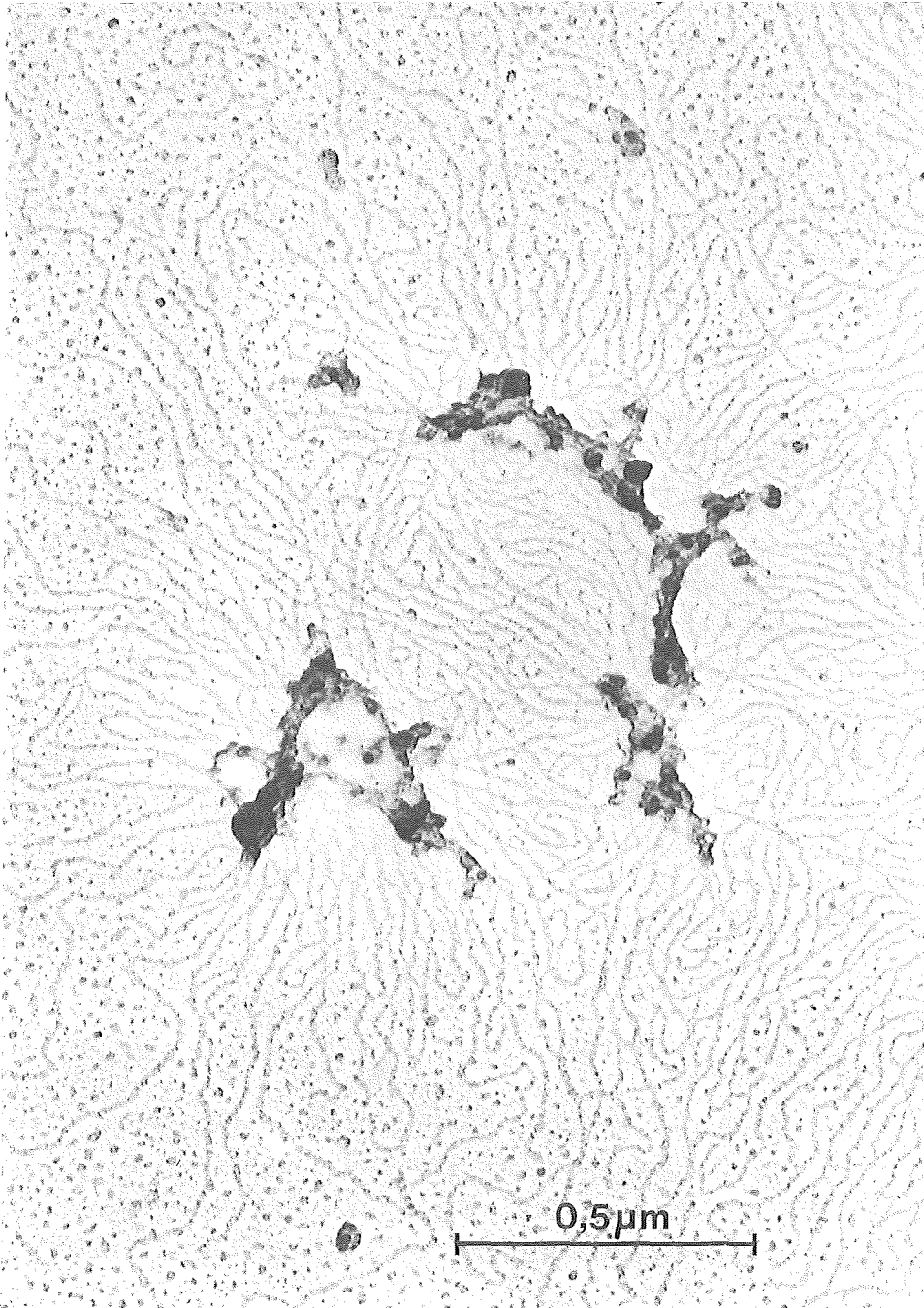


Abb. 48: Gespreitete Etioplasten-DNA nach Lysis der Etioplasten durch osmotischen Schock (keine Pronasebehandlung, Pt-Kegelbedampfung). Bei den kontrastreichen Membranresten handelt es sich wahrscheinlich um Reste von Prolamellarkörpern. Die Etioplasten wurden unter Glutaraldehyd-freien Bedingungen isoliert

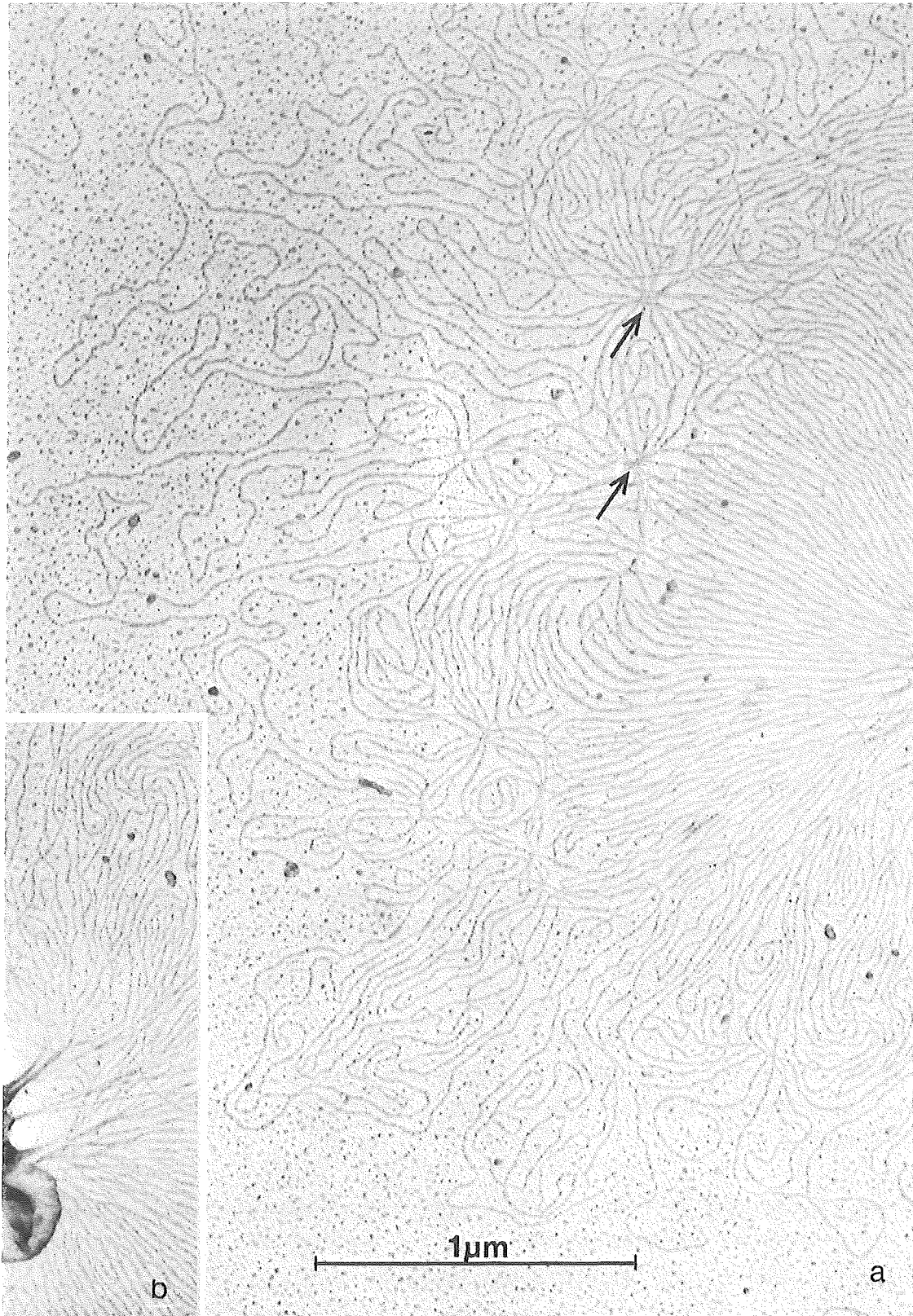
Fällen gegeben zu sein, wo die Verteilung der DNA-haltigen Nucleoplasmen während der Plastidenteilung verfolgt wurde. Vor der Plastidenteilung wird die Zahl der Nucleoplasmen verdoppelt (SPREY 1968, BISALPUTRA-BISALPUTRA 1970). Oder es hat sich im Falle von Chloroplasten aus *Sphacelaria* der Genophor, ein peripheres ringförmiges Nucleoplasma (BISALPUTRA und BISALPUTRA 1969), in zwei Tochterschleifen aufgeteilt, die dann bei der Plastidenteilung durch Anheftung an die inneren und peripheren Thylakoide auf die Tochterplastiden verteilt werden (BISALPUTRA und BURTON 1969, BISALPUTRA und BISALPUTRA 1970).

Da die Länge der über  $100\ \mu\text{m}$  langen Moleküle infolge ihrer Anordnung nach der Spreitung nur abgeschätzt werden konnte, dürften die Minimallängen der längsten gefundenen Moleküle etwa  $400\ \mu\text{m}$  betragen. Nimmt man an, daß pro Plastide nur eine Membranregion mit DNA assoziiert ist und die längsten nachgewiesenen Moleküle das gesamte Genom der Plastide darstellen, so läßt sich die Codonkapazität überschlagmäßig bestimmen. Für  $1\ \mu\text{m}$  Fadenlänge wird bei einem Guanin- + Cytosin-Anteil von 34 Mol.-% ein Molekulargewicht von  $2,08 \times 10^6$  angegeben (KLEINSCHMIDT et al. 1962). Nimmt man einen G+C-Anteil von 50% an (*Spinacea oleracea* 46%, CHUN et al. 1963; *Beta vulgaris* 46%, CHUN et al. 1963, G+C-Anteil bestimmt aufgrund der Dichte im CsCl-Gradienten), dann erhöht sich das Molekulargewicht pro  $\mu\text{m}$  DNA-Länge auf  $2,1 \times 10^6$ . Setzt man voraus, daß die längsten gefundenen Moleküle von  $400\ \mu\text{m}$  den in vivo-Längen eines Plastidengenoms entsprechen, so ergibt sich ein DNA-Gehalt von  $1,35 \times 10^{-15}$  g pro Plastide.

Bezogen auf einen diploiden Pflanzenzellkern mit einem DNA-Gehalt an  $10^{-11}$  g (McLEISH und SUNDERLAND 1961) hat eine Plastide etwa 1/10 000 des DNA-Gehalts. Nimmt man 100 Plastiden in einer Mesophyllzellen an, dann macht die gesamte Plastiden-

---

Abb. 49: DNA aus lysierten Etioplasten nach Spreitung und Pt-Kegelbedampfung. Die DNA hat teilweise 'Zentren' (s. Hinweispfeile) und zeigt selten freie Enden (Abb. 49a). Sie ist polyfibrillär an getrennten Stellen mit dem Membrankomplex assoziiert (Abb. 49b, Vergrößerungsfaktor wie in Abb. 49a)



DNA ungefähr 1% des gesamten DNA-Gehaltes einer Zelle aus. Unberücksichtigt bleibt dabei der Gehalt extranuclearer Mitochondrien-DNA.

Legt man zur Codierung eines Proteins mit 200 Aminosäuren 600 Basen zugrunde, so könnten von  $1 \times 10^{-16}$  g DNA 160 Proteine (mittleres Molekulargewicht 27 000) synthetisiert werden (KIRK 1966). Vierhundert  $\mu\text{m}$  (bzw.  $40 \mu\text{m}$ ) lange Etioplasten-DNA würde ausreichen, um etwa 2 000 (bzw. 200) Proteine der oben genannten Spezifikation zu synthetisieren. Im Falle der  $400 \mu\text{m}$  langen Plastiden-DNA dürfte die Plastide genügend Informationskapazität haben, um alle pufferlöslichen Stromproteine, pufferlöslichen Struktur- und Ribosomenproteine selbst zu codieren. Diese Überlegung ist rein spekulativer Natur, da (1) Kern-DNA an der Synthese plastidenspezifischer Proteine beteiligt ist (KIRK 1966), (2) keine oder kaum Ansätze zur Bestimmung der Redundanz von Plastiden-DNA vorliegen und (3) nicht ausgeschlossen ist, daß ähnlich den Verhältnissen der Mitochondrien-DNA (PAOLETTI et al. 1972) die Plastiden-DNA in circularer, oligomerer Form vorliegt.

Bestimmung des DNA-Gehaltes pro Chloroplast mit verschiedenen Methoden (Diphenylamin, CsCl-Gradient, Spreitung mit Cytochrom c und elektronenmikroskopische Abbildung) ergeben in bezug auf den hier bestimmten DNA-Gehalt für Etioplasten-DNA von *Hordeum vulgare* ( $1,35 \times 10^{-15}$  g/Plastide) vergleichbare Werte: *Chlamydomonas reinhardi*  $8,6 \times 10^{-15}$  (CHIANG und SUEOKA 1967), *Euglena gracilis*  $1,2 \times 10^{-15}$  g (EDELMAN et al. 1964), *Acetabularia mediterranea*  $3 \times 10^{-15}$  g, (WOODCOCK und BOGORAD 1970), *Vicia faba*  $2 \times 10^{-15}$  g (KIRK 1963, 1967), *Nicotiana glutinosa*  $4,7 \times 10^{-15}$  g (TEWARI WILDMAN 1967), *Antirrhinum majus*  $5,6 \times 10^{-15}$  g (RUPPEL und van WYCK 1965). Die Menge an DNA pro Plastide ( $1-8 \times 10^{-15}$  g) liegt größenordnungsmäßig im Bereich von *E. coli*-DNA ( $5 \times 10^{-15}$  g; CAIRNS 1963).

Die Ursache für die zum Teil erhebliche Variationsbreite in der Länge gespreiteter Plastiden-DNA liegt einmal an den unterschiedlichen Spreitungs- und Extraktionsmethoden. Der Einfluß von Extraktionsmethoden und die Verwendung verschiedener Hypophasen

auf die Moleküllänge ist bekannt (INMAN 1967, LANG et al. 1970). Darüber hinaus sind die zum Teil extrem langen Chloroplasten-DNA Moleküle *Acetabularia mediterranea* 42,7 - 80,5  $\mu\text{m}$  (GREEN et al. 1970), 50 - 1000  $\mu\text{m}$  (WOODCOCK und BOGORAD 1970), *Spineacea oleracea* 40 - 160  $\mu\text{m}$ ; WOODCOCK und FERNANDEZ-MORAN 1968 und Etioplasten-DNA Längen nur Schätzungen, die mit den üblichen Methoden der Längenvermessung von Phagen-DNA (KLEINSCHMIDT et al. 1962) nicht zu erfassen sind. Der Verlauf der Doppelstränge: supercoiling (MANNING und RICHARDS 1972), Vielstranganordnung, rosettenförmige Lage mit Zentren und dichte Packung der langen Plastiden-DNA Moleküle macht auch die von DÖRFLER und KLEINSCHMIDT (1970) verwendete Auswertungsmethode mit Computer unmöglich.

Die Verwendung eines internen Standards - z.B. eine DNA bekannter Länge - ist bei der Anordnung der Etioplasten-DNA nach der 'one step release'-Methode irrelevant. Die Anordnung der Etioplasten-DNA nach Spreitung in Proteinmischfilmen ist den Verhältnissen von Bakterien Protoplasten-DNA (KLEINSCHMIDT und LANG 1962), der schnell sedimentierbaren T4-Phagen-DNA (HUBERMANN 1968) und der Chloroplasten-DNA von *Acetabularia* (GREEN et al. 1970) vergleichbar. Eine vergleichbare Anordnung ergibt sich auch für *Hemophilus*-DNA nach Spreitung der lysierten Sphaeroplasten (MAC HATTIE et al. 1965).

Neben den methodenbedingten Meßfehlern wäre - zur Erklärung der erheblichen Unterschiede in der Länge der Plastiden-DNA Moleküle - denkbar, daß die Plastiden-DNA, ähnlich den Verhältnissen der Mitochondrien-DNA, in monomerer bis oligomerer, circularer Form vorliegt.

Ringförmige DNA von relativ einheitlicher Konturlänge ist in Chloroplasten von *Euglena graiclis* (40  $\mu\text{m}$ ), *Spinacia oleracea* (44  $\mu\text{m}$ ) und *Zea mays* (43  $\mu\text{m}$ ) nach Pronase-SDS und Phenolextraktion mit Spreitung in Proteinmonolayer nachgewiesen worden (MANNING et al. 1971, 1972). Aufgrund dieser Ergebnisse darf man annehmen, daß linker-Proteine in Plastiden nicht vorhanden sind und die von WONG und WILDMAN (1972), WOODCOCK und FERNANDEZ-MORAN (1968) und uns nachgewiesene kurze, lineare DNA wahrscheinlich durch Scherkräfte bei der Phenolextraktion zerbrochen ist.

Das Histogramm phenolextrahierter Etioplasten-DNA zeigt ein Verteilungsmaximum für 3 - 5  $\mu\text{m}$  lange DNA. Dieses Ergebnis resultiert aus der Längenverteilung aller meßbaren Bruchstücke ( $\geq 0,1 \mu\text{m}$ ). Klammert man unerlaubterweise diese kurzen Stücke bei der Längenverteilung aus (WONG und WILDMAN 1972, CHATTORAJ 1971), so ergibt sich ein falsches Bild von den realen Verhältnissen.

Im Gegensatz zur Phenolextraktion erhält man nach der 'one step release'-Methode heterogene Längen von membranassoziierter Plastiden-DNA. Für *Acetabularia* fanden WOODCOCK und BOGORAD (1970) variierende Längen von 50 - 1000  $\mu\text{m}$ . DNA aus osmotisch lysierten Plastiden von Spinat hat Längen von 20 - 160  $\mu\text{m}$  (WOODCOCK und FERNANDEZ-MORAN 1968). Die Längenverteilung von Etioplasten-DNA der Gerste liegt im Bereich von 20 - 400  $\mu\text{m}$  mit einem Maximum bei 40  $\mu\text{m}$ .

Denkbar wäre, daß - zur Interpretation der zum Teil methodenbedingten divergierenden Ergebnisse - Plastiden-DNA, wie Mitochondrien-DNA in circularer monomerer bis oligomerer, möglicherweise verketteter Form vorliegt (HUDSON et al. 1968), PAOLETTI et al. 1972). Etioplasten-DNA könnte demnach Konturlängen von  $n \times 40 \mu\text{m}$  besitzen, wobei 'tandem repeats' innerhalb eines Monomeren und Wiederholungen gleicher Nucleotidsequenzen in den Oligomeren auftreten könnten (WELLS und BIRNSTIEL 1969, BASTIA et al. 1971).

Da die Etioplasten-DNA polyfibrillärer mit mehreren, getrennten Stellen einer Membranregion assoziiert, ist anzunehmen, daß mehrere getrennte Moleküle an den getrennten Stellen mit dieser Membranregion einen oder mehrere DNA-Membrankomplexe, in einer z.B. polyploiden Plastiden (vgl. HERRMANN 1969, 1970), bilden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß es sich um ein einziges DNA-Molekül handelt, das an mehreren getrennten Stellen mit der Membran assoziiert ist. Im letzteren Falle lägen mehrere, getrennte Membranheftungspunkte für ein Plastidenchromosom vor; eine Situation, vergleichbar den Verhältnissen des Membran-DNA Komplexes von *E. coli* (ROSENBERG und CAVALIERI 1968).

### IX. Ribosomale RNA: Gelelektrophoretische Trennung und elektronenmikroskopische Abbildung

Die Sedimentationskoeffizienten von Ribosomen aus den Chloroplasten und dem Cytoplasma höherer Pflanzen sind verschieden: Chloroplastenribosomen haben Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 70 Svedberg Einheiten (S) gegenüber den Cytoplasmari-  
bosomen von etwa 80 S (LYTTLETON 1962, BOARDMAN et al. 1966). In ihrem Sedimentationsverhalten lassen sich die Ribosomen aus Chloroplasten mit 70 S-Ribosomen aus Bakterien und Cyanophyceen vergleichen (Mittelwert von 25 Bakterien-species und zwei Cyano-  
phyceenarten: 68,4 S, TAYLOR und STORCK 1964).

Der Unterschied im Sedimentationsverhalten undissoziierter Monosomen vom 70 S- bzw. vom 80 S-Typ läßt sich auch auf deren Untereinheiten und ihre ribosomalen Ribonucleinsäuren (rRNA) übertragen (TAYLOR et al. 1966, STUTZ und NOLL 1967). Chloroplastenribosomen besitzen drei Typen von RNA: hochmolekulare rRNA mit Sedimentationskoeffizienten von etwa 23 S und 16 S, entsprechend einem Molekulargewicht von  $1,10$  bzw.  $0,56 \times 10^6$  (LOENING und INGLE 1967, LOENING 1968) und eine niedermolekulare Komponente von 5 S (DYER und LEECH 1968, RUPPEL 1969). Monosomen vom 80 S-Typ aus höheren Pflanzen haben rRNA mit angenäherten S-Werten von 25 S, 18 S und 5 S (LOENING und INGLE 1967), für deren hochmolekulare RNA LOENING (1968) Molekulargewichte von  $1,3$  bzw.  $0,7 \times 10^6$  angibt. Die niedermolekulare rRNA-Komponente aus Chloroplasten und dem Cytoplasma ist in ihrer elektrophoretischen Mobilität in Polyacrylamidgelen (DYER und LEECH 1968, DYER et al. 1971) und ihrem säulenchromatographischen Verhalten an methyliertem Albumin mit Kieselgur (MAK) verschieden (DYER und LEECH 1968, RUPPEL 1969, PAYNE und DYER 1971, 1972).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sedimentationskoeffizienten von rRNA aus etiolierten Primärblättern der Gerste durch Coelektrophorese mit rRNA-Standards von E. coli mit bekannten S-Werten (23 S, 16 S) nach ihrer Trennung in Polyacrylamidgelen bestimmt. Weiter interessierte die Frage, inwieweit sich die Methode der Molekulargewichtsbestimmung durch elektronenmikros-

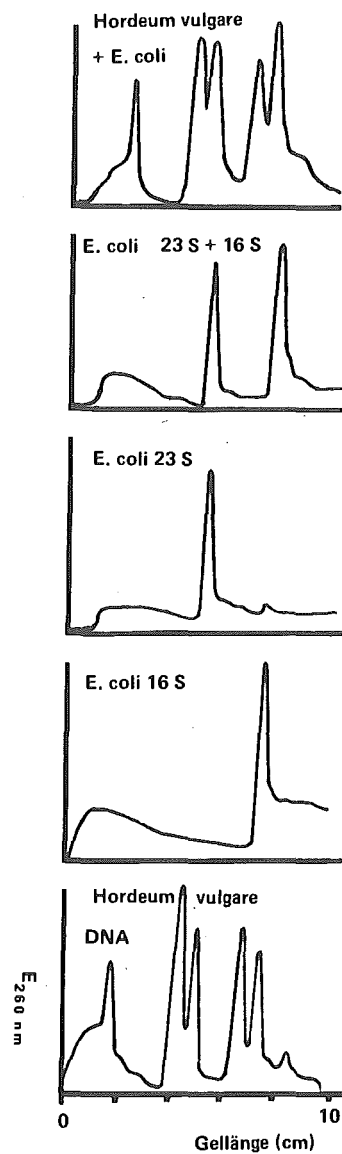


Abb. 50: Coelektrophorese von rRNA aus *E. coli* mit Nucleinsäuren von *Hordeum vulgare* in 2,4%igen Polyacrylamidgelen (Trenndauer 4 Stunden, 5 mA/Gel). Die Pherogramme zeigen die getrennten Fraktionen des Nucleinsäureextraktes von etioliierten Gerstenblättern (Probenmenge: 110  $\mu$ g) und Eichsubstanzen von rRNA aus *E. coli* in den Obergelen (Probenmenge 20  $\mu$ g 16 S RNA, 20  $\mu$ g 23 S RNA). Die Eichsubstanzen wurden nach MAK-Fraktionierung der Nucleinsäuren von RNase-freien *E. coli* gewonnen (Miles Laboratories, Inc.). Nach Coelektrophorese von *E. coli* RNA und Nucleinsäuren von Gerste (oberes Pherogramm) haben 23 S RNA und 16 S RNA aus *E. coli* und aus Etioplasten gleiche Mobilität (vgl. Abb. 51)

kopische Abbildung der hochmolekularen rRNA in Proteinmonolayer (KLEINSCHMIDT 1968, BEER 1968, GRANBOULAN und SCHERRER 1969) mit den bei LOENING (1968) angegebenen Molekulargewichten für hochmolekulare rRNA vergleichen läßt.

Bei Verwendung zusammengesetzter Polyacrylamidgele (2,4%iges Obergel, 7,5%iges Untergel, SPREY 1972) trennen sich unter den bei LOENING (1967) angegebenen Bedingungen folgende Nucleinsäurefraktionen in Richtung abnehmender Molekulargewichte im Obergel auf: DNA, 25,5 S, 23 S, 18 S und 16 S. Im Untergel (7,5%) lassen sich die 5 S und 4 S RNA auftrennen. Die 5 S RNA kann in hochkonzentrierten Gelen (12,5 und 15%) in ihre cytoplasmatische und plastidäre Komponente weiter aufgetrennt werden (SPREY, in Vorbereitung).

Nach der Coelektrophorese von rRNA aus *E. coli* mit Nucleinsäureextrakten aus acht Tage alten, etiolierten Primärblättern der Gerste (Sorte 'Bido') in Polyacrylamidgelen hat die rRNA aus *E. coli* gleiche Mobilität wie die 23 S und 16 S rRNA der Etioplasten (Abb. 50, 51). LOENING und INGLE (1967), LOENING (1968), SMILLIE und SCOTT (1969) fanden identische Resultate beim Vergleich der rRNA aus Chloroplasten von *Euglena gracilis* mit rRNA von *E. coli*.

Schwierigkeiten ergaben sich besonders bei der Charakterisierung der 23 S rRNA aus Chloroplasten (POLLARD et al. 1966, SPENCER und WHITFIELD 1966), da die Abwesenheit divalenter Kationen (z.B.  $Mg^{++}$ ) im Extraktionsmedium und bei der Trennung sowie die Anwendung ungeeigneter Extraktionsmethoden (z.B. Homogenisatoren mit schnell rotierenden Messern) zu einer Degradierung der plastidären 23 S RNA führen kann (INGLE 1968, DYER et al. 1971, LOENING und INGLE 1967). Im Falle der Nucleinsäure-Extraktion aus etiolierten Primärblättern der Gerste wurde deshalb das Blattmaterial in eisgekühlten Mörsern zerrieben.

In Polyacrylamidgelen ist das Verhältnis der Mobilität der Ribonucleinsäuren umgekehrt proportional dem Logarithmus der Sedimentationskoeffizienten (LEWICKI und SINSKEY 1970). Aufgrund der identischen Wanderungstrecken der 23 S und 16 S RNA aus

Etioplasten und *E. coli* wurden die S-Werte der restlichen RNA-Fractionen aus den 80 S-Ribosomen in den Polyacrylamidgelen bestimmt. Die Mittelwerte aus 10 getrennten Coelektrophoresen von 16 S und 23 S RNA aus *E. coli* mit rRNA der Gerste ergaben folgende Wanderungsstrecken:  $6,4 \pm 0,6$  cm für die 16 S RNA und  $4,5 \pm 0,4$  cm für die 23 S RNA von *E. coli* und Etioplasten. Die Wanderungsstrecken der cytoplasmatischen RNA betragen  $3,9 \pm 0,3$  cm bzw.  $5,8 \pm 0,5$  cm entsprechend den Svedberg-Einheiten von 25,5 S und 18,0 S (Abb. 52).

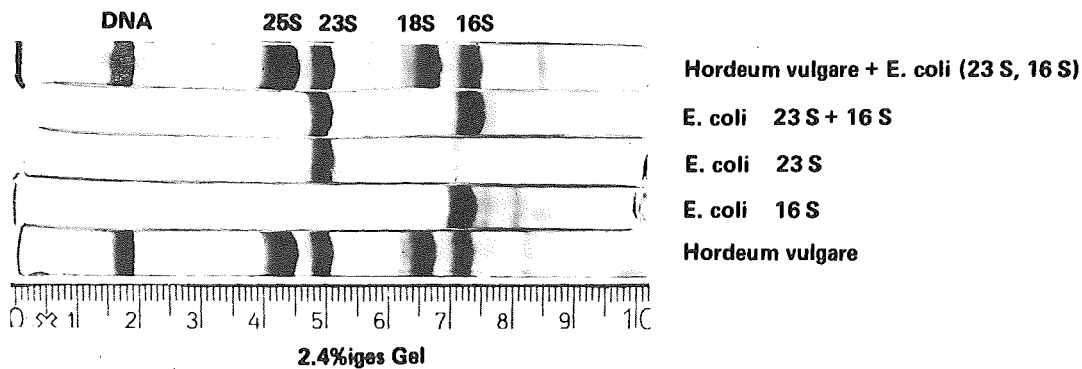


Abb. 51: Gelelektrophoretische Trennung von rRNA aus *E. coli* und dem gesamten Nucleinsäureextrakt von etiolierten Gerstenblättern (Trennbedingungen wie Abb. 50). Die Nucleinsäuren wurden mit 1-Äthyl-2-3 (1-äthyl-naphto 1,2 thiazolin-2-yliden)-2-methyl-propenyl-naphto 1,2 d thiazoliumbromid differentiell angefärbt. Die linke Bande im Nucleinsäureextrakt von *Hordeum vulgare* und in der Coelektrophorese mit *E. coli* rRNA enthält DNA

Für die elektronenmikroskopische Abbildung der rRNA wurden 70 S-Ribosomen aus Etioplasten und 80 S-Ribosomen aus albina-Mutanten der Gerste vergleichend analysiert. Diese Untersuchungen waren insofern von Interesse, als bisher noch keine Befunde über die Spreitung von rRNA aus pflanzlichem Material vorliegen. Methodisch wurde dabei im Falle der Etioplasten-Ribosomen so verfahren: Nach Isolierung der Etioplasten (SPREY und GIETZ 1973) wurden die Ribosomen in den von STUTZ und NOLL (1967) beschriebenen Puffer isoliert und nach zweistündiger Zentrifugation (Ti-50 Rotor, Beckman Spinco L-50 Zentrifuge, 40 000 Upm) in ein 1 M Saccharose 'kissen' sedimentiert. Zur elektronenmikroskopischen Analyse der rRNA aus 80 S-Ribosomen wurden Primärblätter

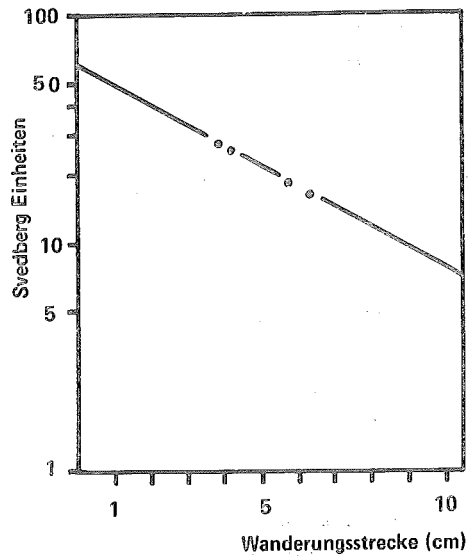


Abb. 52: Beziehung zwischen Svedberg-Einheiten und elektrophoretischer Mobilität von hochmolekularer RNA in 2,4%igen Polyacrylamidgelen

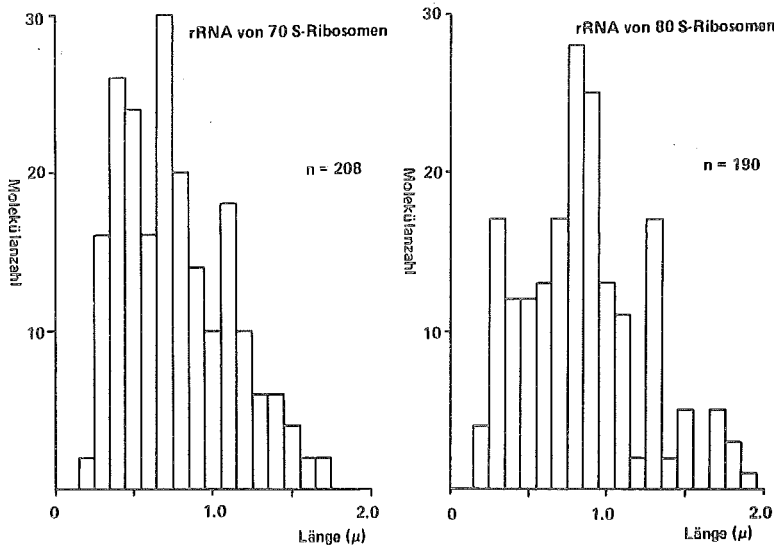


Abb. 53: Histogramm der Längenverteilung von rRNA aus 70 S-Ribosomen von Etioplasten der Gerste. Insgesamt wurden die Längen von 208 elektronenmikroskopisch abgebildeten Molekülen vermessen und in Größenklassen von je 0,1 μm eingeteilt (links)

Abb. 54: Histogramm der Längenverteilung von rRNA aus 80 S-Ribosomen der Gerste. Durch Nachvergrößerung elektronenmikroskopisch abgebildeter rRNA (Sekundärvergrößerung: 100 000-fach) wurden die Längen von 190 Molekülen mit einem Längenmesser bestimmt (rechts)

von albina-Mutanten, die keine 70 S-Ribosomen besitzen (SPREY 1972), unter den gleichen Bedingungen behandelt.

Die rRNA wurde mit Phenol aus dem Ribosomensediment extrahiert (KIRBY 1965), in  $10^{-2}$  M Phosphatpuffer (pH 6,8), der  $10^{-4}$  M EDTA und 4% Formaldehyd enthielt, gelöst und bei  $45^{\circ}\text{C}$  denaturiert (15') und schnell abgekühlt (HIGHTON und BEER 1963). Die rRNA wurde in einem Proteilmischfilm gespreitet und Pt-kegelbedampft (KLEINSCHMIDT 1968).

Das Histogramm der Moleküllängen für rRNA aus 70 S-Ribosomen der Etioplasten hat nach der Spreitung und der elektronenmikroskopischen Abbildung ein Verteilungsmaximum bei  $0,65\ \mu\text{m}$  bzw.  $1,15\ \mu\text{m}$  (Abb. 53). Für die cytoplasmatischen 80 S-Ribosomen ergibt sich ein Verteilungsmaximum bei  $0,85\ \mu\text{m}$  und  $1,30\ \mu\text{m}$  (Abb. 54). Setzt man voraus, daß die elektronenmikroskopisch bestimmten Verteilungsmaxima für rRNA mit den gelelektrophoretisch bestimmten S-Werten korrelieren, dann läßt sich das Molekulargewicht der rRNA berechnen. Die Bestimmung der Molekulargewichte (M.W.) der elektronenmikroskopisch abgebildeten Polynucleotidketten (Abb. 55) geschah nach folgender Beziehung:

$$\text{M.W.} = \frac{\text{Moleküllänge in } \overset{\circ}{\text{Å}}}{3,17} \times \text{mittleres M.W. eines Nucleotids,}$$

wobei 3,17 der Basenabstand in  $\overset{\circ}{\text{Å}}$  für gespreitete Virus-RNA ist (GRANBOULAN und SCHERRER 1969). Der Basenabstand ist kaum von der Basenzusammensetzung, jedoch stark von den jeweiligen physicochemischen Bedingungen bei der Spreitung abhängig (ERICKSON und BEER 1967). Als mittleres Molekulargewicht pro Nucleotid wurde 320 angenommen. Danach ergibt sich für die 23 S und 16 S RNA der plastidären Ribosomen ein Molekulargewicht von  $1,16$  bzw.  $0,65 \times 10^6$ . Die 25,5 S und die 18 S RNA aus den cytoplasmatischen Ribosomen haben nach der oben angeführten Beziehung Molekulargewichte von  $1,31$  bzw.  $0,86 \times 10^6$ .

Die berechneten Molekulargewichte für die 25,5 S und 23 S RNA stimmen mit den von LOENING (1968) angegebenen Molekulargewichten für 25 S ( $1,27 - 1,31 \times 10^6$ ) und 23 S ( $1,07 - 1,11 \times 10^6$ ) überein. Abweichungen bis 12% ergeben sich bei der Berechnung der Molekulargewichte unter Verwendung des mittleren Basenabstandes

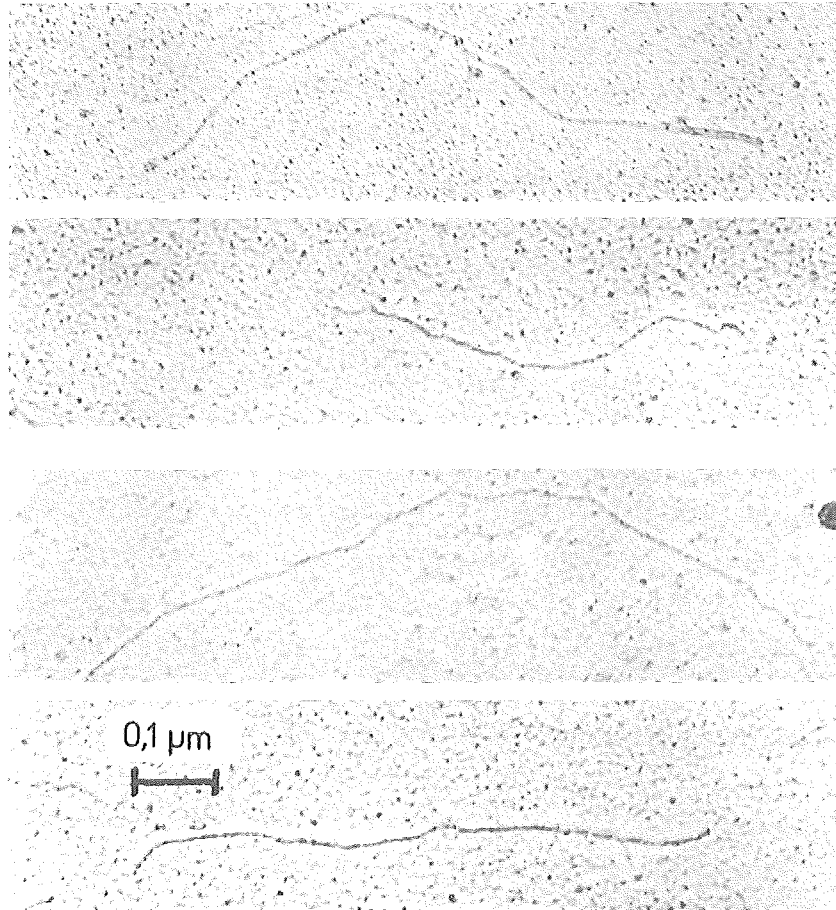


Abb. 55 (a-d): Elektronenmikroskopische Abbildung von rRNA aus plastidären 70 S-Ribosomen (Abb. 55a,b) und cytoplasmatischen 80 S-Ribosomen (Abb. 55c,d) der Gerste. Die lange RNA in Abb. 55a ist 23 S RNA, der kurze RNA-Faden in Abb. 55b entspricht 16 S RNA. Das lange Molekül in Abb. 55c dürfte mit 25,5 S RNA identisch sein, die kurze RNA in Abb. 55d entspricht der 18 S RNA. Die in Cytochrom c gespreitete RNA wurde unter einem Winkel von  $6^\circ$  mit Platin kegelbedampft.

von  $3,16 \overset{\circ}{\text{Å}}$  für die 18 S bzw. 16 S RNA. Hier werden von LOENING Molekulargewichte von  $0,71 \times 10^6$  bzw.  $0,56 \times 10^6$  angegeben.

Vergleichbare Untersuchungen über die elektronenmikroskopische Abbildung einsträngiger Polynucleotidketten sind bisher an TMV-Viren (KISSELEV, GAVRILOVA und SPÍRIN 1961, HIGHTON und BEER 1963) und TYMV-Viren (JOHNSON und HILLS 1963) durchgeführt worden. Darüber hinaus liegen Abbildungen von rRNA aus *E. coli*, *Bacillus cereus*, Erythroblasten, Hela-Zellen und aus *Bombyx mori* sowie von rRNA aus Leber verschiedener tierischer Herkunft vor (DANON, MARIKOVSKY und LITTAUER 1961, GRANBOULAN und SCHERRER 1969).

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Abbildung und Klassifizierung von rRNA aus 70 und 80 S-Ribosomen höherer Pflanzen aufgrund ihrer Längenunterschiede möglich ist. Die Berechnung der Molekulargewichte der 25,5 S und 18 S bzw. 23 S und 16 S RNA nach Spreitung, Pt-Kegelbedampfung und elektronenmikroskopischer Abbildung deckt sich gut mit den aus der Literatur bekannten Werten (SPÍRIN 1963, LOENING 1968). Zu berücksichtigen ist ferner, daß eine weitere Präzisierung in der elektronenmikroskopischen Molekulargewichtsbestimmung erreicht werden kann. So wird sich durch weitere Reinigung der Ribosomenpräparationen mit Hilfe mehrmaliger Zentrifugation und der Fraktionierung der rRNA im Saccharosegradienten eine eindeutigere Verteilung der Maxima in den Histogrammen erreichen lassen.

## X. Synthese ribosomaler RNAs während der Entwicklung von Proplastiden zu Etio- und Chloroplasten

Photosynthetisch aktive Chloroplasten sind Endprodukte einer Serie von Differenzierungsschritten aus Proplastiden, deren Entwicklung durch differentielle Genaktivierung des Kernes und der Plastiden gesteuert wird. Einige dieser Differenzierungsschritte verlaufen in höheren Pflanzen lichtunabhängig, z.B. die Genese der Etioplasten aus Proplastiden und die damit verbundenen Synthesen pufferlöslicher Stromaproteine (z.B. Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges) und der wasserunlöslichen Membranproteine der für Etioplasten typischen Prolamellarkörper.

Etioplasten vermögen nucleäre und organellespezifische, genetische Information mit Hilfe plastideneigener Translation in signifikante Mengen von Stromaproteinen lichtunabhängig umzusetzen. So ist der Gehalt an plastidenspezifischem Fraction I-Protein in etiolierten und grünen Blättern von *Phaseolus* ungefähr gleich (BOARDMAN 1966). Die Aktivität der mit dem Fraction I-Protein assoziierten Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase beträgt in etiolierten Blättern von *Secale* 38%, Transketolase 64%, Phosphoriboisomerase 57% (FEIERABEND und PIRSON 1966), NADP-Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase aus etiolierten *Phaseolus*-Blättern 24% (MARGULIES 1965), Plastiden RNA-Polymerase 15% (BOGORAD 1967) und PEP-Carboxylase aus etiolierten Maisblättern 14% (GRAHAM et al. 1968) der Aktivität grüner Blätter.

Wenngleich Synthesen und Aktivitäten plastidenspezifischer Enzyme in Etioplasten beträchtlich sind, können sie durch Belichtung um den Faktor 1 - 3 im Falle der oben erwähnten Getreidearten und etwa bis zum Faktor 10 im Falle von Bohnenblättern gesteigert werden. Die Photoregulation der Synthesen und Aktivitäten von Plastidenenzymen gilt also nicht absolut; sie ist zudem weitgehend von Art, Entwicklungsstatus und Umweltbedingungen der Pflanzen abhängig.

Inwieweit ist im Falle der Etioplastengenese die lichtunabhängige Proteinsynthese und im Falle der Chloroplastengenese die photoregulierte Proteinsynthese mit Veränderungen auf dem Niveau der Translation und Transcription verbunden?

Der Synthese von Plastidenproteinen in der lichtabhängigen Ergrünungsphase von *Euglena gracilis* geht die Synthese von rRNA voran (SCOTT et al. 1971). Licht hat, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Hordeum vulgare*, einen großen morphogenetischen Einfluß auf die Blattexpansion von *Phaseolus vulgaris*-Blättern. Die Größe der Plastiden und die Synthese von rRNA wird durch ein Phytochrom-abhängiges System reguliert (MEGO und JAGENDORFF 1961, SCOTT et al. 1971). In *Raphanus-Cotyledonen* stimuliert Weißlicht die Synthese cytoplasmatischer und plastidenspezifischer RNA. Der Gehalt an 25 S und 18 S RNA ist in vier Tagen alten belichteten Keimlingen etwa vierfach gegenüber den etioliierten Keimlingen erhöht, nimmt aber mit zunehmendem Blattalter ab. Der Gehalt an plastidärer rRNA etiolierter Blätter steigt mit zunehmendem Alter, so daß der Gehalt an 23 S und 16 S RNA in alten Blattstadien etwa gleich groß ist (INGLE 1968). Ein lichtinduzierter Einfluß auf die rRNA-Synthese (23 S, 16 S) ist für *Zea mays* und *Vicia faba* nachgewiesen (DYER et al. 1971, LOENING und INGLE 1967).

Da Entwicklung und Expansion der Blätter höherer Pflanzen im Etiolement stark variieren (WILLIAMS 1956), sollte eine Generalisierung des Zusammenhanges der Kinetik von plastidärer rRNA und der Chloroplastengnese vermieden werden, zumal durch die Untersuchungen von BOARDMAN (1966) bekannt ist, daß in 12 - 15 Tage alten etioliierten und grünen *Phaseolus*-Blättern der Gehalt an 70 S Ribosomen gleich ist. Gleiches gilt auch für etioliierte und grüne, ältere (>5 Tage) Primärblätter von *Hordeum* und *Triticum*: hier ist die durch Belichtung induzierte Chloroplastenentwicklung mit keiner Veränderung des rRNA-Gehaltes in den Plastiden verbunden (RHODES und YEMM 1963, SCOTT et al. 1971, SMITH et al. 1970, POULSON und BEEVERS 1970).

Die Chlorophyllsynthese und die Entwicklung zu Chloroplasten ist - zum Teil in Abhängigkeit von der taxonomischen Stellung - häufig lichtunabhängig (u.a. Bacteriochlorophyll-haltige Bakterien, die meisten Algen, Bryophyten, Pteridophyten, Gymnospermen: Samen von Coniferen, Gnetales: Ephedra-Samen, vgl. KIRK und TILNEY-BASSETT 1967). In diesen Fällen ist zu erwarten,

daß Modus und Ausmaß photoregulierter Prozesse während der Chloroplastengenese unterschiedlich ausgeprägt sein müssen. Bei der lichtunabhängigen Entwicklung der Chloroplasten muß eine lichtunabhängige rRNA-Synthese vorhanden sein. In den Fällen bei Angiospermen, in denen Teilschritte der Plastidenentwicklung lichtunabhängig sind (Proplastide → Etioplast), kann Licht allenfalls quantitativen, jedoch keinen qualitativen Einfluß auf die rRNA-Synthese der Plastiden haben. In den Fällen, bei denen vom Protochlorophyll, Phytochrom oder anderen Photoakzeptoren (HENNINGSEN 1967) absorbiertes Licht zur Komplettierung eines funktionierenden Photosyntheseapparates benötigt wird (Etioplast → Chloroplast), kann sekundär eine lichtinduzierte, plastidäre rRNA-Synthese stattfinden.

Der Nachweis lichtinduzierter RNA-Polymeraseaktivität (BOGORAD 1967, POULSON und BEEVERS 1970, BOTTOMLEY 1970), die Isolierung von Polysomen (WILLIAMS und NOVELLI 1968) und die selektive Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (BOGORAD und JACOBSON 1964) mit Antimetaboliten (z.B. Actinomycin D) zeigen, daß photoinduzierte mRNAs bei der Entwicklung von Etioplasten zu Chloroplasten synthetisiert werden müssen. BOARDMAN (1966) nimmt an, daß dabei die bereits in den Etioplasten vorhandene 70 S Ribosomengarnitur verwendet wird, ohne daß es zu einer Neusynthese von Ribosomen während der Chloroplastengenese kommt.

Im folgenden wird die Kinetik der plastideneigenen rRNAs während der Plastidenentwicklung in Primärblättern von *Hordeum vulgare* untersucht. Mit gelelektrophoretischen (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und chromatographischen (MAK-Säule) Methoden wurde Vorkommen und Verbreitung von ribosomalen RNAs (23 S, 16 S, 5 S) während der Primärblattentwicklung in Dunkelheit und im Licht verglichen und der Einfluß von verschiedenen Inhibitoren der DNA- und RNA-Synthese auf die Nucleinsäuresynthese der Plastiden und auf die substrukturelle Ausprägung der Chloroplastenstrukturen untersucht.

Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. 'Bido' wurden auf feuchtem Filterpapier in großen Petrischalen bis zu 9 Tagen kultiviert (21°C). Vor der Nucleinsäureextraktion wurden die Embryonen, Primär-

blätter bzw. Primärblattspitzen Oberflächen-sterilisiert (70% Äthanol 2'; 3% Na-hypochlorid enthaltend 0,5% Teepol, 20'; und wiederholtes Waschen in sterilem, destilliertem Wasser). Die Anzucht erfolgte in absoluter Dunkelheit bzw. bei Dauerbelichtung (Philips TLW Leuchtstoffröhren, 5 kLux). Zur Untersuchung gelangten trockene, freipräparierte Embryonen aus 4 bzw. 24 Stunden eingequollenen Karyopsen, 3 und 5 Tage alte Primärblätter und Primärblattspitzen (5 cm) aus 7 bzw. 9 Tage alten Kulturen.

Für die Inhibitorenexperimente wurden etioliierte Primärblätter oberhalb der Coleoptile abgeschnitten und vor der Belichtung 3 Stunden in die in dest. Wasser gelösten Inhibitoren gestellt.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Embryonen bzw. 1 mm<sup>2</sup> große Blattstückchen mit Glutaraldehyd (6,25%, pH 7,2) fixiert, in Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und in 1% OsO<sub>4</sub> nachfixiert (pH 7,2), mit Äthanol entwässert und niedervisköses Epon (SPURR 1969) überführt. Die Blöckchen wurden mit Diamant-Messern (DuPont) geschnitten (Ultramikrotom: Sorvall) und die Ultradünnschnitte mit Bleicitrat kontrastiert (VENABLE und COGGESHALL 1965) und im Elmiskop I (Fa. Siemens) elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Extraktion der Nucleinsäuren wurde in eisgekühlten Mörsern nach der Phenol-Kresol-Methode von KIRBY und Mitarbeitern (1967) durchgeführt. Die Äthanol-Kresol gefällten Nucleinsäuren (-20°C) wurden abzentrifugiert und in SSC-Puffer (0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citrat (pH 7,15) gelöst. Zur Elektrophorese wurden 100 - 200 µg gelöste Nucleinsäuren mit wenig RNase-freier Saccharose versetzt und auf die Trenngele durch Unterschichtung des oberen Elektrodenpuffers aufgetragen. Für die Coelektrophorese von 23 S und 16 S RNA aus E. coli (Miles Laboratories, Inc.) wurden je 20 µg Nucleinsäuren aufgetragen.

Die gelelektrophoretische Trennung in Polyacrylamidgelen erfolgte unter den von LOENING (1967) angegebenen Bedingungen. Die Elektrodenpufferlösung (E-Puffer) enthielt 0,24 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,12 M wasserfreies Na-acetat und 0,06 M EDTA-

dinatriumsalz (pH 7,15). Die Nucleinsäuren wurden in kombinierten Polyacrylamidgelen getrennt (2,4%iges, 10 - 11 cm langes Obergel zur Trennung von DNA und hochmolekularer RNA; 7,5%iges, 4 cm langes Untergel zur Trennung von 5 S RNA und transfer RNA). Die Trenndauer betrug 4 Stunden bei 5 mA/Gelröhrchen. Zur Bereitung des Gels mit 2,4% Monomer wurden gemischt:

4,15 ml E-Pufferlösung,  
2,00 ml einer Lösung, die 15 g Acrylsäureamid und 0,75 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid pro 100 ml der wässrigen Lösung enthält,  
0,10 ml 10%iger Ammoniumperoxodisulfatlösung,  
0,10 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin,  
6,22 ml destilliertes Wasser.

Zur Bereitung des Gels mit 7,5% Monomer wurden gemischt:

1 ml einer Lösung, die pro 100 ml dest. Wasser 48 ml 0,1 n HCl, 0,23 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin und 36,6 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan enthält.  
2 ml einer Lösung, die 30 g Acrylsäureamid und 0,8 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid pro 100 ml der wässrigen Lösung enthält,  
3 ml einer Lösung von 0,14 g Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml dest. Wasser,  
4 ml destilliertes Wasser.

Zur Trennung der niedermolekularen plastidären und cytoplasmatischen 5 S RNA und der tRNA wurden 15% Gelsysteme verwendet. Für die Bereitung dieser Gele gilt die gleiche Zusammensetzung wie für 7,5%ige Gele. Es wird nur die Acrylsäureamidlösung durch eine Lösung ersetzt, die 60 g Acrylsäureamid und 1,6 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid pro 100 ml Lösung enthält. Die getrennte DNA und RNA wurde colorimentrisch mit stains all [1-Äthyl-2,3-(1-Äthylnaphto-1,2-thiazolin-2-yliden)-2-methylpropenylnaphto-1,2-thiazoliumbromid] differenziert. Damit lassen sich zur gleichen Zeit DNS, RNS und Proteine unterschiedlich anfärben. DNS liefert einen rot-violetten Farbton, RNS liefert eine blaue Färbung. Zur Färbung werden die Gele für 12 bis 16 Stunden in essigsaurer Färbelösung im Dunkeln inkubiert und im Chromoscan (Fa. Joyce und Loeb1) bei 260 nm in

in einer Quarzküvette (Länge 10 cm) photometriert. Zur quantitativen Bestimmung der Einzelfraktionen wurde die Fläche durch Integration über die Peakfläche bestimmt oder die Einzelpeaks bei der Flächenberechnung als angenäherte Dreiecke angenommen, wobei als Basislinie die Mittellinie zwischen der Basislinie einer Blindprobe und der minimalen Absorption der Probe festgelegt wurde (Abweichung für 25 S rRNA 3%, für 23 S und 18 S und 16 S rRNA 1 - 2%).

Für die Markierungsexperimente wurden die abgeschnittenen Primärblätter teilweise in trägerfreier, wässriger  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphatlösung (10 oder 25  $\mu\text{Ci/ml}$ ) für 3 Stunden in Dunkelheit vorinkubiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Gele auf Trockeneis eingefroren und mit einem Gelschneidegerät (Mickle Lab. Eng. Comp.) in 1 mm-Scheibchen zerlegt. Die Schnitte wurden auf Filterpapier angetrocknet (2 Stunden  $70^{\circ}\text{C}$ ) und ihre Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tri-Carb 3075, Fa. Packard) bestimmt. Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus 0,1 g POPOP (1,4-di (2-(5-phenyloxazolyl) )-benzol), 4g PPO (2,5-Diphenyloxazol) auf 1 000 ml Toluol.

Alternativ zur Trennung der Nucleinsäuren in Polyacrylamidgelen wurden phenolextrahierte Nucleinsäuren (50 - 200 O.D.) aus etiolierten, ergrünenden und grünen Blättern oder daraus isolierten Plastiden (vgl. Kap. VIII) säulenchromatographisch mit methyliertem Albumin an Kieselgur (MAK) getrennt (SUEOKA und CHENG 1962). Die niedermolekularen Nucleinsäuren wurden im linearen, phosphatgepufferten Gradienten bis 0,5 M NaCl (pH 6,9) eluiert. Die DNA wurde im NaCl-Gradienten (0,5 - 1,0 M, pH 6,9) von der MAK-Säule gewaschen. Hochmolekulare, ribosomale RNA wurde mit 1,0 - 1,5 M NaCl Gradienten (pH 6,9) von der Säule eluiert. Die unterschiedliche Steilheit des NaCl-Gradienten (Beckman Gradientenpumpe 131) ist in Abb. 44 angegeben. Die Absorption der getrennten Nucleinsäuren wurde bei 254 nm (Uvicord I) im Durchfluß simultan mit der Bestimmung der Radioaktivität (Tri-Carb Durchflußratemeter, Modell 3022, Fa. Packard) registriert.

Die Entwicklung zu Etioplasten und Chloroplasten aus Proplastiden in belichteten bzw. unbelichteten Primärblättern der Gerste

führt zu einer auffälligen Veränderung in der Ausgestaltung des inneren Membransystems beider Plastidentypen. Im wesentlichen verläuft der Prozeß der Plastidenentwicklung nach dem von MÜHLETHALER und FREY-WYSSLING (1959) entwickelten Modell der Plastidendifferenzierung (vgl. Kap. I). Vergleicht man die Ultrastruktur der Plastiden aus Embryonen und 3, 5, 7 und 9 Tage alten belichteten und unbelichteten Primärblättern der Gerste, so ergeben sich speziell bei der Genese und Anordnung des inneren Membransystems der Plastiden wesentliche Unterschiede (Abb. 56, 57).

Die linke Spalte der Abbildung 56 zeigt Veränderungen der Ultrastruktur während der Etioplastengnese. Die Proplastiden der Embryonen sind von einer doppelten Plastidenhüllmembran umschlossen, deren innere fingerförmig in das Stroma eingestülpt sein kann. Das Stroma der Proplastide ist weitgehend elektronentransparent: Plastoglobuli sind selten vorhanden. Während im Cytoplasma dicht gepackte Ribosomen vorkommen, sind in den Proplastiden keine oder nur wenige Ribosomen nachzuweisen. Auffällige, elektronenmikroskopisch erfaßbare Unterschiede der Form und Struktur von Proplastiden aus 4 Stunden bzw. 24 Stunden eingequollenen Embryonen, der belichteten oder unbelichteten Kulturen sind in diesem Stadium noch nicht vorhanden (Abb. 56, 57).

Deutliche Unterschiede in der Struktur des inneren Membransystems lassen sich in den Plastiden von 2 und 3 Tage alten, etiolierten bzw. belichteten Primärblättern nachweisen. Diese Etioplastenvorstufen besitzen perforierte Membranen, die von der inneren Plastidenhüllmembran abgeschnürt werden und die als Vorstufen des Prolamellarkörpers aufzufassen sind. Die für ältere Blätter typische parakristalline Anordnung der Prolamellarkörper ist jetzt noch nicht ausgebildet. Plastoglobuli und Uranylacetatkontrastierbare Ribosomen sind im Plastidenstroma vorhanden (Abb. 56).

Entsprechende Differenzierungsstadien von Plastiden aus belichteten Primärblättern haben bereits die für Chloroplasten typischen Feinstrukturmerkmale. Sie besitzen wenige Stroma- und Grana-

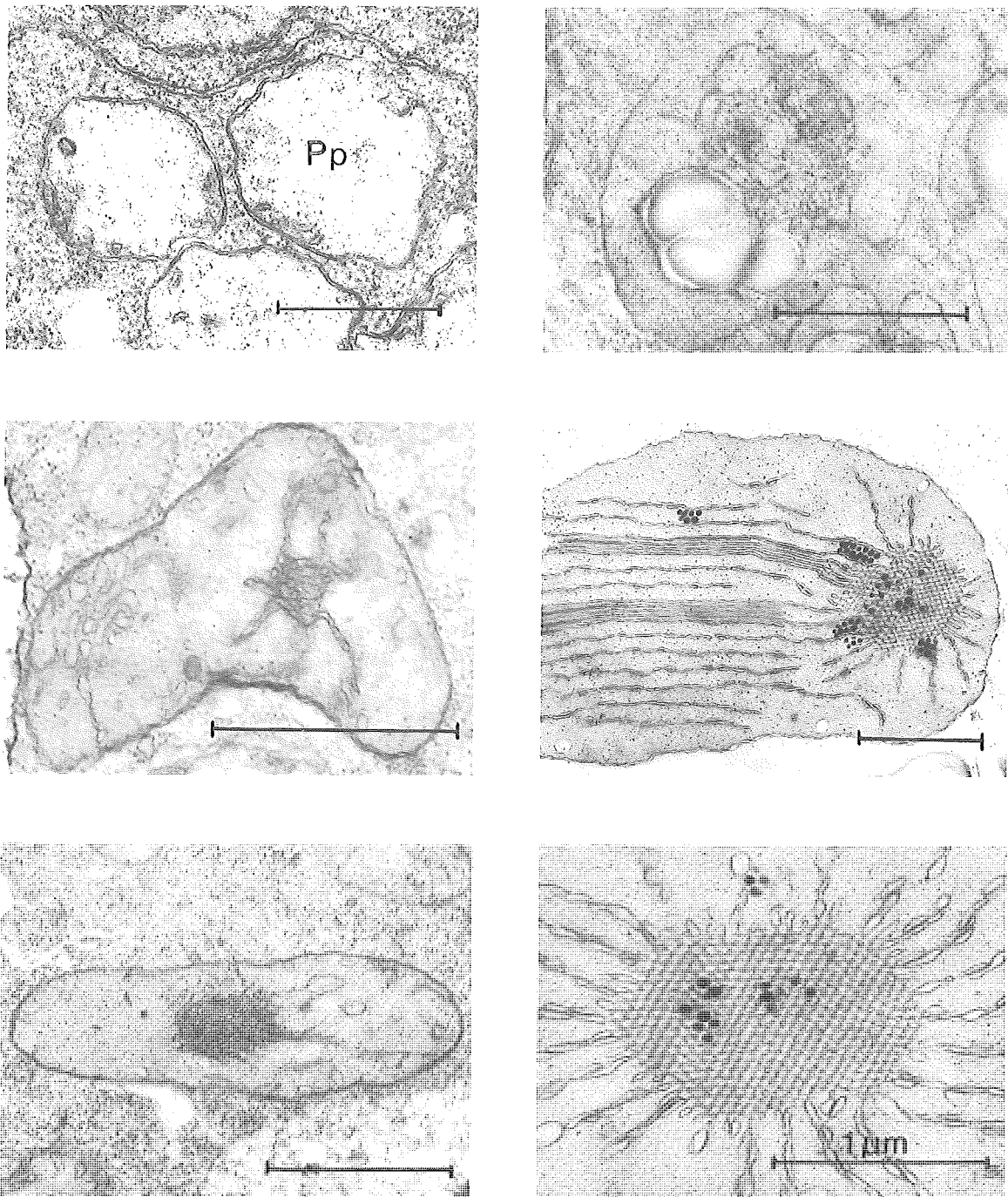


Abb. 56: Etioplastenentwicklung in Embryonen und Primärblättern von *H. vulgare* in Dunkelheit: 0, 48, 72 Stunden (linke Spalte, von oben nach unten); 96, 120, 168 Stunden (rechte Spalte, von oben nach unten)

thylakoide. Der Durchmesser dieser Jungchloroplasten ist noch wesentlich kleiner als der von Chloroplasten 9 Tage alter Primärblätter. Ihr Stroma enthält Plastoglobuli und Ribosomen (Abb. 57).

Die Ausbildung der typischen parakristallinen Anordnung der Prolamellarkörpermembranen beginnt mit dem vierten Tag der Blattentwicklung. Etioplasten von 5, 7 und 9 Tage alten Primärblattspitzen besitzen kristallin angeordnete Prolamellarkörper, deren Durchmesser mit zunehmendem Blattalter wächst (Abb. 56). Elektronenstreuende Plastoglobuli sind überwiegend in den Prolamellarkörpern oder haufenartig in dichtester Packung an der Peripherie des Prolamellarkörpers verteilt. Ribosomen ließen sich in allen untersuchten Etioplasten nachweisen.

In diesem Zusammenhang sind dc-Trennungen der Chlorophyllide aus den jungen, etiolierten Primärblattstadien nach der bei SCHNEIDER (1967) angegebenen Methode von Interesse. Dunkelgekeimte, zwei bzw. drei Tage alte Primärblätter von *H. vulgare* besitzen bereits Protochlorophyll(id), ohne daß - unter ultrastrukturellen Aspekten - parakristalline Prolamellarkörper in den Etioplasten ausgebildet sind. Die in diesen jungen Etioplasten vorherrschenden Membranen sind poröse, perforierte, flächig ausgebildete Schichten (sheets), wie sie von WEIER und BROWN (1970) beschrieben worden sind. Unter Berücksichtigung der Untersuchungen von SCHIFF und KLEIN (1972) an *Phaseolus vulgaris* sollte es sich in diesem Falle um bei 637 nm absorbierendes Protochlorophyll(id) ( $P_{637}$ ) handeln, während  $P_{650}$  später - zusammen mit der Kristallgitterstruktur in typischen, älteren Etioplasten - auftritt.

Chloroplasten aus vergleichbar alten grünen Primärblattspitzen haben flächig angeordnete Stroma- und Granathylakoide. Die Plastoglobuli sind solitär zwischen den Thylakoiden verteilt. Das Stroma ausdifferenzierter Chloroplasten enthält Ribosomen in monosomaler Anordnung (Abb. 57).

Den unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Plastiden während der Etio- bzw. Chloroplastenentwicklung lassen sich

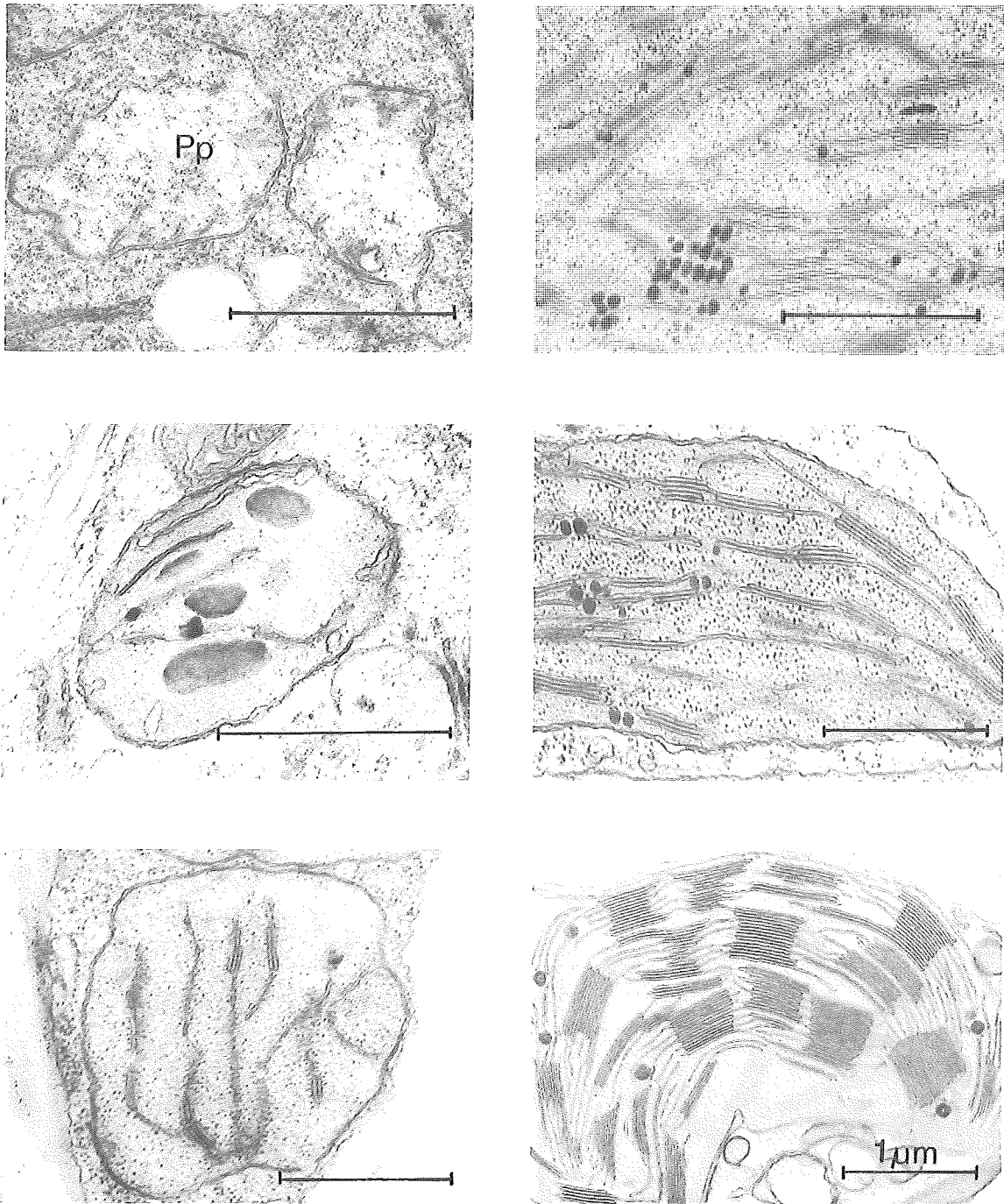


Abb. 57: Chloroplastenentwicklung in Embryonen und Primärblättern von *H. vulgare* während kontinuierlicher Belichtung (5 kLux). Belichtungsdauer: 0, 48, 72 Stunden (linke Spalte, von oben nach unten); 96, 120, 168 Stunden (rechte Spalte, von oben nach unten)

qualitative Veränderungen der hochmolekularen, plastidären rRNA (23 S, 16 S) zuordnen. Nach gelelektrophoretischer Trennung der Nucleinsäuren aus Embryonen sind in den 2,4%igen Obergelen drei Fraktionen colorimetrisch mit "stains all" und photometrisch durch ihre Extinktion bei 260 nm nachweisbar. In Richtung abnehmender Molekulargewichte werden die DNA und zwei Banden cytoplasmatischer, ribosomaler RNA (25 S, 18 S) fraktio- niert. In den 7,5%igen Untergelen trennen sich die 5 S RNA und die transfer RNA auf. Plastidäre, hochmolekulare RNA ist in den Pherogrammen von Nucleinsäuren proplastidenhaltiger, embryonaler Gewebe nicht vorhanden, wenn auf die Polyacrylamidgele die für Nucleinsäuretrennungen übliche Probenmenge aufgetragen wird (Abb. 58).

Dieses Ergebnis bestätigt die elektronenmikroskopischen Unter- suchungen der Ultrastruktur von Proplastiden in meristematischen Geweben von eingequollenen Karyopsen. Im weitgehend ER-freien Cytoplasma sind überwiegend cytoplasmatische Ribosomen vorhanden. Das Proplastidenstroma enthält keine oder nur wenige Ribosomen. Wenn die Trennröhrchen mit Nucleinsäuren überladen werden ( $>200 \mu\text{g}$ ), treten nach der Elektrophorese im Bereich der pro- spektiven 23 S bzw. 16 S RNA schwach angedeutete Banden auf.

Die weitere Entwicklung der Proplastiden und die Bildung junger Etioplasten mit porösen Membranen und Prolamellarkörper-ähnlichen Vorstufen ist mit dem Auftreten von 23 S und 16 S RNA korre- liert. In 3 Tage alten etioliierten Blättern (Blattlänge 2 - 2,5 cm) ist die plastidäre, hochmolekulare RNA als schwache Schulter im Bereich der 23 S und 16 S RNA angedeutet (Abb. 58). In den Densitogrammen gleichalter, grüner Primärblätter mit Jungchloro- plasten sind kleine, aber deutliche abgesetzte 23 S und 16 S RNA-Banden zu erkennen (Abb. 58).

Fünf Tage alte und ältere (7 - 9 Tage) Spitzen von Primärblättern haben weitgehend konstante Zell- und Plastidenzahlen (SMITH 1970). In dieser Entwicklungsphase vollzieht sich die Ausbildung der typischen, ultrastrukturellen Merkmale der Etioplasten bzw. Chloroplasten (Abb. 56, 57). Der Gehalt an 23 S und 16 S RNA ist in belichteten und unbelichteten Primärblättern gleich und

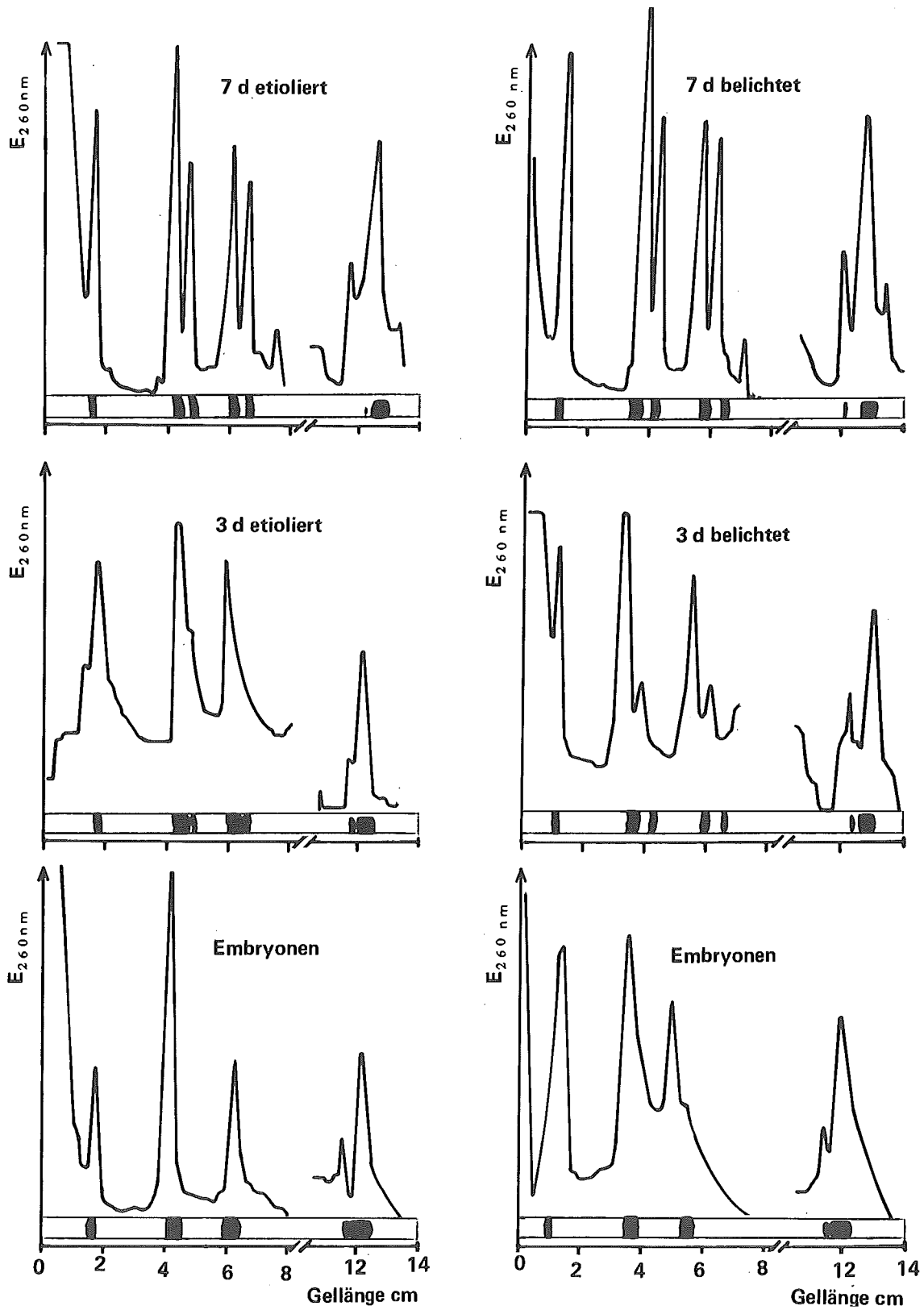


Abb. 58: Gelelektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren aus unterschiedlich alten Primärblättern von *H. vulgare* nach Anzucht in Dunkelheit bzw. im Licht

nimmt - wie die planimetrische Auswertung ergab - mit steigendem Blattalter ( 9 Tage) nicht weiter zu.

Ein Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der einzelnen plastidären rRNA-Komponenten der Embryonen und junger Primärblätter ergibt bei ihrer Entwicklung bis zum fünften Tag der Blattentwicklung eine rapide Zunahme des 23 und 16 S RNA-Gehaltes. In älteren Primärblättern bleibt die Gesamtmenge der hochmolekularen Plastiden-rRNA konstant (Tab. X).

Licht scheint nur in jungen Primärblättern einen (geringen) Einfluß auf den Gehalt an ribosomaler, plastidärer rRNA zu haben. In 3 Tage alten grünen Primärblättern ist die 23 S und 16 S RNA um 3% gegenüber den etiolierten Primärblättern erhöht. Inwieweit diese leichte Zunahme des rRNA-Gehaltes in jungen, grünen Primärblättern Ausdruck einer erhöhten Plastidenanzahl ist, - d.h. möglicherweise gleicher rRNA-Gehalt pro Plastide - wurde nicht untersucht. Keine Unterschiede im Gehalt ribosomaler rRNA ergeben sich für dunkelgekeimte Blätter mit ausdifferenzierten Etioplasten und kontinuierlich belichteten Blättern mit Chloroplasten, die älter als 5 Tage waren.

Das Verhältnis der 25 S zu 18 S RNA beträgt 1,4 - 1,5 und ist in allen untersuchten etiolierten und grünen Blattentwicklungsstadien gleich. Das aufgrund der Absorptionsverhältnisse bei 260 nm berechnete Verhältnis der 23 S : 16 S ist 1 (Tab. X). Eine Korrektur der leicht degradierenden 23 S RNA in eine 18 S und 13 S Komponente, die zu einer Erhöhung dieses Quotienten führen würde, wurde nicht vorgenommen, weil unter den oben angeführten Extraktionsbedingungen die Menge der Abbauprodukte von RNA im Bereich der 23 S RNA innerhalb der Fehlergrenze der Auswertmethode lagen. Entsprechend diesem Ergebnis fanden LOENING und INGLE 1967 in höheren Pflanzen aufgrund der Absorptionsverhältnisse von 23 S und 16 S RNA gleiche Mengenverhältnisse für plastidäre rRNA unterschiedlichster taxonomischer Herkunft.

Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Trennung von plastidenspezifischer, hochmolekularer RNA aus Plastiden unterschiedlichen Differenzierungsgrades zeigen, daß im Falle von *Hordeum*

Tab. X

Prozentuale Verteilung einzelner Nucleinsäurefraktionen aus belichteten (5 kLux, Weißlicht) und etiolierten Primärblättern der Gerste (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Versuchsdauer	DNA		25 S		23 S		18 S		16 S		5 S		4 S	
	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	etiol., bel.	
24 Stunden*	13.7	13.4	28.3	30.3	-	-	19.5	20.0	-	-	6.8	5.0	31.4	27.2
72 Stunden	11.7	10.8	25.2	26.0	7.6	10.1	14.4	18.0	7.7	10.2	6.7	5.3	26.7	18.5
120 Stunden	13.8	17.4	23.5	23.4	10.7	10.8	16.5	16.4	10.8	10.8	6.2	5.9	19.1	15.2
168 Stunden	12.6	13.3	20.6	22.4	11.7	11.8	14.7	16.6	12.3	11.8	5.9	5.4	22.7	18.9
216 Stunden	17.7	14.1	22.7	21.0	12.6	11.3	15.7	15.7	11.5	12.3	6.7	5.2	18.5	20.4

\*freipräparierte Embryonen

keine Stimulierung durch Licht induziert wird. Setzt man voraus, daß die Zahl der Etioplasten und Chloroplasten pro Zelle in den untersuchten Primärblattspitzen gleich ist (SMITH 1970), dann haben Etioplasten und Chloroplasten der ausdifferenzierten Primärblätter bzw. Primärblattspitzen von *H. vulgare* den gleichen Gehalt an hochmolekularer ribosomaler RNA. In jungen 3 Tage alten, grünen Primärblättchen ist der Gehalt an 23 S und 16 S leicht erhöht. Denkbar wäre, daß in diesen Jungchloroplasten aus belichteten Kulturen vermehrte Plastidteilungen gegenüber den Dunkelkontrollen stattfinden, ohne daß de facto eine Erhöhung des rRNA-Gehaltes pro Plastide vorliegt.

Das Resultat entspricht im wesentlichen den von SMITH und Mitarbeitern (1970) und POULSON und BEEVERS (1970) an *Hordeum* durchgeführten Untersuchungen und entsprechenden, von SCOTT und Mitarbeitern (1970) an *Triticum*-Keimlingen mit gelelektrophoretischen Methoden durchgeführten Arbeiten. Danach ergibt sich in der frühen Phase der Blatentwicklung (3 - 5 Tage) eine starke Zunahme von 23 S und 16 S RNA, die in den grünen Blättern gegenüber den etiolierten leicht erhöht sein kann. Ältere Blattspitzen (5 - 7 Tage) haben den gleichen Gehalt an hochmolekularer, plastidärer rRNA.

Die niedermolekulare RNA wird in den 7,5%igen Untergelen in eine 5 S und 4 S-Bande getrennt (Abb. 58). Dabei ist kein wesentlicher qualitativer Unterschied zwischen beiden Versuchsansätzen unter den oben beschriebenen Trennbedingungen zu erkennen. Embryonen und 3 Tage alte Primärblättchen dunkel- bzw. lichtgekeimter Pflanzen haben einen relativ hohen Anteil an tRNA, der mit zunehmendem Blattalter abnimmt (Tab. X).

Um eine weitere Auftrennung der 5 S RNA als Komponente der größeren Untereinheit der 70 S bzw. 80 S Ribosomen zu erreichen, wurden kleinporige Gele durch Erhöhung der Monomerkonzentration (12,5 bzw. 15%) verwendet. Zur Trennung der 5 S RNAs wurde die vorfraktionierte 5 S Bande aus den 7,5%igen Untergelen geschnitten und erneut auf die 15%igen Gele aufpolymerisiert (Abb. 59). Alternativ dazu wurde der Gesamtnucleinsäureextrakt auf

die Trennröhrchen aufgetragen: DNA und native hochmolekulare rRNA wandern nicht oder nur geringfügig in das 15%ige Gel ein. Der Gelanfang ist dann jedoch häufig mit denaturierten (?), niedermolekularen RNA-Fraktionen durchsetzt (Abb. 60).

Als Referenz zur Bestimmung der S-Werte für die niedermolekulare RNA wurde 5 S RNA aus RNase-freien *E. coli* Stämmen verwendet. Die Nucleinsäuren wurden mit Phenol aus *E. coli* in der log-Phase extrahiert. Die hochmolekulare RNA wurde mit 2 M LiCl bei 0°C gefällt und auf MAK-Säule getrennt. Das proteinfreie Testpräparat (Miles Laboratories, Inc.) enthielt (keine DNA) 23 S und 16 S RNA, jedoch etwa 5 - 10% tRNA.

Ziel der folgenden Untersuchungen war

- ein Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von niedermolekularer rRNA aus *E. coli* mit 5 S RNAs aus *H. vulgare*;
- das Verhalten der plastidären 5 S RNA in Abhängigkeit von der Plastidendifferenzierung in *H. vulgare* zu verfolgen. Dazu wurden niedermolekulare RNAs aus Proplastiden-haltigen Embryonen und aus Etio- bzw. Chloroplasten-haltigen Primärblättern verglichen.

In höheren pflanzlichen Organismen sind zwei Typen von Ribosomen vertreten, die sich - neben unterschiedlichem Verhalten gegenüber einigen Hemmstoffen der Proteinsynthese - u.a. in ihren Molekulargewichten, der Proteinzusammensetzung, den Sedimentationskoeffizienten ihrer Untereinheiten und deren hochmolekularen, ribosomalen RNAs unterscheiden.

Monosomen vom Prokaryontentyp haben Sedimentationskoeffizienten von etwa 70 S (TAYLOR und STORCK 1964). Sie sind in Bakterien, Cyanophyceen und Etio- bzw. Chloroplasten verbreitet. Für die Stabilität ihrer Untereinheiten (50 S, 30 S) werden relativ hohe  $Mg^{++}$ -Konzentrationen (5 - 10 mM) benötigt (BOARDMAN et al. 1965, PETERMAN 1964, HSIAO 1964). Ihre Aktivität in vivo et in vitro wird durch spezifische Inhibitoren, wie Chloramphenicol, Lincomycin, Erythromycin und Spectinomycin gehemmt (VASQUEZ 1966, ELLIS 1969, 1970). Die Sedimentationskoeffizienten der hoch-

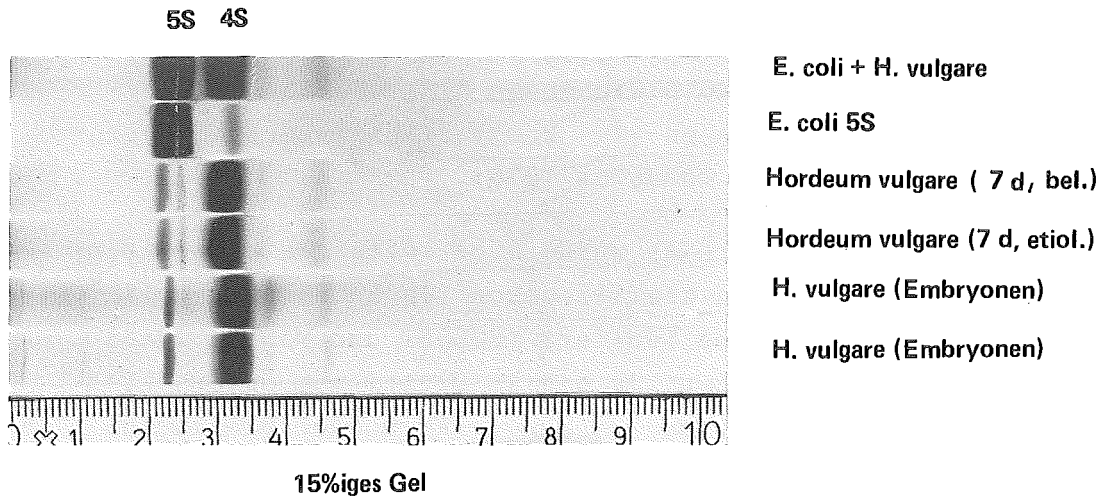


Abb. 59: Elektrophorese von niedermolekularer RNA aus Embryonen der Gerste (24 Stunden eingequollen, oberflächensterilisiert und freipräpariert), aus belichteten (5 kLux Dauerlicht) und etiolierten Primärblättern der Gerste, aus E. coli und Coelektrophorese von E. coli RNA mit H. vulgare (7 Tage belichtet) - RNA. Anfärbung mit "stains all"

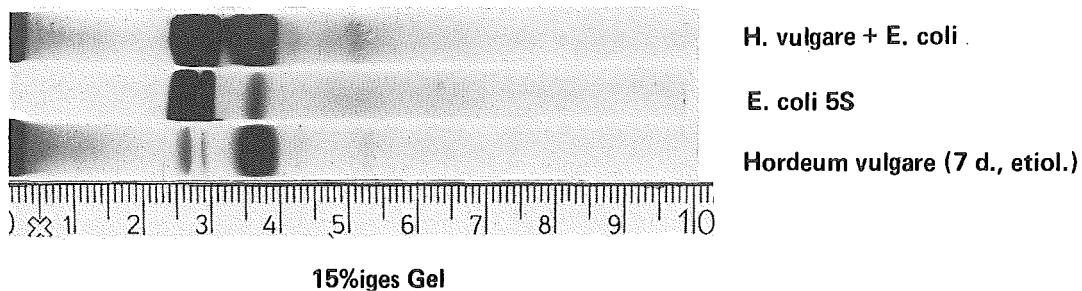


Abb. 60: Elektrophoresen und Coelektrophorese von niedermolekularer RNA aus Primärblättern 7 d alter, etiolierter Gerste und von E. coli. Anfärbung der Polyacrylamidgelle mit "stains all"

molekularen rRNA betragen 23 S (M.W.  $1,1 \times 10^6$ ) und 16 S (M.W.  $0,56 \times 10^6$ , STUTZ und NOLL 1967, LOENING 1968).

Monosomen vom Eukaryontentyp sind Bestandteil des Cytoplasmas höherer pflanzlicher und tierischer Zellen. Sie besitzen Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 80 S, deren Untereinheiten bei  $Mg^{++}$ -Entzug in 60 S und 40 S Untereinheiten dissoziieren.

Die Untereinheiten enthalten hochmolekulare rRNA von 27 - 25 S (M.W.  $1,75 - 1,3 \times 10^6$ ) und 18 S (M.W.  $0,7 \times 10^6$ , STUTZ und NOLL 1967, LOENING 1968). 80 S Ribosomen bleiben in relativ niedrigen  $Mg^{++}$ -Konzentrationen (1 - 2 mM) stabil und sind gegenüber Cycloheximid sensitiv (BOULTER 1970).

Neben den hochmolekularen rRNAs wurde eine weitere niedermolekulare rRNA mit Sedimentationskoeffizienten von 5 S aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (ROSSET und MONIER 1963). Sie ist universell verbreitet, da sie in Organismen unterschiedlichster taxonomischer Stellung nachgewiesen wurde: *Blastocla diella emersonii* (COMB und KATZ 1964), Säugetierleber (JACKSON 1966), verschiedene Cyanophyceenarten (PAYNE und DYER 1972), *Chlorella* (t-like RNA, GALLING 1967) und Blätter von *Vicia faba* (DYER und LEECH 1968). Diese dritte, ribosomale RNA ist essentieller Bestandteil der größeren Ribosomenuntereinheit. Ribosomen, denen die 5 S RNA fehlt, können im zellfreien System keine durch Polyuridylsäure gesteuerte Polyphenylalanin-Synthese durchführen (SARKAR und COMB 1966). Möglicherweise stabilisiert sie den Komplex aus tRNA und Ribosom (SIDDIQUI und HOSOKAWA 1969, ERDMANN et al. 1971). Die Basenfolge der 5 S RNA in *E. coli* wurde sequenziert (BROWNLEE et al. 1968), und es gibt - aufgrund intramolekularer Homologien - Hinweise für den evolutionären Ursprung von tRNA und 5 S RNA aus einer "ancestralen" RNA von gemeinsamer Nucleotid-Sequenz (MULLING et al. 1973).

Grüne Blätter höherer Pflanzen (*Vicia faba*, *Allium porrum* und *Zea mays*) besitzen zwei - entsprechend dem Gehalt an 70 S und 80 S Ribosomen - 5 S RNAs, die durch ihr unterschiedliches Verhalten an MAK-Säulen getrennt werden können (DYER und LEECH 1967, RUPPEL 1969). Die 5 S RNAs des Cytoplasmas und der Chloroplasten unterscheiden sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität in hochkonzentrierten Polyacrylamidgelen (DYER und LEECH 1968). Weitgehend plastidenfreie oder leucoplastenhaltige Gewebe (Wurzeln von *Vicia faba*, Blattbasen von *Allium porrum*) enthalten nur 5 S RNA aus 80 S Ribosomen (DYER und LEECH 1968, RUPPEL 1969). In Etioplasten- und Chloroplasten-haltigen Blättern von *Zea mays* sind - je nach Herkunft von plastidären bzw. cytoplas-

matischen Ribosomen - zwei 5 S RNAs mit unterschiedlichem Elutionsverhalten im NaCl-Gradienten von der MAK-Säule eluierbar (RUPPEL 1969). PAYNE und DYER (1971) konnten nach Trennung der Untereinheiten von 80 S und 70 S Ribosomen im Saccharosegradienten und Phenolextraktion ihrer RNAs den Sitz der 5 S RNAs in der jeweiligen größeren Untereinheit (60 S, 50 S) der Monosomen lokalisieren.

Anlaß für die folgende gelelektrophoretische Untersuchung niedermolekularer RNAs war der Umstand, daß sich nur wenige Arbeiten mit einem Vergleich von 5 S RNA-Species aus Organismen unterschiedlicher taxonomischer Stellung befassen. Die Kinetik der plastidären 5 S RNA im Verlauf der Plastidenentwicklung und der Gehalt dieser niedermolekularen RNA in verschiedenen Plastidentypen (Chromo-, Leuco-, Amyloplasten) wurde bisher nicht untersucht. Widersprüchlich sind auch die Ergebnisse über die elektrophoretische Mobilität beider 5 S RNA-Komponenten. Nach DYER und LEECH (1968) hat die plastidäre 5 S RNA größere elektrophoretische Beweglichkeit in Polyacrylamidgelen als die entsprechende cytoplasmatische RNA-Fraktion. DYER und Mitarbeiter geben in späteren Arbeiten (PAYNE und DYER 1971, 1972) für Chloroplasten-5 S RNA langsamere elektrophoretische Beweglichkeit als für die cytoplasmatische 5 S RNA Komponente an.

Nach gelelektrophoretischer Trennung niedermolekularer RNA aus oberflächensterilisierten (4 Stunden eingequollenen) Embryonen von *Hordeum vulgare* erhält man eine langsam wandernde schmale Fraktion und eine breitere Bande mit höherer elektrophoretischer Beweglichkeit (Abb. 59, 60, 61). Ein Vergleich zu coelektrophoretisch getrennter 5 S RNA aus *E. coli*, die etwa 10% tRNA enthielt, zeigt, daß die schnell wandernde - als 4 S bezeichnete Fraktion (Abb. 59) - mit transfer RNA identisch ist (Abb. 61).

Die aus der log-Phase von *E. coli* extrahierte 5 S RNA spaltet sich in 15%igen Gelen in zwei Fraktionen auf: eine langsam wandernde, breite Bande und eine schmalere Bande mit höherer elektrophoretischer Mobilität; letztere ist in den Pherogrammen häufig nur als schwach ausgeprägte Schulter abgesetzt (Abb. 59-61). Die langsam wandernde breite Bande der 5 S RNA von *E. coli*

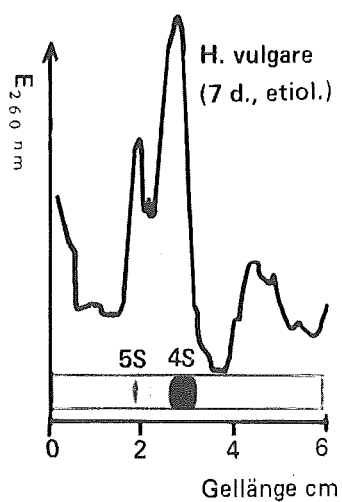
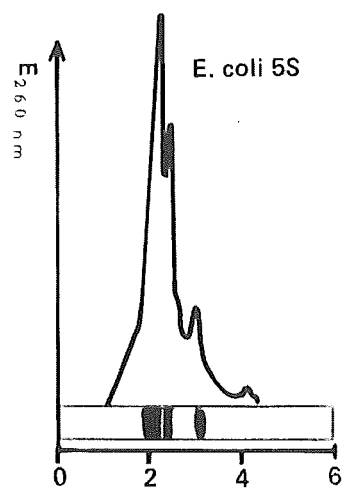
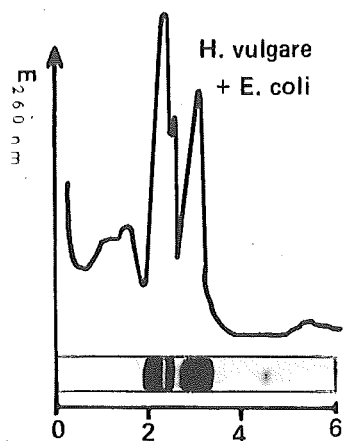


Abb. 61: Trennung von niedermolekularer RNA aus etioliierten Primärblättern der Gerste (unten), E. coli (Mitte) und Coelektrophorese von E. coli plus Gerste (oben) in 15%igen Polyacrylamidgelen (Trennbedingungen: 5 mA/Gel, 4 Stunden; Anfärbung mit "stains all")

und die langsam wandernde niedermolekulare RNA von *Hordeum vulgare*-Embryonen haben gleiche elektrophoretische Mobilität (Abb. 59, 61). Sie muß mit der cytoplasmatischen 5 S RNA identisch sein, weil - nach der elektronenmikroskopischen Untersuchung - in den meristematischen Zellen der Embryonen fast ausschließlich cytoplasmatische Ribosomen und keine oder nur wenige Ribosomen in den Proplastiden vorkommen (Abb. 57).

In Geweben mit ausdifferenzierten Plastiden (Etio- bzw. Chloroplasten) tritt eine zusätzliche Bande mit größerer elektrophoretischer Mobilität als die cytoplasmatische 5 S RNA auf. Diese Bande ist in den Nucleinsäuren aus grünen, mit Dauerlicht belichteten und etiolierten, 7 Tage alten Primärblättern etwa gleich stark ausgeprägt. Sie ist in den Densitogrammen der niedermolekularen RNA aus Embryonen von *H. vulgare* nicht vorhanden (Abb. 62). Daß es sich um eine plastidäre 5 S RNA handeln muß, läßt sich rückschließend folgern:

- Die Fraktion ist nur in Chloroplasten- bzw. Etioplasten-haltigen Blättern vorhanden und fehlt in den Pherogrammen der Nucleinsäuren aus Proplastiden-haltigen Embryonen.
- Die Fraktion tritt synchron mit der Zunahme der hochmolekularen 23 S und 16 S RNA in Erscheinung. Sie ist erst ab dem dritten Tag der Keimung nachweisbar.
- Die Fraktion fehlt in Chromo-, Leuco- oder Amyloplasten-haltigen Geweben; d.h. in entwicklungsgestörten oder degenerierenden Plastidentypen, die - wie die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab - keine oder nur wenige 70 S Ribosomen besitzen. Die Diskrepanz zwischen dem elektronenmikroskopisch nachweisbaren Vorkommen weniger Plastidenribosomen und dem Fehlen der entsprechenden rRNA Fraktionen nach Gelelektrophorese kann insofern erklärt werden, als der relativ geringe Gehalt plastidärer rRNA ( $\sim 2\%$ ) gegenüber dem hohen Anteil cytoplasmatischer rRNA bei der Trennung der Gesamtnucleinsäuren mit den Methoden der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht erfaßt werden kann.

Der planimetrisch - aus den Pherogrammen von Nucleinsäuren aus

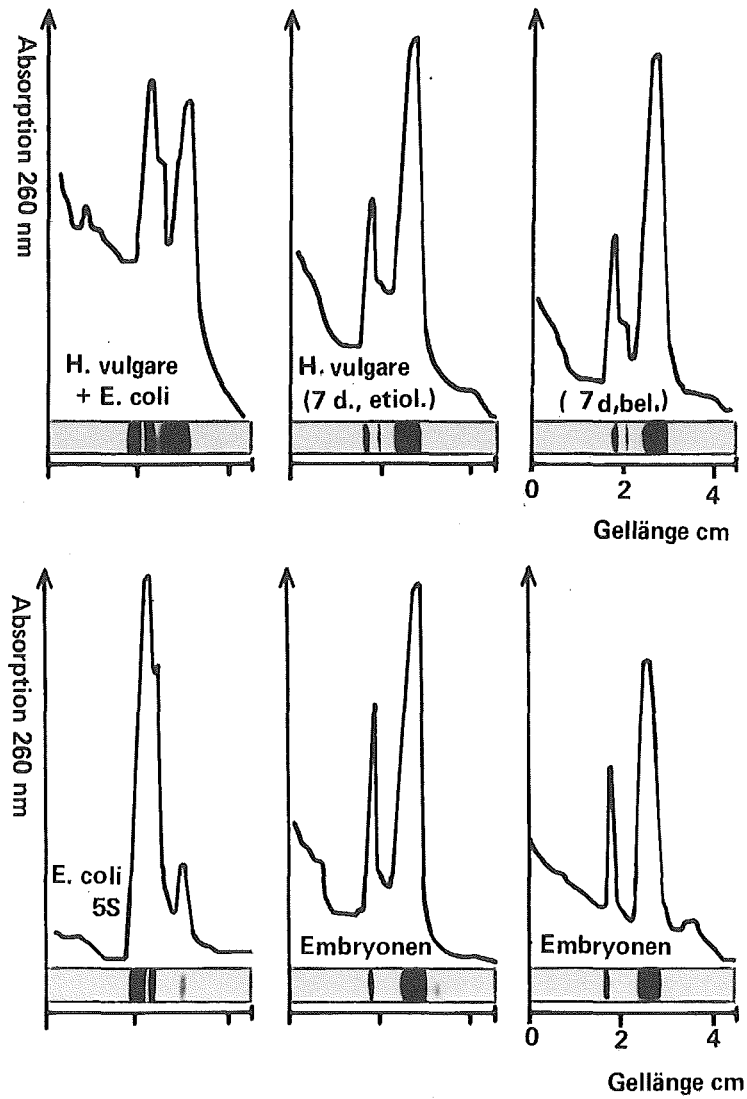


Abb. 62: Trennung niedermolekularer RNA in 15%igen Polyacrylamidgelen aus freipräparierten Gerstenembryonen (unten), belichteten (5 kLux, Dauerlicht) und etiolierten Primärblättern der Gerste (oben). Coelektrophorese von 5 S RNA aus *E. coli* mit niedermolekularer RNA aus 7 Tage belichteten (Dauerlicht, 5 kLux), grünen Primärblättern (obere Reihe, links)

7 Tage alten grünen oder etiolierten Blättern - ermittelte Gehalt an cytoplasmatischer 5 S RNA beträgt 3%; die plastidäre 5 S RNA macht 2% der Gesamtnucleinsäuren aus. Das Mengenverhältnis der 5 S RNAs zur tRNA variiert von 1 : 6 bis 1: 8.

Aufgrund der Ergebnisse der gelelektrophoretischen Trennung niedermolekularer Nucleinsäuren aus Embryonen und Blättern der Gerste mit unterschiedlich ausgeprägtem Differenzierungsgrad ihrer Plastiden darf man schließen, daß:

- mit der Entwicklung der Proplastiden zu Etioplasten bzw. Chloroplasten, die mit einer Zunahme an 70 S Ribosomen und der Synthese hochmolekularer 23 S und 16 S RNA verbunden ist, gleichzeitig die Bildung der plastidären 5 S RNA erfolgt;
- die elektrophoretische Beweglichkeit der plastidären 5 S rRNA größer als die der entsprechenden cytoplasmatischen 5 S rRNA ist.

Hinweise auf die synchrone Bildung hochmolekularer und niedermolekularer rRNA in den Chloroplasten bzw. Etioplasten (23 S, 16 S, 5 S) stützen die Untersuchungen von BROWN und LITTNA (1966) über die rRNA Synthese bei *Xenopus levis*. Danach werden die 5 S RNA und beide cytoplasmatischen, hochmolekularen RNAs parallel synthetisiert. In *Vicia faba*-Blättern ist die lichtinduzierte Bildung der hochmolekularen rRNAs während der Chloroplastengnese aus Etioplasten mit einer Zunahme der plastidären 5 S RNA verbunden. Albina-Mutanten von *V. faba*, die keine elektronenmikroskopisch identifizierbaren Ribosomen im Plastidenstroma enthalten, fehlt die plastidenspezifische 5 S RNA Fraktion (DYER et al. 1971). Analoge Untersuchungen MAK-chromatographierter, niedermolekularer RNA aus *Allium porrum* und *Zea mays* bestätigen, daß die Existenz der plastidären 5 S RNA mit dem Vorkommen von Ribosomen in diesen Zellorganellen verknüpft ist. In Etioplasten und Chloroplasten von *Zea mays* ist 5 S RNA vorhanden; in den weißen Streckungszonen der Blattbasen von *A. porrum*, die Leucoplasten enthalten, fehlt die plastidäre 5 S RNA (RUPPEL 1969).

Um den Zusammenhang der Existenz der hochmolekularen rRNA und der 5 S RNA in Plastiden durch weitere Beispiele zu erhärten, wurden weitere Plastidentypen auf die Verbreitung von 23 S, 16 S und ihre 5 S RNA überprüft.

#### X. 1. Verbreitung von rRNA in verschiedenen Plastidentypen

In Anlehnung an die Klassifizierung von Plastidentypen nach MÜHLETHALER (1971) wurde die Zusammensetzung des Nucleinsäurespektrums und der Einbau von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in Nucleinsäuren aus Geweben mit Chloroplasten (*Hordeum vulgare* L.), Amyloplasten (*Solanum tuberosum* L.), Leucoplasten (*Allium porrum* L.) und Chromoplasten (*Narcissus incomparabilis* Mill.) untersucht.

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden phenol-extrahierte Nucleinsäuren aus ergrünenden Primärblättern der Gerste (drei Tage Etiolement, ein Tag Belichtung mit 2 500 Lux Weißlicht) und aus dunkelgekeimten Ausläuferspitzen von *Solanum tuberosum* getrennt. Ferner wurden die Nucleinsäuren der weißen, basalen Blattscheiden von *Allium* und der Blütenblätter von *Narcissus* nach discelektrophoretischer Trennung untersucht. Das abgeschnittene Blattmaterial bzw. die Stolonenspitzen wurden 3 Stunden mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat ( $20\ \mu\text{Ci/ml}$ ) unter Belichtung (2,5 kLux) inkubiert. Die Nucleinsäuren wurden nach KIRBY und Mitarbeitern (1967) extrahiert und 80 - 100  $\mu\text{g}$  der in SSC-Puffer gelösten Nucleinsäuren in kombinierten Polyacrylamidgelen bei einer Laufdauer von 4,5 Stunden ( $4^\circ\text{C}$ ) unter den oben beschriebenen Bedingungen getrennt (vgl. LOENING 1967). Die niedermolekulare RNA wurde in kombinierten Gelen (Obergel: 2,4% Monomerkonzentration, 4 cm Länge; Untergel: 15% Monomer, 11 cm Länge) weiter aufgetrennt (4 mA/Gel, Laufdauer 4 Stunden,  $4^\circ\text{C}$ ). Die hochmolekulare RNA wandert nicht in das Untergel ein.

Für die präparative Trennung der niedermolekularen RNA-Fractionen

wurde die Discelektrophorese-Apparatur der Fa. Canalco (Prep Disc) verwendet, die mit einer Elutionspuffersteuerung (Fa. "WTW") und einem synchron arbeitenden Punktschreiber (Fa. Witt-hof) ausgestattet wurde. Während der Trennung wurde mit Innen- und Außenkühlung das Gel auf 4°C gekühlt. Das Eluat wurde im Uvicord I (Fa. Colora) bei 254 nm photometriert und anschließend im Fraktionssammler aufgeteilt. Durch die variable Elutionssteuerung kann die Strömungsgeschwindigkeit des Elutionspuffers während der Trennung den Beweglichkeiten der aus dem Gel austretenden Fraktionen synchron angepaßt werden. Dadurch bleiben die ursprünglich im Gel vorhandenen Konzentrationsverhältnisse erhalten. Synchron zum Abfall der Förderleistung der Elutionspufferpumpe werden Punktfolge und Papiervorschubgeschwindigkeit heruntergesteuert (Abb. 63). Zur Trennung wurden 15%ige Gele mit einer Länge von 5 - 7 cm verwendet. Bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel lagen die Trennzeiten zwischen 6 - 8 Stunden. Die Elektrodenpufferlösung und die Elutionspuffer hatten identische Zusammensetzung und entsprachen den bei der analytischen Trennung verwendeten Elektrodenpufferlösungen.

Die DNA und die hochmolekulare, ribosomale RNA (rRNA) aus jungen Primärblättern der Gerste mit Chloroplasten trennen sich in den 2,4%igen Obergelen in fünf Banden auf. Neben der DNA sind 25 S und 18 S RNA als Bestandteile der cytoplasmatischen 80 S Ribosomen und die 23 S und 16 S RNA aus den 70 S Ribosomen der Chloroplasten vorhanden (vgl. LOENING und INGLE 1967). Die niedermolekulare RNA trennt sich im unteren, 7,5%igen Gel in eine 5 S und 4 S Bande auf (Abb. 64, 65). Alle densitometrisch nachweisbaren Nucleinsäurefraktionen aus den jungen, ergrünenden Blättern sind <sup>32</sup>P-markiert (Abb. 65).

Nach discelektrophoretischer Trennung der Nucleinsäuren aus Stolonen von *Solanum tuberosum* mit Amyloplasten sind in den 2,4%igen Obergelen DNA und nur rRNA vom 25 S und 18 S Typ vorhanden. Diese Banden sind radioaktiv markiert. Die rRNA aus Amyloplastenribosomen läßt sich gelelektrophoretisch nicht nachweisen (Abb. 65). Im Stroma der Amyloplasten und Leucoplasten lassen sich jedoch wenige - in bezug auf die große Anzahl der cytoplasmatischen Ribosomen - Plastidenribosomen elektronen-

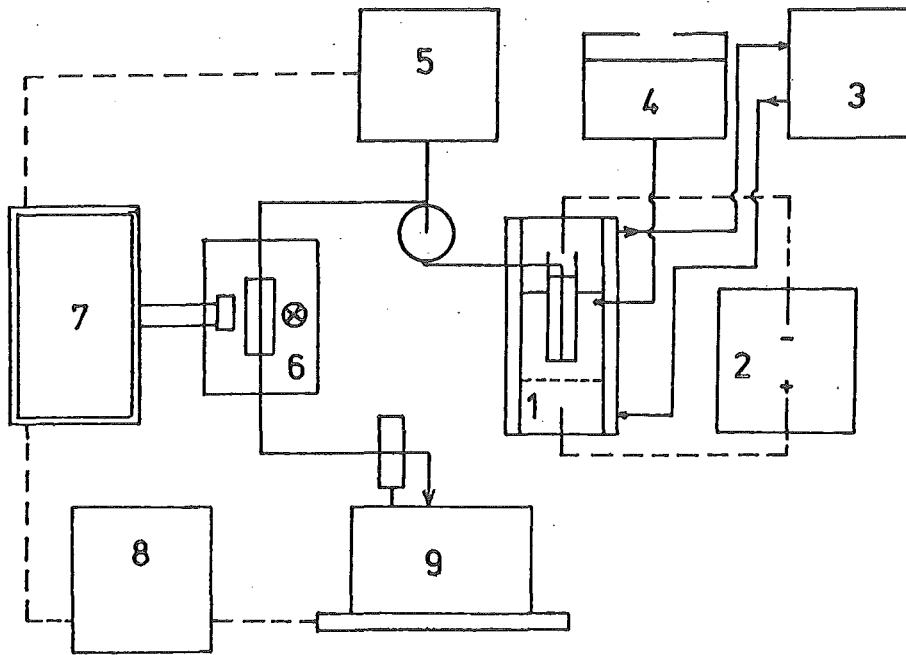


Abb. 63: Apparative Anordnung der präparativen Gelelektrophorese zur Trennung niedermolekularer RNA.  
1 = Trennkammer; 2 = Stromversorgungsgerät;  
3 = Kühlsystem; 4 = Elutionspuffervorrat;  
5 = Elutionssteuerung und Pumpe; 6 = Durchflußphotometer;  
7 = Schreiber; 8 = Fraktionsteilersteuerung;  
9 = Fraktionsteiler

mikroskopisch nachweisen. Das Beispiel beider Plastidentypen verdeutlicht, daß die Existenz weniger Plastidenribosomen nur elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die Methode der Discelektrophorese ist in diesem Falle, d.h. bei einem relativ großen Gehalt an 80 S Ribosomen, nicht ausreichend, um geringe Konzentrationen der rRNAs aus 70 S Ribosomen nachzuweisen.

In den Pherogrammen der Nucleinsäuren aus gelblich-weißen Blattbasen von *Allium* mit Leucoplasten kommen nur die 25 S und 18 S RNA vor. Die 23 S und 16 S RNA ist in den Densitometerkurven nicht - oder nur als schwach angedeuteter Peak - nachweisbar. Dennoch findet im prospektiven Bereich der 23 S und 16 S RNA in den 2,4%igen Obergelen ein Einbau von  $^{32}\text{P}$  statt. Radioaktiv markiert sind ferner die 25 S und 18 S RNA sowie die niedermolekularen RNA Fraktionen in den 7,5%igen Untergelen (Abb. 65).

In den Nucleinsäuren aus Blütenblättern von *Narcissus* mit Chromoplasten läßt sich discelektrophoretisch in den 2,4%igen Gelen keine rRNA vom 23 S und 16 S Typ nachweisen. Der ultrastrukturelle Feinbau der stark degenerierten Plastiden mit myelinartigen, konzentrisch angeordneten Thylakoiden entspricht der von NICHOLS und Mitarbeitern (1967) beschriebenen Chromoplastenstruktur. In den Stromaresten dieses Plastidentyps ließen sich keine Plastidenribosomen nachweisen. Im Cytoplasma sind Ribosomen vorhanden, und ihre RNAs trennen sich nach Discelektrophorese in ihre 25 S und 18 S Anteile auf (Abb. 65).

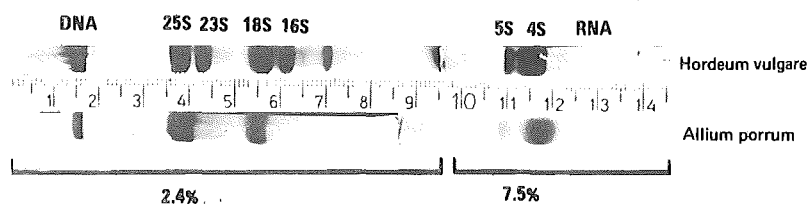


Abb. 64: Trennung von Nucleinsäuren aus *H. vulgare* mit Chloroplasten und *A. porrum* mit Leucoplasten in zusammengesetzten Polyacrylamidgelen. Anfärbung mit 'stains all' (s. Text)

Möglicherweise sind die geringen, von STRAUS (1961) in Chromoplasten nachgewiesenen RNA Anteile (3,3 bzw. 5,9%) auf Verunreinigungen durch cytoplasmatische RNA bei der Chromoplastenisolation zurückzuführen. Andererseits wäre denkbar, daß artspezifische Unterschiede oder der unterschiedliche Differenzierungszustand der *Daucus*-Chromoplasten den geringen RNA Gehalt erklären.

Bei Verwendung langer, hochkonzentrierter Gele (7,5 - 15% Monomer-Konzentration) läßt sich die 5 S RNA weiter auftrennen. Im Falle der chloroplastenhaltigen Primärblätter der Gerste spaltet sich die 5 S RNA in zwei Banden auf (Abb. 66). In Chromo-, Leuco- und Amyloplasten-haltigen Geweben ist nur eine 5 S Bande vorhanden, die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit der ersten 5 S Fraktion aus chloroplastenhaltigen Geweben identisch ist (Abb. 66).

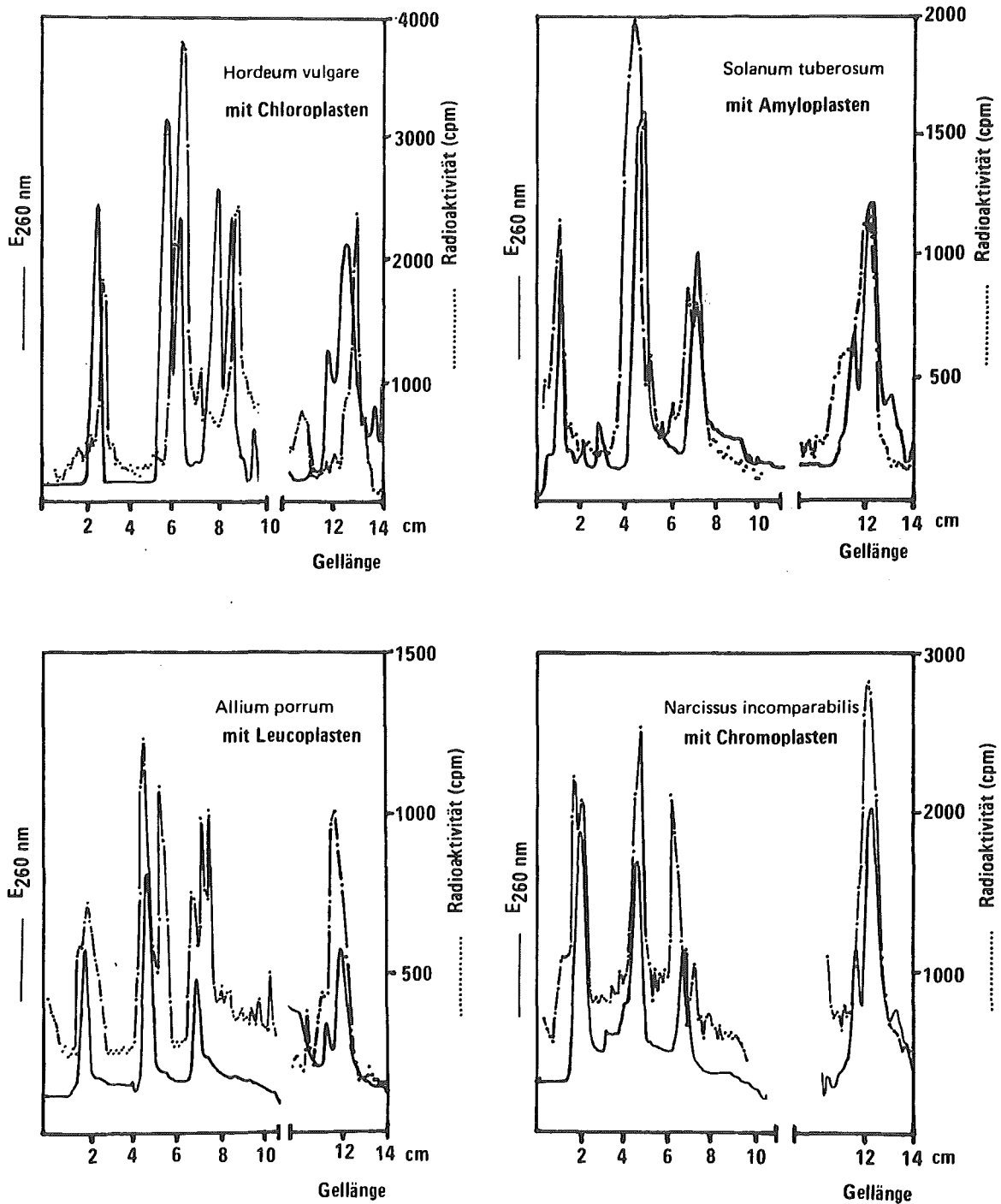


Abb. 65: Trennung <sup>32</sup>P-markierter Nucleinsäuren aus Pflanzen mit verschiedenen Plastidentypen in zusammengesetzten Polyacrylamidgelen

Aufgrund des Vergleiches unterschiedlicher Plastidentypen liegt es nahe anzunehmen, daß im Falle grüner Gerstenblätter die obere 5 S Bande mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität RNA cytoplasmatischer Herkunft ist, während die zweite 5 S RNA Bande mit erhöhter elektrophoretischer Beweglichkeit aus den Chloroplasten stammt. Das Vorkommen dieser plastidären 5 S Fraktion ist jeweils mit der Anwesenheit der entsprechenden hochmolekularen rRNA (23 S und 16 S) korreliert.

Der prozentuale Anteil der einzelnen, diselektrophoretisch getrennten 5 S RNA Banden wurde durch Integration der Peak-Flächen in den Densitographien ermittelt. Die cytoplasmatische 5 S RNA macht im Falle von *Hordeum* 18,2% der gesamten niedermolekularen RNA (entsprechend 3% der gesamten Blattnucleinsäuren) aus. Die den Chloroplasten zuzuordnende 5 S Bande besitzt 11,2% der niedermolekularen RNA (entsprechend 2% der Gesamtnucleinsäuren).

Es konnte gezeigt werden, daß die im Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge einheitliche 5 S RNA in langen Polyacrylamidgelen mit hoher Monomerkonzentration in zwei Banden aufgetrennt werden kann. Durch Vergleich chloroplastenhaltiger Blätter von *Allium* (unveröffentlicht) und *Hordeum* mit chloroplastenfreien, basalen Blattbasen von *Allium* ließ sich ermitteln, daß die 5 S RNA Bande mit der größeren elektrophoretischen Beweglichkeit aus den Chloroplasten stammt. Die 5 S RNA des Cytoplasmas hat geringere elektrophoretische Mobilität.

Diese - möglicherweise auf unterschiedlichen Ladungsverhältnissen beruhenden - Trenneigenschaften der 5 S RNAs in den analytischen Gelen lassen sich auch zur präparativen Trennung verwenden. Mit Hilfe der präparativen Diselektrophorese ließen sich beide 5 S Fraktionen reproduzierbar trennen (Abb. 67), so daß eine weitere Analyse der beiden 5 S RNA Fraktionen möglich ist.

Der Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit von 5 S RNA aus verschiedenen Plastidentypen und aus Plastiden unterschiedlichen Differenzierungsgrades (Proplastiden, Etio- und Chloroplasten) mit der entsprechenden niedermolekularen cytoplasma-

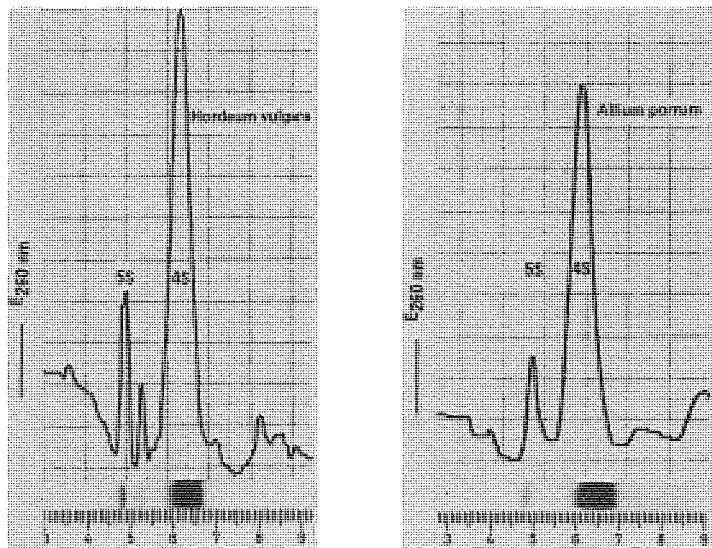


Abb. 66: Elektropherogramme niedermolekularer RNA aus chloroplastenhaltigen (*H. vulgare*) und leucoplastenhaltigen Blättern (*A. porrum*)

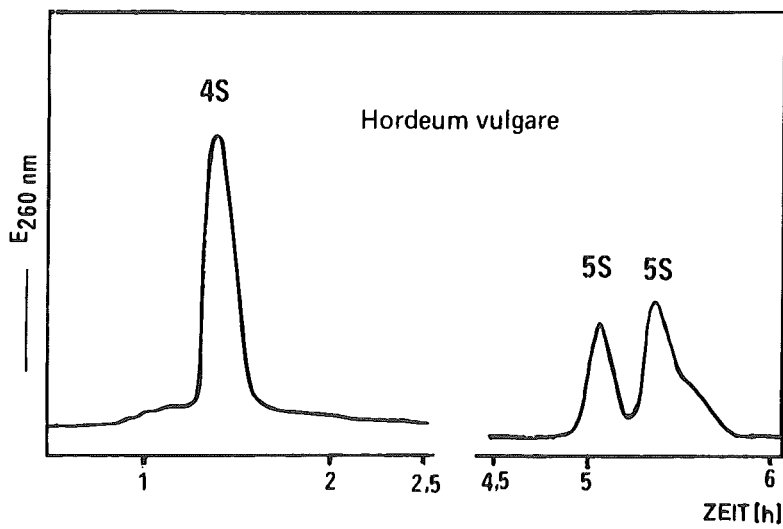


Abb. 67: Präparative Trennung niedermolekularer RNA aus *H. vulgare* (7 Tage alte Primärblätter) mit der in Abb. 63 angegebenen Trennapparatur

tischen 5 S RNA bestätigt im wesentlichen die Untersuchungen von DYER und LEECH (1968). Danach besitzt die plastidäre 5 S RNA größere Mobilität als die cytoplasmatische 5 S RNA bei ihrer Trennung mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu den neueren Ergebnissen von PAYNE und DYER (1971, 1972) über 5 S RNA aus *Vicia faba* und aus Cyanophyceen. Danach wandert die 5 S RNA aus Chloroplastenribosomen in den Disc-Elektropherogrammen langsamer als die 5 S RNA der Cytoplasmari-bosomen. Bezogen auf die *E. coli* 5 S RNA (120 Nucleotide, M.W. 38 750, BROWNLEE et al. 1967) und pflanzliche 4 S RNA (78 Nucleotide, M.W. 25 000) berechneten die Autoren entsprechend der inversen Beziehung der elektrophoretischen Mobilität und dem Logarithmus des Molekulargewichtes für cytoplasmatische 5 S RNA ein Molekulargewicht von 37 900 (118 Nucleotide) und für 5 S RNA aus Chloroplasten ein Molekulargewicht von 39 500 (122 Nucleotide).

Coelektrophoresen von 5 S RNAs unterschiedlicher taxonomischer und intrazellulärer Herkunft ergaben für cytoplasmatische 5 S RNA höherer Pflanzen und für 5 S RNA einer blaugrünen Alge (*Nostoc*) in 12,5%igen Polyacrylamidgelen identische Wanderungsgeschwindigkeiten. Beide niedermolekularen rRNAs hatten höhere elektrophoretische Beweglichkeit als die 5 S RNA aus *E. coli*; langsamste 5 S RNA-Fraktion war die der Chloroplasten (PAYNE und DYER 1972).

Dieses Ergebnis von PAYNE entspricht insofern nicht den Erwartungen, als prokaryontische rRNA höhere elektrophoretische Beweglichkeit besitzen sollte als eukaryontische rRNA. Darüber hinaus widerspricht es unseren Befunden nach Trennung niedermolekularer rRNA in 15%igen Polyacrylamidgelen. Danach hat die plastidäre 5 S RNA größere elektrophoretische Beweglichkeit als die cytoplasmatische 5 S RNA. Beide Fraktionen liegen jedoch noch im Bereich von 5 S RNA aus *E. coli*, die in dem von uns verwendeten Gelsystem in zwei Fraktionen bandiert.

XI. Ribosomale RNA-Synthese und lichtinduzierte Chloroplasten-  
entwicklung aus Etioplasten. Die Wirkung spezifischer  
Inhibitoren auf die Membranbildung

Die Entwicklung der Etioplasten zu Chloroplasten in Angiospermen ist die Summe lichtabhängiger und lichtunabhängiger Synthesen. Im Falle der lichtabhängigen Stimulierung von Enzymaktivitäten oder von Enzymsynthesen werden diese durch membrangebundene, chromophore Systeme induziert und reguliert. Die Komplexität photoregulierter Synthesen während der Chloroplastengenese wird durch folgende Beispiele verdeutlicht:

- Photoregulation von Enzymen des reduktiven Pentosephosphatweges
- Photokonversion von Protochlorophyllid
- Photoregulation von Nucleinsäuresynthesen
- Photostimulation von Lipidsynthesen (vgl. Kap. VII).

Einige Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges werden durch das Phytochromsystem photoreguliert: Rotlicht (661 nm) erhöht die Aktivität von Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase, Transketolase, Ribose-5-phosphatisomerase in *Secale* um den Faktor 1,6 - 2,6 (FEIERABEND und PIRSON 1966). Dunkelrot (731 nm) reduziert, die Lichtfolge Hellrot-Dunkelrot reversibilisiert und Blaulicht (435 nm) zeigt keinen oder nur wenig Einfluß auf die Enzymaktivitäten. In *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris* ist die Phytochrom-regulierte Steigerung der Enzymaktivitäten des Calvin-Zyklus wesentlich größer: Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase (91x), NADP-Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (35x), Fructose-1,6-diphosphatase (15x), NAD-Triosephosphat-Dehydrogenase (5x), das plastidenspezifische Fraction I-Protein (11x), Phosphoribulokinase (24x, maximale Werte bezogen auf Frischgewichtseinheiten oder Blattzahl, GRAHAM et al. 1968, BRADBEER et al. 1972, MARGULIES 1965, vgl. SCHOPFER 1972).

Rotlicht hat Einfluß auf die Protochlorophyllidreduktion (s.u.) und - im Gegensatz zu Blaulicht - keine Einfluß auf den weiteren Verlauf der Chlorophyllsynthese (FEIERABEND und PIRSON, 1966).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, daß zwei getrennte Photorezeptorsysteme die Synthese der Enzyme (z.B. Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase, BRADBEEER et al. 1972) des reduktiven Pentosephosphatweges und deren Aktivität sowie die Chlorophyllsynthese induzieren und regulieren. Primärer Photoregulator für einen Teil der löslichen Stromaproteine scheint das Phytochromsystem zu sein, während als Photoakzeptor für die Chlorophyllsynthese das Protochlorophyllid fungiert.

Die Chlorophyllsynthese während der Photomorphogenese von Etioplasten zu Chloroplasten läßt sich in ihrem zeitlichen Verlauf in drei Abschnitte gliedern. Licht induziert die Reduktion des in Etioplasten akkumulierten Protochlorophyllids zu Chlorophyllid a. Darauf folgt eine lag-Phase, in der keine sichtbaren Mengen von Chlorophyll gebildet werden und anschließend eine log-Phase, in der die Synthese von Chlorophyll a und b bis zum Erreichen eines stationären Zustandes abläuft (KOSKI 1950, VIRGIN 1955, 1957, GASSMAN und BOGORAD 1967).

Die Dauer der Photokonversion des Protochlorophyllids zu Chlorophyllid a - eine nichtenzymatische Reaktion - bei der zwei Protonen stereospezifisch an den Porphyrinring angelagert werden (vgl. Kap. I), liegt - je nach Belichtungsintensität - im Sekundenbereich und kann bis zu einigen Minuten dauern (SMITH und BENITEZ 1954). Die Phytylierung des Chlorophyllids zu Chlorophyll a ist lichtunabhängig und dauert etwa 30 Minuten (WOLFF und PRICE 1957).

Die Dauer der lag-Phase beträgt bei *Hordeum vulgare* 2 - 3 Stunden. Sie unterliegt einer Phytochrom-regulierten Kontrolle (WITHROW et al. 1956, PRICE und KLEIN 1961, VIRGIN 1961). Die lag-Phase kann durch Rotlichtgaben (660 nm) und einer zusätzlichen Dunkelphase (5 - 15 Stunden) aufgehoben werden (SISLER und KLEIN 1963). Gleiches gilt auch für in vivo-applizierte 5-Aminolaevulinsäure (ALA), einer Porphyrinvorstufe (GRANICK 1959), und relativ hohe Luftfeuchtigkeit (80 - 85%, ALBERTE et al. 1973). Die Syntheserate von Chlorophyll a und die Protochlorophyllidregeneration in der lag-Phase ist von der Menge verfügbarer ALA abhängig. GRANICK (1959) nimmt an, daß in etiolierten *Hordeum*-Blättern die

Enzyme, die ALA in Protochlorophyllid umwandeln, nicht die limitierenden Faktoren sind, weil exogen applizierte ALA den Protochlorophyllidgehalt erhöht, sondern daß die Chlorophyllsynthese durch die Rate der ALA-Synthetase - ein Enzym mit schnellem 'turn-over' - reguliert wird. Möglicherweise haben die an der ALA-Synthese beteiligten Enzyme (5-ALA-Synthetase und Succinat-Thiokinase) kurze Halbwertszeiten (10', SÜZER und SAUER 1971; 90', NADLER und GRANICK 1970) und bilden somit den limitierenden Faktor bei der Chlorophyllsynthese.

Das Intermediärprodukt ALA wird durch Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin durch das Enzym 5-Aminolaevulinsäure-Synthetase in Bakterien und Mitochondrien von Leberzellen synthetisiert und in das Cytosol exportiert (GRANICK 1967). Ein Nachweis dieses Enzyms in Pflanzen ist bisher nicht gelungen. Darüber hinaus wird die ALA-Synthese aus Succinyl-CoA und Glycin durch die Succinyl-CoA-Synthetase für möglich gehalten. KIRK und PYLIOTIS (1972) weisen Succinyl-CoA-Synthetase in isolierten Mitochondrien und im Mitochondrien-haltigen Überstand von Weizen und Pisum nach. Als Arbeitshypothese schlagen sie vor, daß Succinyl-CoA-Synthetase in Mitochondrien ALA synthetisiert. ALA soll dann - analog den Verhältnissen in Leberzellen - in das Cytoplasma abgegeben und von den Plastiden aufgenommen werden. Das nächste Enzym, das die aus dem Cytoplasma aufgenommene ALA verwendet, ALA-Dehydratase, ist in den Chloroplasten lokalisiert (CAVELL und KAHN 1964, NANDI und WAYGOOD 1967). Demnach haben Chloroplasten nicht die volle Autonomie über die Regulation und Synthese der Chlorophylle. Bei den oben erwähnten Teilabschnitten sind sie auf die Mitochondrien angewiesen.

Untersuchungen von GASSMAN und GOGORAD (1967) mit Inhibitoren der Nucleinsäuresynthese (Actinomycin D) und der Proteinsynthese (Chloramphenicol), die beide die Chlorophyllsynthese hemmen, führten zu der Hypothese, daß eine kurzlebige mRNA, deren Synthese lichtabhängig ist, kontinuierlich transkribiert wird. Sie ist für die Synthese der an der ALA-Produktion beteiligten Enzyme zuständig. NADLER und GRANICK (1970) schlagen eine Arbeitshypothese für die Regulation der Chlorophyllsynthesen vor, die eine Phytochrom-regulierte Kontrolle auf der Ebene der Trans-

lation vorsieht. Ihr Konzept setzt inaktive, maskierte, im Etiollement gebildete mRNAs voraus, die in der lag-Phase aktiviert werden und für die Synthese der ALA-Synthetase zuständig sind.

Unklar ist, inwieweit die Wirkung des Phytochroms bei der Chloroplastengenese selektiv die Membranpermeabilität kontrolliert und damit ihren Einfluß etwa über die Regulation des Substratangebotes geltend macht (HENDRICKS und BORTHWICK 1967) und/oder durch selektive Genaktivierung zur de novo-Synthese von Enzymen führt (MOHR 1966, 1970; SCHOPFER und HOCK 1971). Diese zweite Theorie impliziert die Transcription neuer mRNAs infolge differentieller Genaktivierung. Es ist denkbar, daß die Phytochrom-Wirkung sich in einer erhöhten Aktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerase ausdrückt. Tatsächlich induziert die Belichtung etiolierter Pisum-Keimlinge mit Rotlicht eine Steigerung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen des Kernes und der Etioplasten (BOTTOMLEY 1970). Die Reaktion ist durch zusätzliche Dunkelrotgaben nur im Falle der nucleären RNA-Polymerase reversibel. Die unterschiedliche Reaktion kann Folge einer unterschiedlichen Empfindlichkeit des Phytochroms in beiden Organellen sein oder auf verschiedenen Photoakzeptorsystemen beruhen (TURNER und VINCE 1969).

Aufgrund der gelelektrophoretischen Untersuchung der 23 S und 16 S RNA aus gleichalten Etioplasten und Chloroplasten von *H. vulgare* ergab sich kein Anhaltspunkt für den Einfluß des Lichtes auf die rRNA-Synthese (Kap. X). Das Ergebnis bestätigt die Vorstellung von BOARDMAN (1966), daß die Genese der Chloroplasten aus Etioplasten nicht mit einer zusätzlichen signifikanten Zunahme von 70 S Ribosomen verbunden ist. Das Verhältnis von 70 S : 80 S Ribosomen beträgt 1 : 2,86 in etiolierten Blättern und 1 : 2,14 in grünen Blättern. Licht ist für die rRNA-Synthese in *Hordeum* kein obligater Faktor; möglicherweise kann es aber in Pflanzen, deren Proteinsynthese stark durch das Phytochrom stimuliert wird (z.B. *Pisum sativum*), eine zusätzliche rRNA-Synthese bewirken (SCOTT et al. 1971).

Actinomycin D - ein Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase -

hemmt die Chlorophyllsynthese nach Belichtung etiolierter Phaseolus-Blätter (BOGORAD und JACOBSON 1964); es ist anzunehmen, daß Licht die Bildung von mRNAs oder die Aktivierung (im Etiollement) präformierter, maskierter mRNAs (vgl. SPIRIN 1963) bewirkt. Dafür sprechen erhöhte RNA-Polymerase Aktivitäten in Plastiden (BOGORAD 1967) oder in Plastiden und Kernen (BOTTOMLEY 1970) infolge von Belichtung.

Anlaß für die folgende, vergleichende Untersuchung der Nucleinsäuresynthesen, des Chlorophyllgehaltes und der Plastidenultrastruktur während der Chloroplastengenese aus Etioplasten war die Frage, ob und inwieweit die Verwendung spezifischer Inhibitoren zusätzliche Information über Transcriptions- und Translationsaktivitäten im Cytosol und den Plastiden bringt.

Folgende Inhibitoren des Nucleinsäurestoffwechsels und der Proteinsynthese wurden verwendet: Actinomycin D, Mitomycin c, Nalidixinsäure, Rifampin, Cycloheximid (Actidion) und Chloramphenicol.

Actinomycin D und Mitomycin c hemmen die Nucleinsäuresynthesen auf der Ebene der Transcription. Actinomycin D schaltet primär die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus, indem Inhibitor und DNA eine Komplexbindung eingehen (REICH und GOLDBERG 1966). Mitomycin c hemmt die DNA-abhängige RNA-Synthese durch kovalente Bindung des Hemmstoffs mit beiden DNA-Doppelsträngen ("cross-linking", SZYBALSKI und IYER 1964, KODAMA 1967). Nalidixinsäure verhindert die DNA-Replication in Bakterien (COOK et al. 1966, DIETZ et al. 1966).

Rifampin ist - im Gegensatz zu Actinomycin D - ein selektiver Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase. RNA-Polymerase von Bakterien ist sensitiv gegenüber Rifamycinen (HARTMANN et al. 1967), während die RNA-Polymerase aus Eukaryonten-Kernen unempfindlich gegenüber Rifamycinen ist (WEHRLI et al. 1968).

Chloramphenicol blockiert spezifisch die bakteriellen Proteinsynthesen durch Bindung an die 50 S Untereinheit des 70 S Monosoms (VASQUEZ 1966). In Eukaryonten mit 80 S Ribosomen ist es innerhalb physiologisch vertretbarer Grenzen unwirksam.

Cycloheximid (Actidion) hemmt die Proteinsynthese von Eukaryonten mit 80 S Ribosomen. Möglicherweise unterbindet es die Proteinsynthese auf der Stufe der Peptidbindung oder deren Translocation am 80 S Ribosom (SIEGEL und SISLER 1965). Cycloheximid ist gegenüber 70 S-haltigen Prokaryonten unwirksam.

Die selektive Wirkung von Rifampin, Chloramphenicol und Cycloheximid war für die folgende Untersuchung insofern von Interesse, als die Steuerung der Chloroplastengese in höheren Pflanzen der Kontrolle des Kernes und der Plastiden unterliegt und Transcriptions- und Translationsaktivitäten im Cytosol und im Plastidenstroma zu erwarten sind.

Phenolextrahierte Nucleinsäuren aus 7 Tage alten, etiolierten Primärblättern aus *H. vulgare*, die in der Dunkelphase mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat inkubiert wurden (vgl. Kap. II) zeigen nach chromatographischer Trennung mit der MAK-Säule einen radioaktiven Einbau in die niedermolekulare - hier als 's'RNA bezeichnete - RNA-Fraktion, in die DNA und die hochmolekulare rRNA. Bei der von uns verwendeten Steilheit des NaCl-Gradienten (Abb. 68) wird die 's'-RNA als eine Fraktion von der Säule eluiert. Sie ist, wie die nachträgliche Trennung von 15%igen Polyacrylamidgelen ergab, aus drei Komponenten zusammengesetzt: tRNA und zwei niedermolekulare 5 S RNAs der 70 bzw. 80 S Ribosomen. Die hochmolekulare RNA wird als zweigipflige Fraktion von der Säule gewaschen. Sie besteht nach gelelektrophoretischer Trennung in 2,4%igen Polyacrylamidgelen aus 25 S, 23 S, 18 S und 16 S RNA (Kap. IX).

Ein Vergleich der Syntheseraten in den einzelnen Fraktionen - gemessen als  $^{32}\text{P}$ -Einbau pro  $\mu\text{g}$  DNA oder RNA - aus ergrünenden Blättern (Belichtungsdauer 4 und 12 Stunden) gegenüber der etiolierten Kontrolle ergibt in den Einzelfraktionen eine Steigerung um den Faktor 1 bis 4. Die Nucleinsäuresynthese der 's'RNA, DNA und rRNA ist zum Ende der lag-Phase der Chlorophyllsynthese größer als während der Phase intensiver Chlorophyllsynthese (nach 12 Stunden Belichtung, Abb. 68, Tab. XI).

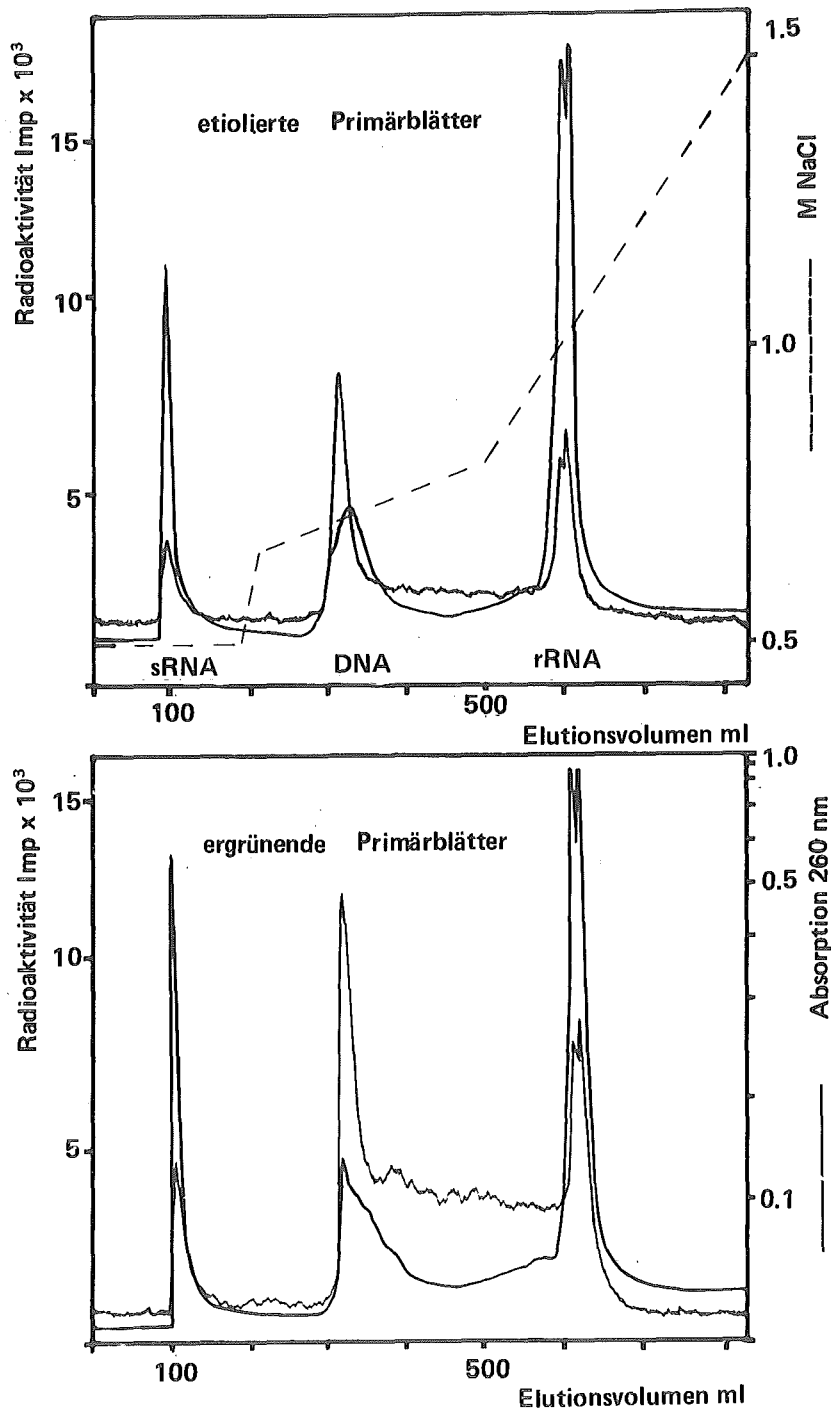


Abb. 68: Trennung von <sup>32</sup>P-markierten Nucleinsäuren mit der MAK-Säulenchromatographie. Der radioaktive Einbau und die optische Dichte wurden simultan gemessen (Packard Durchflußratemeter und Uvicord II). Die radioaktiven Nucleinsäuren wurden aus 7 Tage alten Primärblättern von *H. vulgare* nach Anzucht im Dunkeln (oben) bzw. nach Belichtung (4 Stunden, unten) mit Phenol extrahiert.

Simultane Messung der Radioaktivität und der optischen Dichte (260 nm) ergibt in den Elutionsprofilen der Nucleinsäuren aus ergrünenden Blättern im Bereich zwischen der DNA und der rRNA einen leichten Anstieg im Einbau der radioaktiven Vorstufe (Abb. 68). Die Frage, ob und inwieweit es sich um hochmolekulare RNA Vorstufen (de KLOET 1965) oder um denaturierte DNA handelt, muß offen bleiben, weil eine weitere Charakterisierung dieser Zwischenfraktion mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese noch aussteht.

Um die relativ unspezifischen Ergebnisse von MAK-getrennten Gesamtnucleinsäuren aus Blättern einzuengen, wurden Etioplasten bzw. ergrünende Plastiden im Ficoll-Dextran-Saccharose-Gradienten getrennt (vgl. Kap. VIII). Die Synthese der niedermolekularen und hochmolekularen rRNA aus Etioplasten und ergrünenden Plastiden (aus Blättern, die 12 Stunden belichtet wurden) ist gleich (Tab. XII). Licht hat keinen Einfluß auf die rRNA-Synthese in den Plastiden dieses Differenzierungsgrades.

Analog zu den Verhältnissen in ergrünenden Blättern (Abb. 68) ist der Bereich zwischen der DNA und der hochmolekularen rRNA stärker markiert (Abb. 69). Damit dürfte die erhöhte  $^{32}\text{P}$ -Einbau-rate in den DNA-rRNA Zwischenbereich ein Ausdruck plastiden-eigener Nucleinsäuresynthesen oder ein unspezifischer, durch Denaturierung bedingter Effekt sein.

Die Ultrastruktur von Etioplasten von *H. vulgare* in vivo und nach ihrer Isolierung zeigt den für Etioplasten typischen Feinbau: ein parakristallin angeordnetes inneres Membransystem (Prolamellarkörper) und in Kugelhaufen angeordnete Plastoglobuli an der Peripherie der Prolamellarkörper (Abb. 70). Nach zwölfstündiger Belichtung sind die in Form des Prolamellarkörpers präexistenten Membranen restlos in Stromathylakoide umgewandelt. Zusätzlich werden während der log-Phase der Chlorophyllsynthese Granathylakoide neu gebildet (Abb. 71). Die Anordnung der Plastoglobuli in ergrünenden Plastiden ist überwiegend solitär: durch die Ausbildung der Stroma- und Granathylakoide in der log-Phase wird die ursprüngliche, kugelhaufenartige Plastoglobulianordnung aufgelockert (vgl. Kap. VII.1). Die Ribosomen der

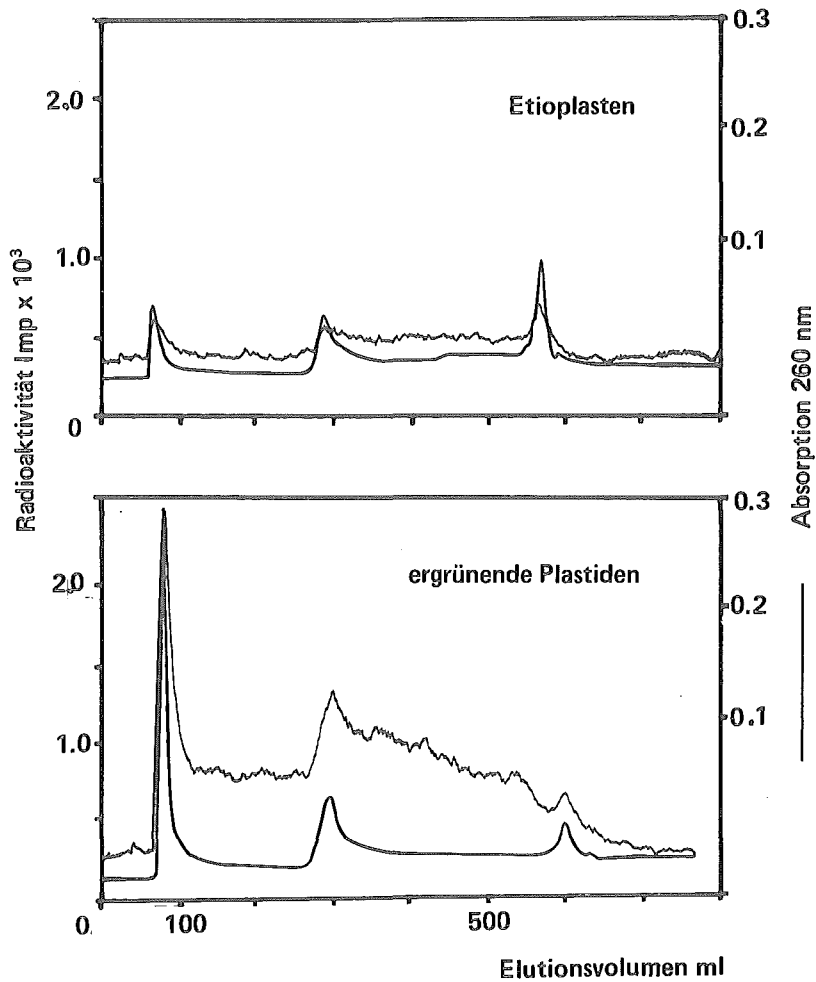


Abb. 69: Trennung von  $^{32}\text{P}$ -markierten Nucleinsäuren aus isolierten Plastiden (Etioplasten; ergrünende Plastiden nach vierstündiger Belichtung). Extraktionsbedingungen: Phenolmethode nach KIRBY (1967); Trennung: MAK-Säule; simultane Messung der optischen Dichte (Uvicord II, Fa. LKB) und des radioaktiven Einbaus (Durchflußrate-meter, Fa. Packard)

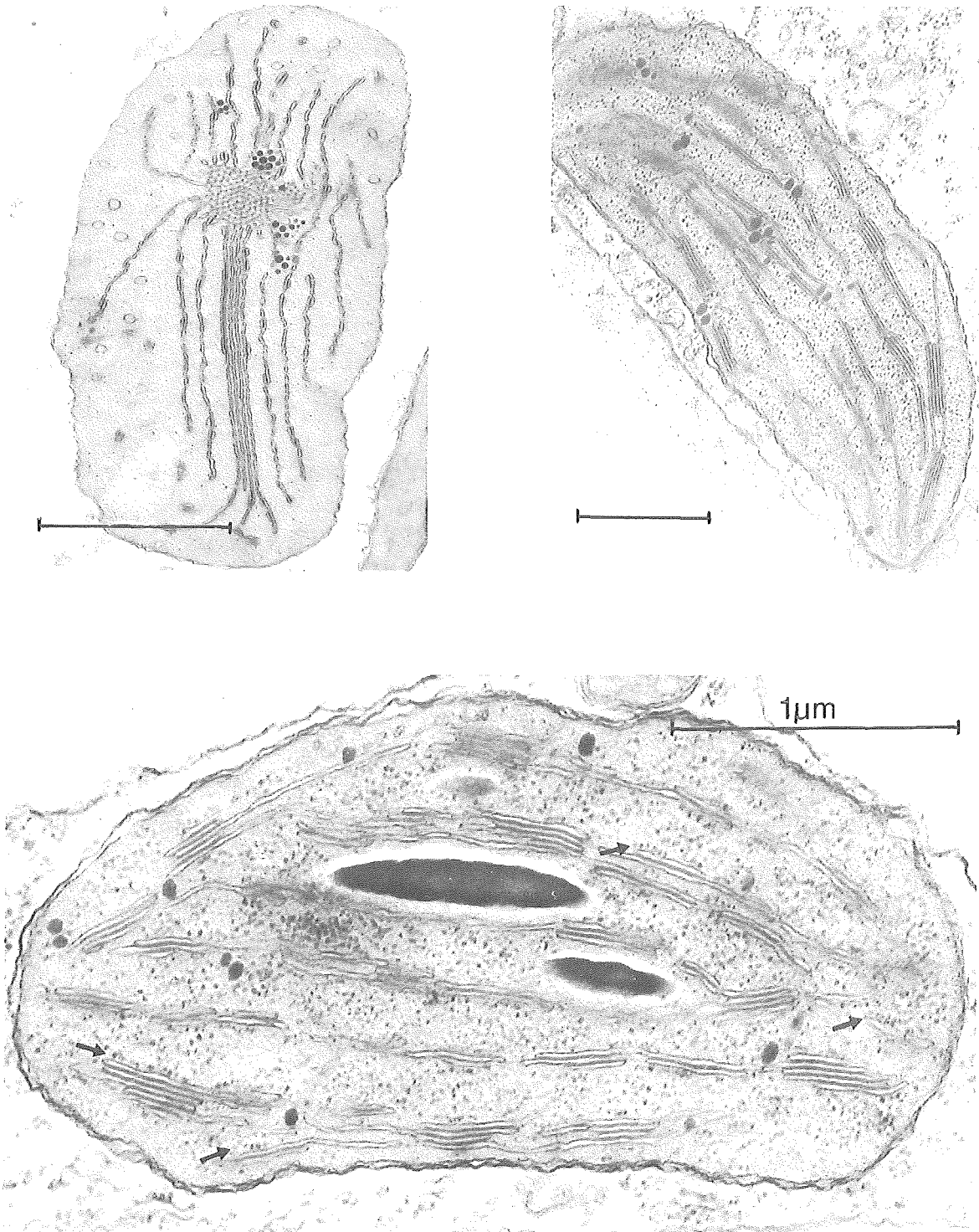


Abb. 70, 71: Wirkung von Licht auf die Membranstruktur von Plastiden. Etioplast mit parakristallinem Prolamellar-körper (links). Chloroplast (12 Stunden Belichtung, 5 kLux) aus Primärblättern von *H. vulgare* (rechts) mit Stroma- und Granathylakoiden

Abb. 73: Polysomen (?) an der Thylakoidaußenfläche von ergrünenden Plastiden (6 Stunden Belichtung, 5 kLux)

Etioplasten und der ergrünenden Plastiden aus 12 Stunden belichteten Blättern sind monosomal angeordnet. Zu Beginn der log-Phase lassen sich auf der Außenseite der Stromathylakoide Ribosomen in linearer Anordnung nachweisen. Sie haben möglicherweise Polysomen-Charakter (Abb. 73).

Der Einbau von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in die 's'RNAs und die hochmolekularen RNAs ist in Gegenwart von Chloramphenicol stark gehemmt (Abb. 74, Tab. XIII). Chloramphenicol hat keinen Einfluß auf die DNA-Synthese. Die Chlorophyllsynthese ist nach Vorinkubation etiolierter Blätter mit dieser Blocksubstanz in Dunkelheit und nachfolgender Belichtung um über 90% gehemmt (Tab. XIV). In den Plastiden der Primärblätter von *H. vulgare* läßt sich in Gegenwart von Chloramphenicol nach Belichtung (12 Stunden) keine Granathylakoidbildung nachweisen. Die Feinstruktur Chloramphenicol-behandelter Plastiden zeigt ausschließlich Stromathylakoide. Die Plastiden vermögen zwar unter Lichteinfluß während der lag-Phase den Prolamellarkörper in Stromathylakoide umzuwandeln, sind aber unfähig zur Granathylakoidausbildung während der log-Phase der Chlorophyllsynthese (Abb. 76).

Zur Interpretation der Wirkung von Chloramphenicol auf die Chlorophyllsynthese von *Euglena gracilis* (POGO und POGO 1965, KIRK 1968) und auf die lichtabhängige Ergrünung etiolierter *Phaseolus vulgaris*-Blätter in vivo (MARGULIES 1962, 1964; GASSMAN und BOGORAD 1965) existieren mehrere Hypothesen. Danach kann die Hemmung der Chlorophyllsynthese einmal auf der reduzierten Bildung von ALA beruhen. Die an der Bildung von ALA beteiligten Enzyme haben ein schnelles 'turn-over' und werden in Gegenwart von Chloramphenicol nicht neu gebildet (GASSMAN und BOGORAD 1965). Nach Auffassung von KIRK und Mitarbeitern (KIRK und ALLEN 1965, KIRK und TILNEY-BASSETT 1967, KIRK 1968) unterdrücken Inhibitoren der Proteinsynthese die Bildung von 'Struktur'proteinen der Thylakoide oder des Proteinanteils des Protochlorophyllid-Holochroms. Die Untersuchung von MACHOLD (1970) stützt die Annahme der mittelbaren Wirkung von Chloramphenicol auf die Membranproteine. In *Vicia faba* wird durch diesen Proteinsynthese-Inhibitor die Bildung von zwei Chlorophyll-Protein-

Tab. XI

Nucleinsäuresynthese und Chloroplastengenes<sup>+</sup> in Blättern von *H. vulgare*

Belichtungsdauer (Stunden)	's'RNA	DNA	rRNA <sup>++</sup>
0	100,2	59,0	40,2
4	223,7	164,0	167,8
12	200,8	58,7	70,1

<sup>+</sup> Markierung: <sup>32</sup>P (15  $\mu$ Ci/ml, 2 Stunden)  
Trennung : MAK-Chromatographie

<sup>++</sup> Ipm/ $\mu$ g NS

Tab. XII

Nucleinsäuresynthese in isolierten Plastiden aus belichteten Blättern von *H. vulgare*

Belichtungsdauer (Stunden)	's'RNA	DNA	rRNA <sup>+</sup>
0	237,0	201,4	203,5
12	240,5	191,87	220,4

<sup>+</sup> Ipm/ $\mu$ g NS

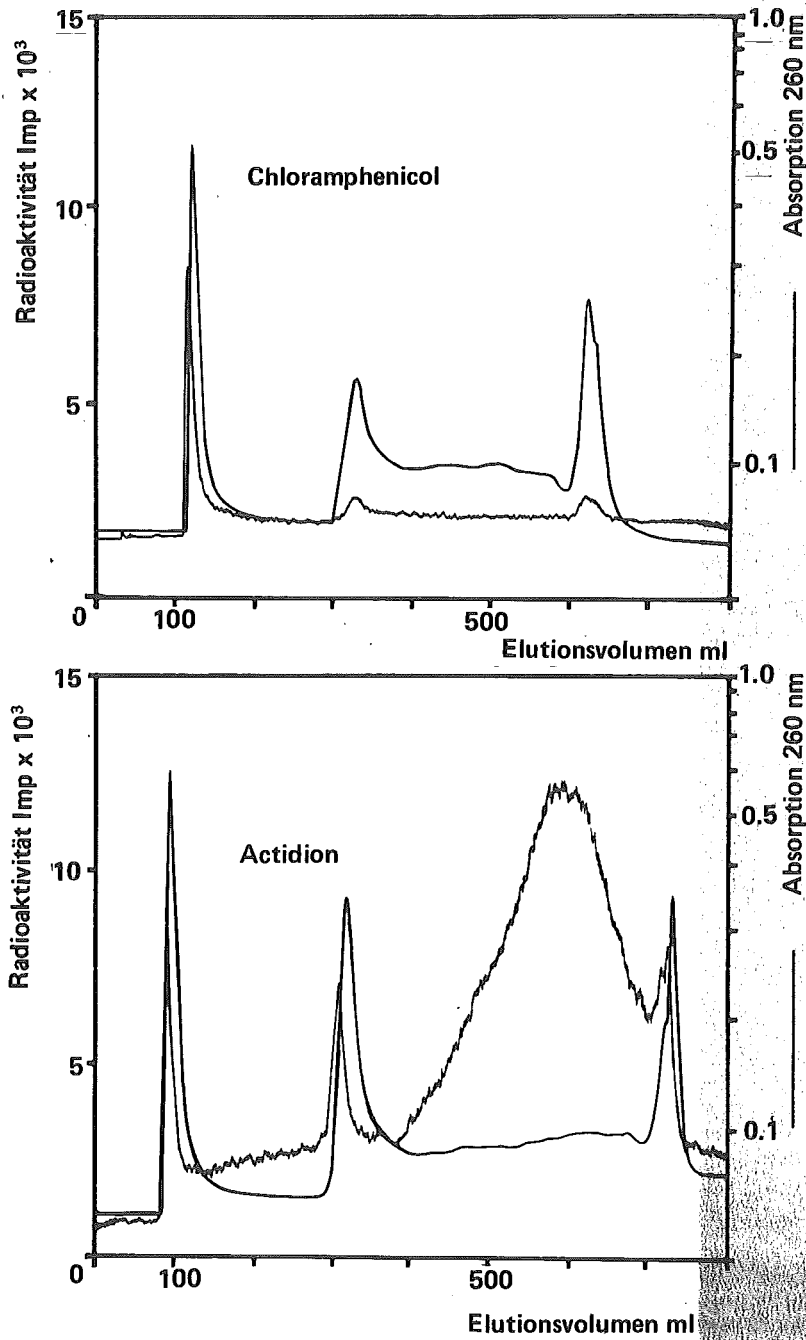


Abb. 74, 75: Trennung von <sup>32</sup>P-markierten Nucleinsäuren mit MAK-Säulenchromatographie. Die Blätter wurden mit den Inhibitoren (50 µg/ml) 8 Stunden im Dunkeln vorinkubiert, danach wurden sie belichtet (12 Stunden). Die Markierungsdauer mit <sup>32</sup>P-Orthophosphat (20 µCi/ml) betrug 4 Stunden vor Beendigung der Belichtung

komplexen der Thylakoidmembran unterdrückt. Dabei ist offen, ob der Ausfall dieser Banden der gelelektrophoretisch getrennten 'Struktur'proteine die Folge der Inhibierung der Synthese des Proteinanteils oder/und die Folge der Chlorophyllsynthese-Hemmung ist.

Ursache der Hemmung von Chlorophyllsynthese und Granathylakoidausbildung durch Chloramphenicol kann in Zusammenhang mit der spezifischen Empfindlichkeit der 70 S Ribosomen gegenüber diesem Inhibitor gebracht werden (vgl. SMILLIE und SCOTT 1969). Chloramphenicol hemmt den Aminosäureeinbau in isolierte Chloroplasten (BAMJI und JAGENDORFF 1966, ELLIS 1969) und in isolierte Etioplasten (REGGER et al. 1972). Analog sollte für den Ausfall der Granathylakoidbildung bzw. der Chlorophyllsynthese eine Blockierung der Proteinsynthese an den 70 S Ribosomen der Plastiden in Betracht kommen. Cycloheximid, ein Inhibitor von Proteinsynthesen in Eukaryonten-Zellen mit 80 S Ribosomen (ENNIS und LUBIN 1964), hat keinen Einfluß auf den Einbau markierter Aminosäuren in Proteine isolierter Chloroplasten und Etioplasten (SPENCER 1965, ELLIS 1969, REGGER et al. 1972).

Die Untersuchungen von VASQUEZ (1964, 1966) an *E. coli* 70 S Ribosomen und von ANDERSON und SMILLIE (1966) an 70 S und 80 S Ribosomen (*Euglena gracilis*) zeigen, daß speziell durch die große Bindungskapazität von Chloramphenicol an die 50 S Unter-einheit der 70 S Ribosomen die Proteinsynthese gehemmt wird.

Die an *H. vulgare* gefundenen Ergebnisse über die Wirkung von Chloramphenicol auf den Nucleinsäuremetabolismus in Primärblättern ergänzen die Befunde von INGLE (1968). In Cotyledonen von *Raphanus sativus* hemmt Chloramphenicol die Synthese von plastidärer, hochmolekularer rRNA. In den Chloroplasten der Chrysophycee *Ochromonas danica* nimmt mit zunehmender Generationsfolge die Anzahl der 70 S Ribosomen pro Plastide ab (SMITH-JOHANNSEN und GIBBS 1972). Diesen Verdünnungseffekt kann man durch die Hemmung der rRNA-Synthese und/oder durch Blockierung der Synthesen von Ribosomenproteinen in den Plastiden mit Chloramphenicol bei kontinuierlicher Zell- und Plastidenteilung erklären.



Abb. 76: Wirkung von Chloramphenicol ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) auf die lichtabhängige Chloroplastenentwicklung. Es werden keine Granathylakoide gebildet (links)

Abb. 77: Cycloheximid ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) hemmt die Bildung der Granathylakoide (rechts)

Eine Ursache für das Unvermögen der Plastiden, in belichteten *H. vulgare*-Blättern bei Anwesenheit von Chloramphenicol Granathylakoide zu bilden, könnte darauf beruhen, daß ein oder mehrere Proteine, die für die Bildung der Granathylakoide erforderlich sind oder unmittelbar für das 'stacking' der Granathylakoide in Betracht kommen, nicht an den 70 S Ribosomen der Plastiden gebildet werden können. Dieser Ausfall der Membranproteinbildung könnte wiederum im Sinne der von KIRK vertretenen Ansicht (KIRK und ALLEN 1965, KIRK 1968) - zur Hemmung der Chlorophyllsynthese führen. Andererseits lassen die Befunde von MACHOLD (1970) über den Ausfall von Proteinchlorophyllkomplexen aus Thylakoiden nach Chloramphenicolapplikation auch eine Deutung in der umgekehrten Richtung zu. Das heißt, die Hemmung der Chlorophyllsynthese durch Chloramphenicol könnte die Synthese der 'Struktur'proteine oder deren Vorstufen unterdrücken.

Daß der Prolamellarkörper der Etioplasten in Gegenwart von Chloramphenicol in Primärthylakoide umgewandelt wird, bestätigt die Vorstellung von GUNNING und JAGOE (1967), wonach für die Bildung von Primärthylakoiden keine Neubildung von Membranen erforderlich ist. Demnach ist der Prozeß der Primärthylakoidbildung als eine Umwandlung bereits präexistenter Membranoberflächen des kristallinen Prolamellarkörpers aufzufassen. Falls die Metamorphose des Prolamellarkörpers in Primärthylakoide mit Proteinsynthesen verbunden ist, wäre denkbar - die selektive Wirkung des Chloramphenicols auf 70 S Ribosomen vorausgesetzt -, daß diese ausschließlich an den 80 S Ribosomen des Cytoplasmas stattfinden sollten. Die Verwendung von Cycloheximid, das selektiv auf die 80 S Ribosomen wirkt, wurde nachfolgend zur Lösung dieser Frage verwendet.

Auffälligstes Merkmal in den Elutionsprofilen MAK-chromatographierter Nucleinsäuren aus Cycloheximid-behandelten Blättern ist die stark erhöhte Einbaurate von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat im Bereich zwischen DNA und hochmolekularer rRNA (Abb 75). Die Synthese der gesamten niedermolekularen rRNAs ist um etwa 10% gehemmt. Die Syntheserate der hochmolekularen rRNA ist in Gegenwart von Cycloheximid nach Belichtung 7 Tage alter Primärblätter gegenüber den Kontrollen unverändert (Tab. XIII).

Tab. XIII

Inhibitoren und Nucleinsäuresynthese während der Chloroplastengenese<sup>+</sup>

	's'RNA	DNA	rRNA <sup>++</sup>
Kontrolle	200,8	58,7	71,0
Actidion	182,3	127,6	25,2
Chloramphenicol	122,7	53,5	32,7
Rifampin	150,0	126,0	41,8
Nalidixin	138,1	34,2	21,0
Actinomycin D	10,5	47,0	11,8

<sup>+</sup> 8 Stunden Vorinkubation der abgeschnittenen etiolierten Primärblätter mit Hemmstoffen (50  $\mu$ g/ml) im Dunkeln, danach 12 Stunden Belichtung (5 kLux) und 4 Stunden <sup>32</sup>P-Applikation (20  $\mu$  Ci Orthophosphat/ml), Phenolextraktion (KIRBY) und MAK-Säulenchromatographie

<sup>++</sup> Ipm/ $\mu$ g NS

Die Chlorophyllsynthese ist nach Cycloheximid-Behandlung um 97% gehemmt. In der Ultrastruktur von Plastiden in den mit Cycloheximid imbibierten Blättern sind keine Granathylakoide nachweisbar (Abb. 77). Die lichtinduzierte Umwandlung des Prolamellarkörpers in Primärthylakoide findet - wie im Falle der Präsenz von Chloramphenicol - auch in Gegenwart von Cycloheximid statt. Die Bildung von Primärthylakoiden aus dem Prolamellarkörper erscheint demnach mehr als ein passiver Prozeß, für den keine Proteinsynthesen in den Plastiden bzw. im Cytoplasma nötig sind.

Die selektive Wirkung von Chloramphenicol und Cycloheximid läßt - unter bestimmten Voraussetzungen - Schlüsse über die Umsetzung der genetischen Information im Cytosol bzw. im Plastidenstroma zu. Mit Hilfe dieser indirekten Methode schlossen SMILLIE und Mitarbeiter (1967, 1972), daß die lichtabhängigen Synthesen einiger Enzyme des Calvin-Zyklus (Ribulose-1,5-diphosphat Carboxylase, NADP-Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) und des plastidenspezifischen Fraction I-Proteins bei *Euglena gracilis* an den 70 S Ribosomen der Plastiden erfolgt. Es muß aber bezweifelt werden, daß alle Plastidenproteine auch an den 70 S Ribosomen gebildet werden. BRADBEER und Mitarbeiter (1972) nehmen nach Verwendung von D-threo-Chloramphenicol an, daß Ferredoxin, Phosphoglycolat-Phosphatase und NAD-abhängige Triosephosphatdehydrogenase der Plastiden an den Cytoplasmari-bosomen synthetisiert werden.

Cycloheximid hemmt die Chlorophyllsynthese in *Euglena gracilis* (KIRK und ALLEN 1965), *Phaseolus vulgaris* (GASSMAN und BOGORAD 1967) und *Hordeum vulgare* (NADLER und GRANICK 1972). Im Gegensatz zur Chlorophyllsynthese werden in Gegenwart von Cycloheximid weitere Proteinsynthesen in den Plastiden nicht beeinflusst. So ist der <sup>14</sup>C-Leucin Einbau in lösliche Peptide von isolierten Etioplasten oder Chloroplasten aus *Triticum aestivum* mit Cycloheximid nicht hemmbar (REGER et al. 1972). Beide Entwicklungsstadien der Plastiden aus den erwähnten Monocotyledonen zeigen in vitro gleiche Einbauraten und entsprechen damit der in vivo gewonnenen Vorstellung (vgl. Kap. X), daß Rotlicht in diesem

Fall nur eine relativ unwesentliche Steigerung (Faktor 1 - 3) einiger plastidenspezifischer Enzyme bedingt (FEIERABEND und PIRSON 1966).

In den Dicotyledonen *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris*, bei denen Rotlicht eine signifikante, Phytochrom-regulierte Synthese von rRNA und Proteinen induziert (SMITH et al. 1970, GRAHAM et al. 1970, BRADBEER et al. 1972), ist die Einbaurate von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in Plastidenproteine isolierter Etioplasten wesentlich geringer als in Chloroplasten (DRUMM und MARGULIES 1969). Die Gegenwart von Cycloheximid hat keinen Einfluß auf die Proteinsynthese in isolierten Etioplasten bzw. Chloroplasten aus *Vicia faba*.

Eine Zusammenfassung aller bisher vorliegenden Daten über die Wirkung von Cycloheximid auf die Chloroplastengenese zeigt, daß dieser Inhibitor die Chlorophyllsynthese hemmt, ohne dabei einen Einfluß auf die lichtinduzierten Synthesen löslicher Proteine in den Plastiden auszuüben. Beide Synthesen können demnach unabhängig voneinander verlaufen. Dies bedeutet - die selektive Wirkung von Chloramphenicol und Cycloheximid vorausgesetzt -, daß zumindest einige, für die Chlorophyllsynthese notwendige Proteine an den 80 S Ribosomen des Cytosols transkribiert werden müssen. Dieses Ergebnis stimmt mit genetischen Befunden überein, nach denen die Sequenz der Synthesen des Protoporphyrins IX bis einschließlich Chlorophyll a extraplastidär durch Kerngene gesteuert wird (KIRK 1972). So sind bisher sieben verschiedene Kerngene bekannt, die unterschiedliche Schritte der Chlorophyllsynthese kontrollieren.

Ob die durch Cycloheximid bewirkten Veränderungen der Nucleinsäuresynthese (vgl. Abb. 73) kausal in Zusammenhang mit der Hemmung der Chlorophyllsynthese gebracht werden kann, ist zumindest im Falle der hochmolekularen rRNA von *Hordeum* insofern fraglich, als bei der Ergrünung keine - verglichen mit der rRNA-Synthese in Etioplasten - signifikante Erhöhung der rRNA-Synthese stattfindet.

In Eukaryonten werden Synthese und Transformation ribosomaler

RNA-Vorstufen in Gegenwart von Cycloheximid verhindert. Die hohe Einbaurate von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in den DNA-rRNA Zwischenbereich kann auf die Existenz hochmolekularer rRNA-Vorstufen hinweisen, die als polydisperse Abbauprodukte - vergleichbar den Verhältnissen in *Saccharomyces* (de KLOET 1965) - zwischen der DNA und der rRNA eluiert werden.

Daß die Synthese plastidärer rRNA keine obligatorische Voraussetzung für die Chlorophyllsynthese ist, zeigen die Inhibitorversuche mit Rifampin. Die Wirkung der Rifamycine besteht in einer selektiven Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Prokaryonten (HARTMANN et al. 1967), während die RNA-Polymerase aus Eukaryonten unempfindlich gegenüber diesem Inhibitor sein soll (WEHRLI et al. 1968, MIZUNO et al. 1968).

Wenn abgeschnittene, 7 Tage alte, etiolierte Primärblätter von *Hordeum* im Dunkeln mit Rifampin vorinkubiert werden und - zur Zeit der log-Phase der Chlorophyllsynthese in den Kontrollen -  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat appliziert wird, dann ist der Einbau in die niedermolekulare RNAs um 25%, der Einbau in die gesamte hochmolekulare RNA (25 S, 23 S, 18 S und 16 S) um 45% gehemmt (Tab. XIII). Berücksichtigt man die Ergebnisse von BROWN und Mitarbeitern (1970), die eine ausschließliche Hemmung der plastidären 23 S und 16 S RNA in *Euglena* durch Rifampin nachweisen, dann ist die Hemmung der hochmolekularen RNA in Plastiden insofern noch wesentlich erhöht, als bei unseren Berechnungen die Imp./Minute auf die gesamte rRNA bezogen wurden.

Rifampin hat keinen Einfluß auf die Chlorophyllsynthese (Tab. XIV) und induziert keine auffallend sichtbaren Veränderungen in der Ultrastruktur ergrünender Plastiden. In Anwesenheit von Rifampin sind nach zwölfstündiger Belichtung neben vesikelartigen Thylakoiden Grana- und Stromathylakoide vorhanden (Abb. 78). Die lichtinduzierte Umwandlung des Prolamellarkörpers in Primärthylakoide wird durch Rifampin nicht beeinflusst.

In *Chlamydomonas reinhardi* hemmt Rifampin die Chloroplasten-DNA abhängige RNA-Polymerase (SURZYCKI 1969). Da die Cistrons für plastidäre, hochmolekulare RNA in der Chloroplasten DNA lokalisiert

Tab. XIV

Wirkung von Inhibitoren der Transcription und Translation auf die Thylakoidbildung am System Etioplast - Chloroplast<sup>+</sup>

	Chlorophyll	Stromathylakoide		Granathylakoide		
Kontrolle	100.0	+	+	+	+	+
Actinomycin D 50 $\mu$ g/ml	0.0	+	+	-	-	-
Mitomycin c 50 $\mu$ g/ml	94.6	+	+	+	+	(+)
Actidion 50 $\mu$ g/ml	3.3	+	+	-	-	-
Chloramphenicol 50 $\mu$ g/ml	6.5	+	+	(-)	-	-
Rifampin 50 $\mu$ g/ml	97.0	+	+	+	+	+

<sup>+</sup> 2 Stunden Vorinkubation der abgeschnittenen Primärblätter im Dunkeln, anschließend 12 Stunden Belichtung (5 kLux)

siert sein sollen (SCOTT und SMILLIE 1967), könnte die mit der Plastiden-DNA Replikation verbundene Teilung von Plastiden bei Anwesenheit von Rifampin zu einer Reduktion der Anzahl von Plastidenribosomen pro Plastide führen (GOODENOUGH 1971). Dieser Effekt wurde an ergrünenden Plastiden aus *Hordeum vulgare* nach Durchsicht der Mikrographien auf die Verteilungsdichte von 70 S Ribosomen im Plastidenstroma nicht beobachtet. Er ist auch insofern nicht zu erwarten, als weder Teilungsvorgänge von Plastiden noch signifikante Zunahmen von 23 S und 16 S RNA während der Ergrünungsprozesse nachgewiesen wurden.

Diese Versuche zeigen, daß in *H. vulgare* - ähnliches gilt auch für *Zea mays* (BOGORAD 1972) - die Chlorophyllsynthese nicht von der Synthese hochmolekularer rRNA der Plastiden abhängig ist und daß die Ausdifferenzierung von Etioplasten zu Chloroplasten unter Lichteinfluß in Gegenwart von Rifampin normal abläuft.

Actinomycin geht eine spezifische Kombination mit der DNA-Matrix aus Kernen und Plastiden ein (KERSTEN 1961, WOODCOCK und BOGORAD 1969) und schaltet so deren DNA-abhängige RNA-Polymerasen aus. Die Nucleinsäuresynthesen in etiolierten, abgeschnittenen Blättern, die mit Actinomycin D inkubiert wurden und während der Inkubation und in Anwesenheit von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat belichtet wurden, sind drastisch reduziert (Tab. XIII). Actinomycin D hemmt die Synthese der niedermolekularen RNAs, der DNA und der rRNA.

Die Chlorophyllsynthese wird durch Actinomycin D ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ) fast völlig ausgeschaltet (Tab. IX). Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, daß bei der verwendeten Hemmstoffkonzentration keine Granathylakoide ausgebildet werden. Nach Belichtung etioliertes Primärblätter von *H. vulgare* (Belichtungsdauer 12 Stunden) treten in den farblosen Plastiden ausschließlich Stroma-thylakoide auf. Wie bei allen übrigen Inhibitorversuchen wird auch in Gegenwart von Actinomycin D der Prolamellarkörper über Zwischenstufen in Primärthylakoide umgewandelt (vgl. Kap. III). Die Neubildung von Granathylakoiden wird aber durch Actinomycin D blockiert (Abb. 79).

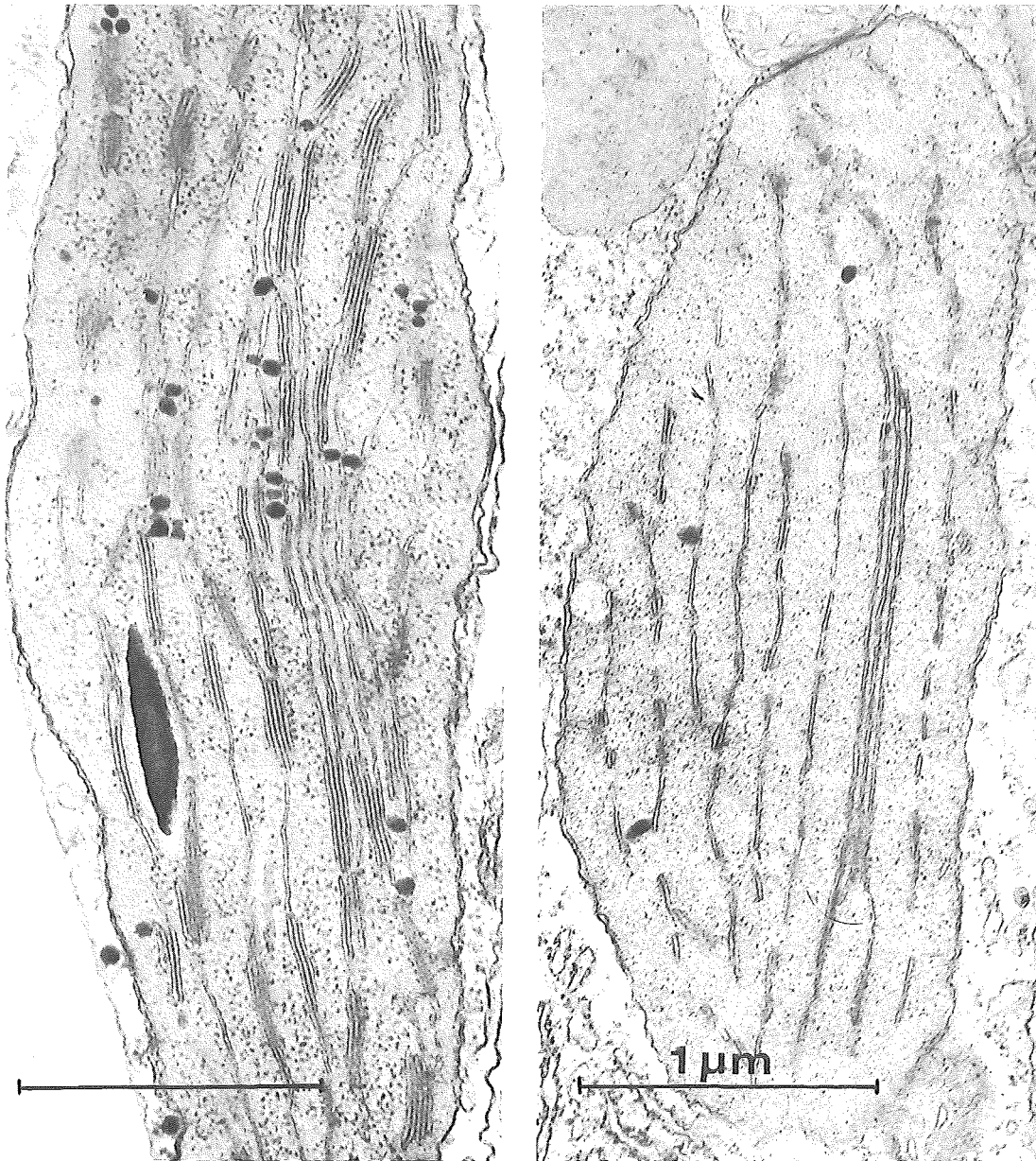


Abb. 78, 79: Rifampin (50 µg/ml) hat keinen Einfluß auf die lichtabhängige Bildung der Granathylakoide (links Actinomycin D hemmt die Granathylakoidbildung (rechts))

Dieses Ergebnis stützt die Annahme von GASSMAN und BOGORAD (1967), daß für die Chloroplastenentwicklung eine DNA-abhängige RNA-Synthese notwendig ist. Da Actinomycin D nicht selektiv die RNA-Polymerasen des Kernes oder der Plastiden hemmt, läßt sich eine spezifische Lokalisierung der Inhibitorwirkung nicht durchführen. BOGORAD nimmt an, daß während der lag- und log-Phase der Chlorophyllsynthese kontinuierlich Synthesen von Nucleinsäuren und Proteinen stattfinden müssen. Es wird die Existenz einer kurzlebigen mRNA postuliert, die für die Synthese der an der ALA-Synthese beteiligten Enzyme mit raschem 'turn-over' zuständig ist.

In Gegenwart von Nalidixin wird im wesentlichen der Einbau von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in die DNA und die hochmolekulare rRNA gehemmt (Tab. XIII), ohne daß eine Hemmung der Chlorophyllsynthese bewirkt wird. Das Beispiel zeigt wie im Falle von Rifampin, daß bei *H. vulgare* die Chlorophyllsynthese ohne zusätzliche Synthesen hochmolekularer, plastidärer rRNA ablaufen kann. Wenn - aufgrund der Versuche mit Actinomycin D - eine lichtinduzierte Bildung von mRNA gefordert wird, dann ist anzunehmen, daß bei den Translationsvorgängen in ergrünenden Plastiden die bereits in den Etioplasten vorliegenden Monosomen zur Polysomenbildung herangezogen werden. Polysomen sind in Chloroplasten junger Phaseolus-Blätter elektronenmikroskopisch von FALK (1969) nachgewiesen worden und von CHEN und WILDMAN (1970) aus Chloroplasten von *Nicotiana* mit Hilfe von Gradientenzentrifugation isoliert worden. Deoxycholatbehandlung führt zum Ablösen zyklischer Polyrribosomen von den Thylakoiden (PHILIPPOVICH et al. 1970).

In *Euglena* hemmt Nalidixinsäure die Chloroplastenteilung wahrscheinlich - in Analogie zu den Verhältnissen bei Bakterien (COOK et al. 1966, DIETZ et al. 1966) - durch Hemmung der Plastiden-DNA Replikation, ohne jedoch die Chloroplastenentwicklung selbst zu beeinflussen (LYMAN 1967). Da die Entwicklung von Etioplasten zu Chloroplasten in den hier untersuchten ausdifferenzierten Blattstadien offenbar nicht mit einer Plastidenteilung korreliert ist (SMITH 1970), kann ein reduzierter Chlorophyllgehalt infolge verringerter Plastidenzahl nicht erwartet werden.

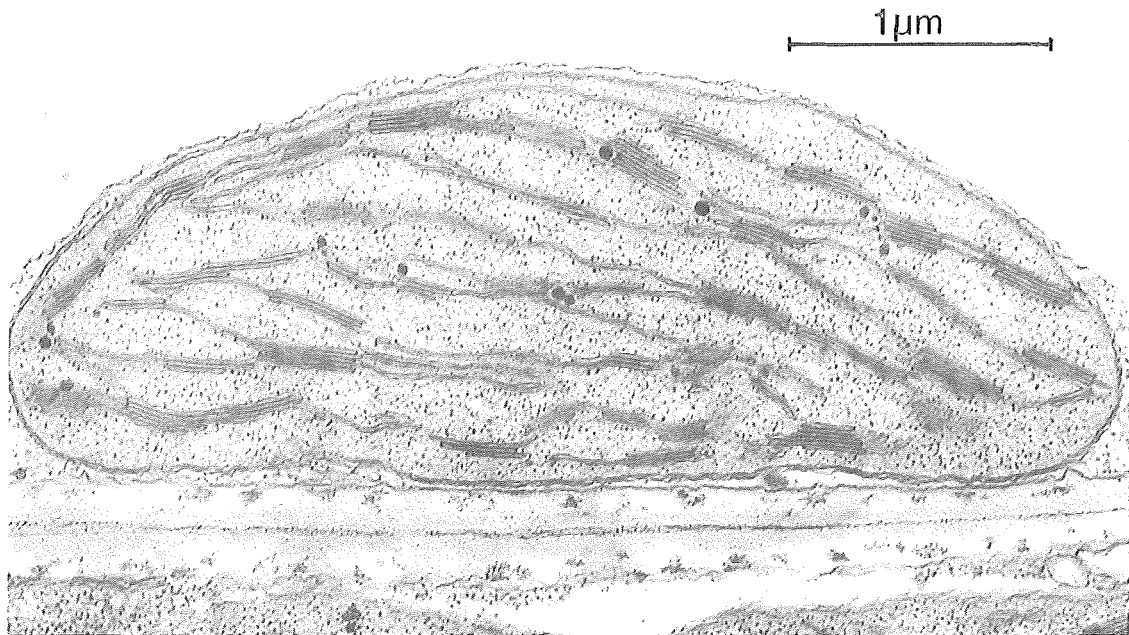


Abb. 80: Wirkung von Mitomycin c auf die lichtabhängige Chloroplastengnese aus Etioplasten. Der Inhibitor hat keinen Einfluß auf die Ausbildung der Granathylakoide

Ein weiterer Inhibitor der DNA-Synthese, Mitomycin c, hatte in dem verwendeten Konzentrationsbereich (50 - 200  $\mu$ g/ml) keinen Einfluß auf die Chlorophyllsynthese und auf die Ausbildung der normalen Ultrastruktur von Chloroplasten (Tab. XIV, Abb. 80). Die Hemmung der Transcription durch netzartige Verknüpfung der beiden DNA-Doppelstränge mit Mitomycin c zeigt keine Wirkung auf die Ausbildung ultrastruktureller Merkmale während der Chloroplastenentwicklung. Vorausgesetzt, die Aufnahme des Antimetaboliten in die intakten Zellen und Plastiden wäre gewährleistet, dann kann dieses Phänomen nur durch die Existenz inaktiver, maskierter mRNAs, die bereits in der Dunkelphase vorhanden sind, erklärt werden. Licht könnte diese präformierten 'messenger' aktivieren, so daß während der lag-Phase die für die ALA-Synthese notwendigen Enzyme gebildet werden könnten. Damit läge für die Differenzierung der Etioplasten in Chloroplasten ein vergleichbarer Fall vor, der von anderen Systemen mit verzögerter Differenzierungsbereitschaft bekannt ist (SPIRIN 1963, WEEKS und MARCUS 1971).

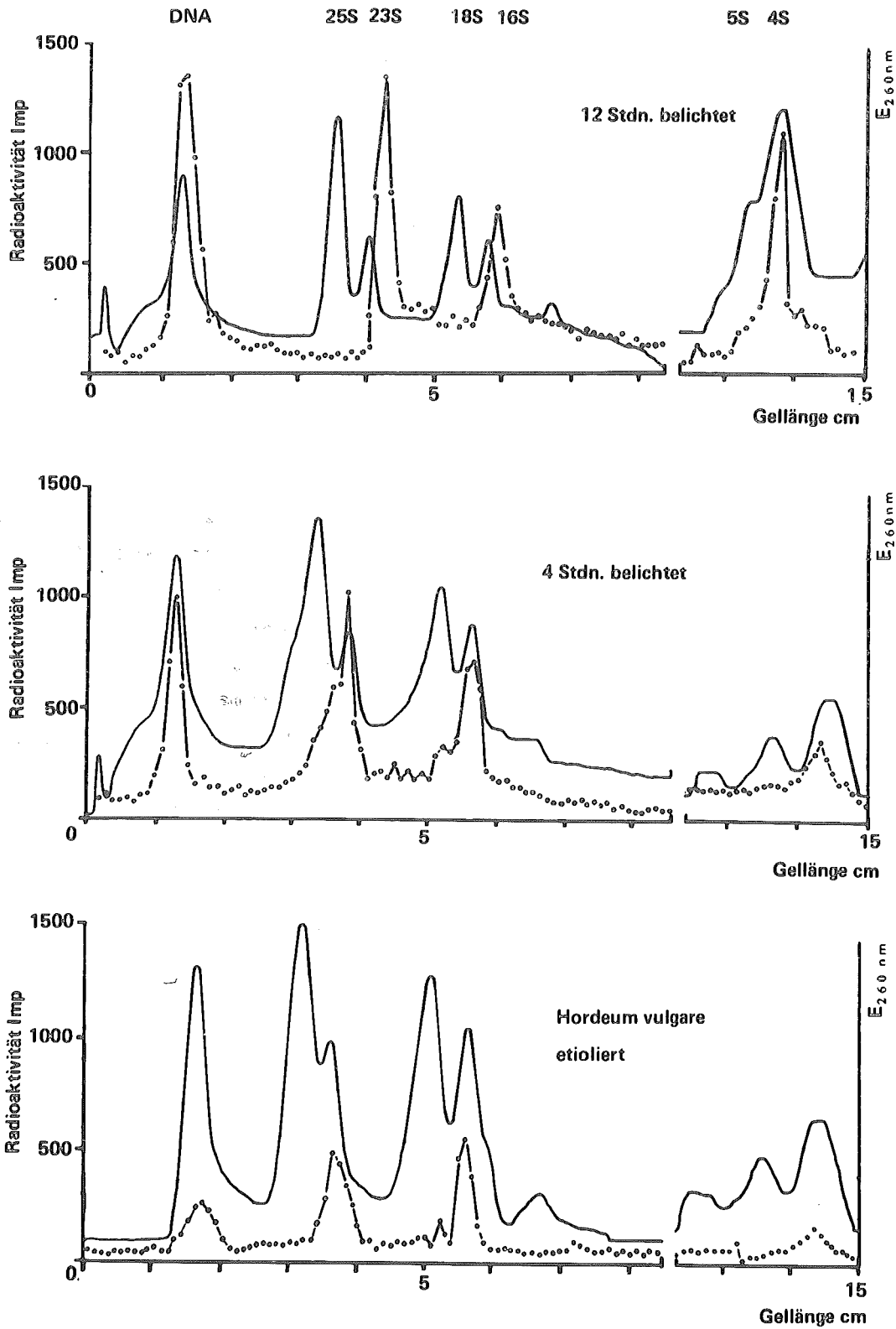


Abb. 81: Gelelektrophoretische Trennung  $^{32}\text{P}$ -markierter Nucleinsäuren in Polyacrylamidgelen aus etiolierten und ergrünenden Primärblättern von *H. vulgare*. Die DNA und die hochmolekularen rRNAs wurden in 2,4% Obergelen, die niedermolekularen RNAs in 7,5% Untergelen aus Polyacrylamid elektrophoretisch getrennt

Zur Verdeutlichung der Wirkung von Inhibitoren der Nucleinsäure- und Proteinsynthese auf Einzelschritte der Plastidenentwicklung wurden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung in Tab. XIV zusammengefaßt.

Um dem Einwand der schlechten Auflösung der niedermolekularen und hochmolekularen rRNA-Fractionen in den MAK-Eluaten vorzubeugen, wurden vergleichsweise  $^{32}\text{P}$ -markierte Nucleinsäuren gleichalter Primärblätter elektrophoretisch in kombinierten Acrylamidgelen getrennt. Die DNA und die hochmolekularen rRNAs (25 S, 23 S, 18 S, 16 S) wurden in den 2,4%igen Obergelen aufgetrennt. Die niedermolekulare RNA trennt sich in zwei Fractionen, tRNA in eine 5 S RNA Fraction auf (Abb. 81). Von der hochmolekularen RNA sind nur die plastidäre rRNA-Komponente (23 S, 16 S) radioaktiv markiert. Die cytoplasmatische 25 S und 18 S RNA der 7 Tage alten Primärblattspitzen aus *H. vulgare* ist unmarkiert. Da der Gehalt hochmolekularer RNAs des Cytoplasmas und des Plastidenstromas während der lichtinduzierten Chloroplastengenese bei diesem Primärblattalter weitgehend konstant bleibt, ist die Berechnung der Syntheseraten von Nucleinsäuren aufgrund der MAK-Chromatographie ausschließlich Ausdruck plastidenspezifischer Synthesen.

## XII. Ribosomale RNA und Thylakoidmembranen in Plastiden von Chlorophylldefektmutanten

Struktur und Funktion chlorophylldefekter Plastiden können als Blockierung bestimmter Entwicklungsschritte bei der Differenzierung von Proplastiden zu Chloroplasten aufgefaßt werden. Vergleichende Untersuchungen an Plastiden des Wildtyps und der chlorophylldefekten Mutanten sind u.a. deswegen von Interesse, weil sie Aussagen über entwicklungsphysiologische Fragen der Plastidenentwicklung - z.B. über die genetische Kontrolle der Proteinsynthesen des Stromas und der Thylakoidmembran - erlauben.

Die Beurteilung der Ursachen der Entwicklungshemmung, d.h. die Lokalisierung der Mutation auf der Ebene der Transcription oder Translation wird bei Plastiden von Eukaryonten dadurch erschwert, daß die Plastidenentwicklung der genetischen Kontrolle des Kerns und Plastiden unterliegt. So zeigen die Ergebnisse an chlorophylldefekter Chlamydomonas (GOODENOUGH et al. 1970), Nicotiana (WILDMAN 1970) und Hordeum (v. WETTSTEIN et al. 1970), daß ausschließlich Kerngene (vgl. KIRK 1966) die Porphyrinsynthesen, die Chlorophyll- und Carotinoidsynthesen und die Synthese bestimmter Membranlipide kontrollieren.

Aufgrund von Hybridisierungsexperimenten (STUTZ 1970, SMILLIE et al. 1967, vgl. TEWARI und WILDMAN 1967) und von Untersuchungen mit selektiv wirkenden Inhibitoren (SURZYCKI 1969, BROWN et al. 1970) ist bekannt, daß die Plastiden-DNA polycistronisch für ribosomale RNA (rRNA) ist. Bei Chlorophylldefekt-Mutanten können Veränderungen und Defekte in der Zusammensetzung von 70 S Ribosomen, ihren Untereinheiten und ihrer rRNA (BOYNTON et al. 1970, WILDMAN 1970) auf einen Defekt der Plastiden-DNA oder der DNA-abhängigen RNA-Polymerase hinweisen. Dieses Ergebnis war der Anlaß, ein neutroneninduziertes Mutantensortiment der Gerste auf das Verhältnis ihrer rRNAs aus 70 S und 80 S Ribosomen zu untersuchen. Zur weiteren Charakterisierung des genetischen Blocks der Chlorophylldefektmutanten wurden Ultrastruktur und Häufigkeit der Thylakoide, Chlorophyllgehalt, photosynthetische  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung, Aktivitäten bestimmter Enzyme des Calvin-Zyklus sowie das DNA- und RNA-Spektrum untersucht.

Das Sortiment der Blattfarbmutanten aus der  $M_2$ -Generation der Gerste wurde durch Bestrahlung von lufttrockenem Samen mit thermischen Neutronen in der Bestrahlungseinrichtung BE 15 des Forschungsreaktors "Merlin" der KFA Jülich erzeugt. Untersucht wurden Primärblätter von 2 - 3 Wochen alten Gewächshauskulturen. Die technischen Daten sind bei F. WALTHER (1969) angegeben, der uns das Material freundlicherweise überließ.

a) Isolierung und Trennung von Nucleinsäuren

1 - 2 g Blattmaterial (Frischgewicht) wurden im Porzellanmörser 5' in der Kälte ( $4^{\circ}\text{C}$ ) unter Zusatz von Na-p-Salicylsäure und Phenol-Kresol nach der Methode von KIRBY (1965) extrahiert. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Sediment zweimal reextrahiert. Den vereinigten Überständen wurde NaCl (30 mg/ml) zugesetzt, erneut mit Phenol extrahiert und die Phenolphase durch Zentrifugieren abgetrennt. Die obere Phase wurde mit 1,5 M Kaliumacetat versetzt (9:1, v/v) und die Nucleinsäuren mit dem doppelten Volumen an Alkohol Kresol (9:1, v/v) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ausgefällt. Die Nucleinsäuren wurden abzentrifugiert und in 1:10 verdünntem SSC-Puffer (0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,1) unter Zusatz von RNase-freier Saccharose gelöst.  $200\ \mu\text{g}$  Nucleinsäuren wurden dann zur Trennung auf die Polyacrylamidgele durch Unterschichten des oberen Elektrodenpuffers aufgetragen.

Als methodischer Hinweis scheint es uns wichtig, daß die Verwendung von Homogenisatoren mit schnell rotierenden Messern zur Zerstörung der DNA und Dinatrium-EDTA enthaltende Extraktionspuffer zum Abbau der 25 S rRNA führen. Extrapoliert man die S-Werte der Abbauprodukte der 25 S rRNA - durch Vergleich mit der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit der 25 S, 23 S, 18 S und 16 S rRNA in den 2,4%igen Gelen -, so ergeben sich als Abbauprodukte eine schwache 13 S RNA und eine stärker ausgeprägte 11 S RNA Bande. Durch Zusatz von  $\text{Mg}^{++}$  in den Extraktionspuffer kann die 25 S RNA stabilisiert (DYER et al. 1971) und können diese Abbauprodukte weitgehend vermieden werden.

Die Trennung der Nucleinsäuren erfolgte elektrophoretisch in

Polyacrylamidgelen nach Angaben von LOENING (1967). Unter Verwendung von Tris-Na-acetat-Puffer, pH 7,15, trennen sich in den 15 cm langen Kombinationstrenngelen (2,4%iges Monomer 11 cm, 7,5% Monomer 4 cm), bei 5 mA/Gelröhrchen und vierstündiger Laufdauer die niedermolekulare 5 S und 4 S RNA in den unteren 7,5%igen Gelen, während die DNA und die hochmolekulare RNA im oberen 2,4%igen Gel aufgetrennt wird.

Der Nachweis der elektrophoretisch getrennten Nucleinsäurefraktionen erfolgte im Joyce- und Loeb1-'Chromoscan'-Photometer durch Scannen der Gele bei einer Wellenlänge von 260 nm. DNA- und RNA-Fraktionen wurden mit 'stains all' nach Angaben von DAHLBERG und Mitarbeitern (1969) zusätzlich colorimetrisch differenziert. Die quantitative Berechnung der Einzelfraktionen aus den Pherogrammen geschah durch Planimetrieren oder mit Hilfe eines automatisch registrierenden Integrators.

#### b) Isolierung und Spreitung von Plastiden-DNA

10 - 30 g Blattmaterial wurde kleingeschnitten, in destilliertem Wasser gründlich gewaschen und im Sorvall-Omnimixer in der Kälte in Phosphatpuffer, pH 7,3, der 0,1 M an RNase-freier Saccharose war, 15 - 30 Sekunden homogenisiert. Der Brei wurde durch vierfaches Leinen filtriert und das Homogenat 10' bei 2000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml Puffer suspendiert und in 1 ml-Portionen auf einen diskontinuierlichen, phosphatgepufferten 30 ml Saccharose-Gradienten (7 ml 2,5 M; 7 ml 2,0 M; 7 ml 1,5 M; 9 ml 1,0 M RNase-freie Saccharose) geschichtet. Nach Zentrifugieren mit 10 000 Upm, 30', im SW-30 Rotor der Beckman Zentrifuge (Spinco L 50) erhält man zwei Plastidenfraktionen, deren untere weitgehend aus intakten Plastiden besteht. Diese Zone wurde durch Abtropfen des Gradienten gesammelt, gegen Phosphatpuffer dialysiert und nach der KIRBY-Methode (s.o.) 1 - 3 mal mit Phenol extrahiert.

Die Plastiden-RNA wurde durch RNase abgebaut und mit Isoamylalkohol - Chloroform (1:24, v/v) schonend bei 4°C 20' mit einem Rührmotor in horizontaler Lage gemischt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase zur Spreitung verwendet. Manuelles Aus-

schütteln führt zu erhöhter Bruchhäufigkeit der Plastiden-DNA.

Die Plastiden-DNA wurde mit Cytochrom c und Ammoniumacetat versetzt (Endkonz.:  $1 \mu\text{g DNA/ml}$  3 M Ammoniumacetat, pH 5, das 0,2% Cytochrom c enthält, vgl. DÖRFLER und KLEINSCHMIDT 1970) und auf 0,3 M Ammoniumacetat, pH 5, gespreitet. Die gespreitete DNA wurde auf Kollodium-Kohle-befilmte  $70 \mu\text{m}$  Pt-Lochblenden übertragen und das Kollodium bei  $200^\circ\text{C}$ , 10', ausgeheizt. Die DNA wurde teilweise mit Uranylacetat kontrastiert oder unter  $7^\circ$  Pt-kegelbedampft (Edwards Modell 4). Kegelbedampfte DNA wurde im Durchlicht, Uranylacetat - kontrastierte DNA im Dunkel-feld abgebildet (Siemens-Elmiskop I).

c) Identifizierung  $^{14}\text{C}$ -markierter, photosynthetischer Intermediärprodukte

Primärblätter der Gerstenmutanten (Länge 6 cm, 0,2 g Frischgewicht) wurden in einer wassergekühlten Photosynthese-Küvette in  $^{14}\text{CO}_2$ -Luft-Atmosphäre mit Weißlicht (35 kLux,  $21^\circ\text{C}$ ) 10' belichtet.  $^{14}\text{CO}_2$  wurde aus 1 mCi  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  generiert. Das Blattmaterial aller Einzelproben unterlag gleichen Versuchsbedingungen. Sofort nach der Belichtung wurden die Blätter in flüssigem  $\text{N}_2$  fixiert, im Mörser feinpulvrig zerrieben und mehrmals mit heißem, 80%igem Methanol extrahiert. Nach Abzentrifugieren des Debris wurden die vereinigten Überstände im Rotationsverdampfer eingengt und aliquote Mengen (entsprechend 10 oder 20 mg Frischgewicht) zur Bestimmung der Gesamteinbaurate und zur papierchromatographischen Trennung nach BENSON und Mitarbeitern (1950; 1. Dim.: Phenol -  $\text{H}_2\text{O}$ , 2. Dim.: Butanol - Propionsäure -  $\text{H}_2\text{O}$ ) getrennt. Die Expositionsdauer der mit Röntgenfilm belegten Radiochromatogramme (Kodak, x-ray royal blue) betrug eine Woche.

Die Bestimmung der Radioaktivität in den chromatographisch getrennten Flecken erfolgte im Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer (Tri-Carb, Fa. Packard). Der Szintillationscocktail bestand aus: Toluol 1 000 ml, p-bis-(2-5-Phenylloxazol)-benzol 100 mg, 2,5 Diphenylloxazol 4 g.

d) Pigmentanalyse

Die Chlorophyllkonzentrationen wurden nach der ARNON-Methode (1949) bzw. nomogramatisch nach KIRK (1968) bestimmt.

e) Enzymaktivitäten

Die Aktivität der Enzymsequenz Phosphoriboseisomerase - Phosphoribulokinase und Carboxydismutase (Ribulose 1,5-diphosphat Carboxylase) wurde an Blattextrakten nach Angaben von STEER und Mitarbeitern (1968) getestet. Nach Zermörsern der Blätter (1 g Frischgewicht in 3 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,8) wurde das Homogenat 15' im SW-50 Rotor mit 32 500 Upm (Spinco L 50) zentrifugiert und die pufferlöslichen Proteine des Überstandes nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) bestimmt. Zum Testansatz wurden  $4 \mu\text{Mol}$  Ribose-5-phosphat,  $8 \mu\text{Mol}$  ATP und  $20 \mu\text{Mol}$   $\text{MgCl}_2$  in 1,0 ml 0,1 M Tris-Puffer gelöst. Zu 0,5 ml des Testansatzes wurde 0,2 ml des Überstandes plus  $8 \mu\text{Mol}$   $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$  als Substrat gegeben. Die Reaktion ( $25^\circ\text{C}$ ) wurde nach 5', 15' und 30' Inkubationsdauer durch Zugabe 20%iger Perchlorsäure gestoppt. Nach Neutralisierung mit kalter KOH wurde zentrifugiert und 0,1 ml des Überstandes auf Chromatographiepapierstückchen angetrocknet und radiometrisch im Tri-Carb (s.o.) vermessen. Aliquote Teile wurden auf Whatman-I Papier angetrocknet und im Trennmittelgemisch nach BENSON et al. (1950) auf das Endprodukt Phosphoglycerinsäure radiochromatographisch untersucht. Die Kontrolltestansätze enthielten kein Ribose-5-phosphat.

f) Elektronenmikroskopie

Blattstückchen der Blattfarbmutanten wurden in phosphatgepuffertem 6,25%igem Glutaraldehyd, pH 7,2, bei  $4^\circ\text{C}$  fixiert und wie üblich in Epon eingebettet (SABATINI et al. 1963). Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte nach Angaben von REYNOLDS (1963) mit Bleicitrat. Zur Bestimmung der Thylakoidlängen wurden Grana- und Stromathylakoide auf vergrößerten Abzügen mit Hilfe eines geographischen Längenmessers vermessen. Für die Verteilungsdiagramme wurden Thylakoidlängen aus je 25 Plastiden der Wildform und der chlorophylldefekten Formen untersucht. Die Thylakoidlängen wurden in Größenklassen von  $0,1 \mu\text{m}$  (= 'Grana'thyla-

koide) bzw.  $0,25 \mu\text{m}$  (= 'Stroma'thylakoide) eingeteilt und gegen ihre Häufigkeit aufgetragen.

Entsprechend den pigmentanalytischen Verhältnissen ergab sich zwischen Chlorophyllgehalt und Thylakoidmenge (= Gesamtlänge von Grana- und Stromathylakoiden) im Falle der Chlorophyllletalen mit extremem Pigmentmangel (viridis III, albina I u. II) eine Korrelation. Bei den viridis I-Typen und den chlorina-Typen wird zwar die Tendenz sichtbar, daß Chlorophylldefizienz (Chlorophyll a + b) mit einer Hemmung der Thylakoidausbildung verbunden ist, eine direkte Korrelation besteht jedoch nicht in allen Fällen (Abb. 82).

Ein Vergleich der Thylakoidlängen der einzelnen Mutantentypen ergab folgende Verhältnisse: viridis I- und viridis II-Typen haben weniger Granathylakoide als die Kontrollen, viridis III-Plastiden werden durch wenige lange, eng gepackte Thylakoidstapel charakterisiert. Der chlorina-Typ hat weniger - jedoch normal lange - Granathylakoide und etwa die gleiche Anzahl Stromathylakoide wie die Kontrolle. Die xantha-Mutante besitzt demgegenüber wenige oder gar keine Granathylakoide, jedoch längere Stromathylakoide als der Wildtyp. Der im Aussehen weiß bis schwach grünliche albina I-Typ und die rein weiße albina II-Form haben keine oder nur sehr selten vereinzelte Thylakoide.

Die vergleichende Untersuchung der photosynthetischen  $^{14}\text{CO}_2$ -Assimilation der neutroneninduzierten Chlorophylldefektmutanten ergab mit abnehmendem Chlorophyllgehalt der Mutanten verringerte Einbauraten in die lösliche,  $^{14}\text{C}$ -markierte Gesamtfraktion (Abb. 83, Tab. XVI). Im Falle der letalen, stark chlorophylldefekten Typen ist der Gesamteinbau um etwa 96% (viridis III) und um mehr als 99% (xantha, albina) gehemmt. Ihre Einbaurate fällt in die Größenordnung der  $\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung.

Aufgrund des chromatographischen Verteilungsmusters der  $^{14}\text{C}$ -markierten Intermediärprodukte ist mit zunehmender Chlorophylldefizienz der Chlorophylldefektmutanten eine relative Abnahme der Einzelaktivitäten markierter Intermediärprodukte des photosynthetischen Carbonzyklus (Saccharose, Serin, Glutaminsäure,

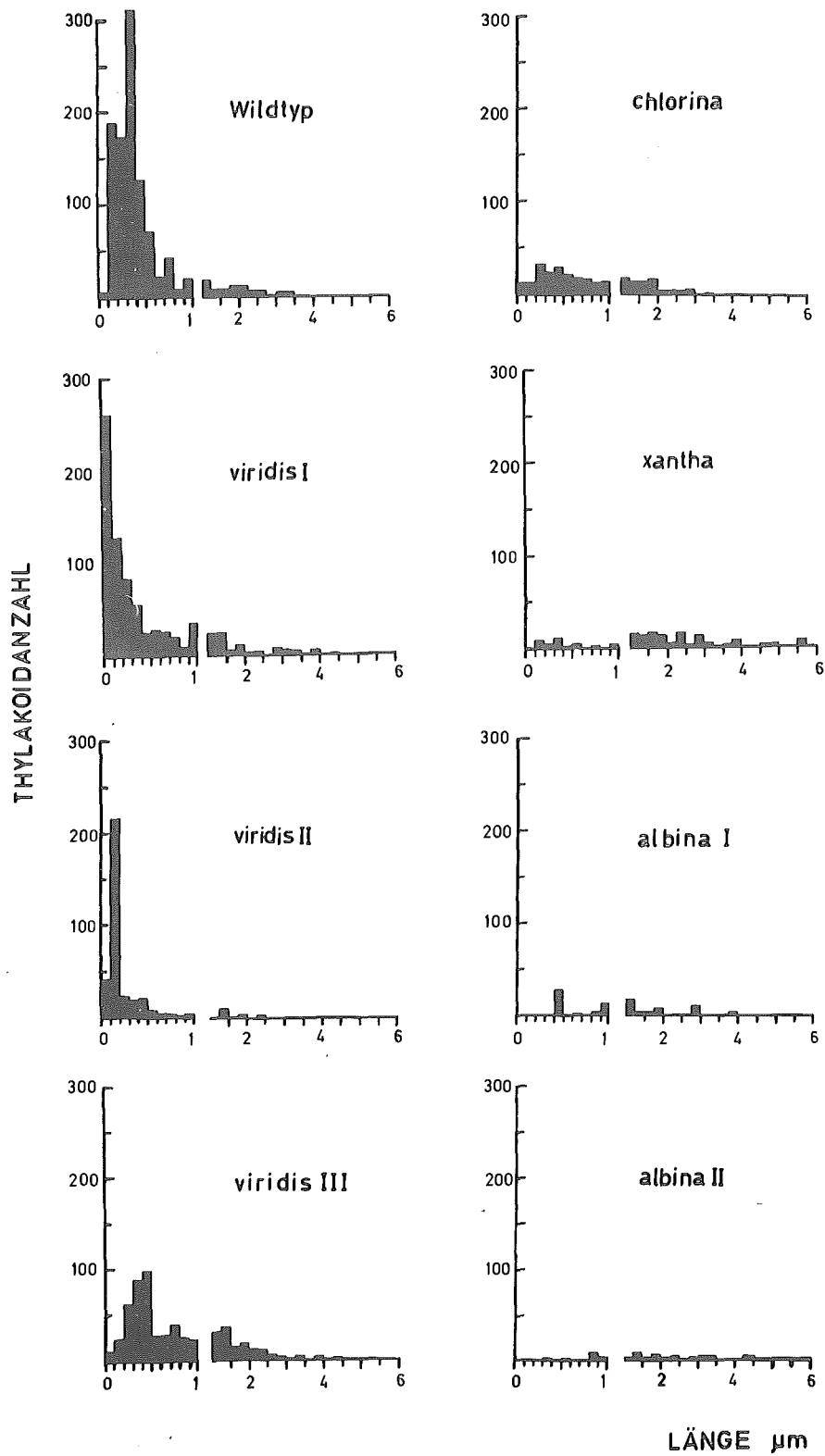


Abb. 82: Verteilung von Grana- und Stromathylakoiden aus je 25 Plastiden von chlorophylldefekten Gerstenmutanten

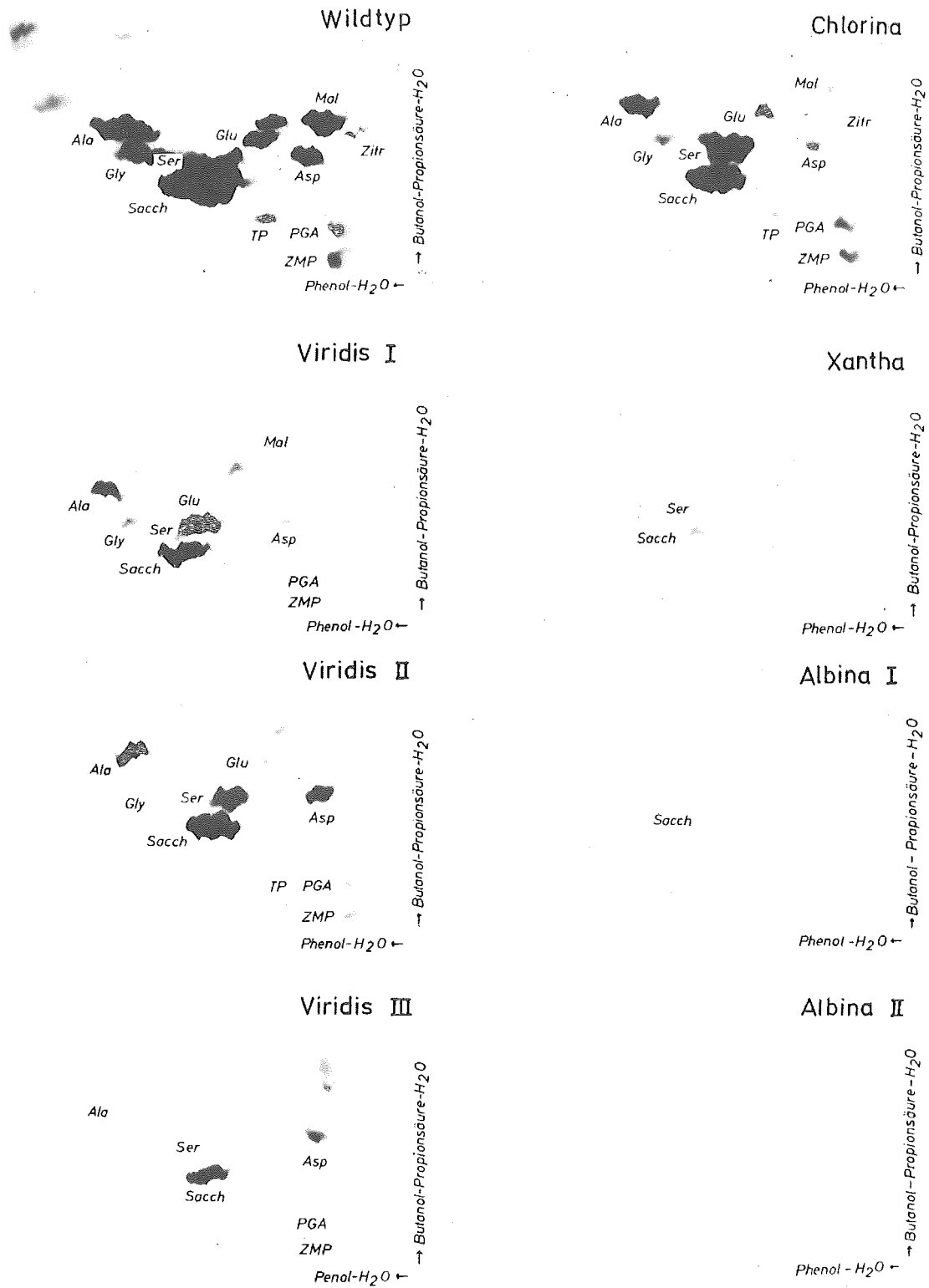


Abb. 83: Radiochromatographischer Nachweis von  $^{14}\text{C}$ -markierten Intermediärprodukten der photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Assimilation aus Gerstenmutanten ( $10'$  Photosynthese, 35 kLux)

Asparaginsäure, Alanin, Glycin, Triosephosphat, Zuckermono- und -diphosphate) zu beobachten. Eine Anhäufung bestimmter Stoffwechselzwischenprodukte oder der Ausfall einzelner  $^{14}\text{C}$ -markierter Verbindungen - also Indizien für eine Blockbildung in der Enzymsequenz des reduktiven Pentosephosphatweges - liegen in keinem Fall vor (Tab. XVI).

Die Frage, ob die Hemmung der photosynthetischen  $^{14}\text{CO}_2$ -Assimilation der Gerstenmutanten als Folge eines unvollständig ausgebildeten Enzymbestecks im Calvin-Zyklus oder u.a. als Folgeerscheinung von Störungen im Elektronentransport aufzufassen ist, wurde durch Bestimmung der Enzymaktivitäten des Phosphoriboseisomerase-Phosphoribulokinase-Carboxydismutase-Systems geklärt (Tab. XVII). In dieser Enzymsequenz wird der Umsatz von Ribose-5-phosphat über Ribulose-1,5-diphosphat zu Phosphoglycerinsäure gemessen. Durch Zusatz von  $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$  zum Testansatz lassen sich die Enzymaktivitäten über das  $^{14}\text{C}$ -markierte Endprodukt Phosphoglycerinsäure bestimmen. Die Einbaurrate von  $^{14}\text{CO}_2$  - wiedergegeben ist der Mittelwert aus drei Messungen - in  $^{14}\text{C}$ -markierte Phosphoglycerinsäure lag für alle Chlorophylldefektmutanten - außer den albina II-Typen - oberhalb der Impulsrate des Wildtyps. Das bedeutet, die drei genannten plastidenspezifischen Enzyme sind in den viridis- und xantha-Formen vorhanden und scheinen größere Umsatzraten als der Wildtyp zu zeigen. Die scheinbar erhöhte Enzymaktivität bei Mutanten ist u.a. darauf zurückzuführen, daß als Bezugspunkt für die Enzymuntersuchungen die löslichen Gesamtproteine der Primärblätter des Wildtyps zugrunde gelegt wurden.

Interessant sind die Verhältnisse beim albina I-Typ. Hier sind die Enzymaktivitäten außergewöhnlich gering (Tab. XVII). Möglicherweise fehlen diesem Typ ein oder mehrere der untersuchten Enzyme teilweise oder völlig. Ungeklärt ist noch die Frage, inwieweit die übrigen - hier nicht näher untersuchten - Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges im albina II-Typ vorhanden sind. Chlorina- und albina I-Typen wurden mangels ausreichender Materialmengen nicht untersucht.

Tab. XV

Pigmentmangel und Thylakoidgesamtlänge (Mittel von je 25 Plastiden) der untersuchten Chlorophylldefektmutanten von *H. vulgare* (grüne Kontrolle = 100%)

	Chlorophylle	Thylakoide
Wildtyp	100,0	100,0
viridis I	47,0	87,4
viridis II	25,3	70,4
viridis III	10,1	21,3
chlorina	10,1	51,5
xantha	0,0	64,6
albina I	4,7	19,6
albina II	0,0	8,7



Tab. XVII

Aktivitäten der Enzymsequenz Phosphoriboisomerase-Phosphoribulokinase-Carboxydismutase. Die Impulse/min beziehen sich auf 1 000  $\mu$ g lösliches Protein

	Inkubationsdauer		
	5'	10'	15'
Wildtyp	447	2430	5969
viridis I	8097	18508	28562
viridis II	9610	18815	28880
viridis III	10822	18918	25911
xantha	2725	8174	9992
albina II	111	230	410

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacryl-Gelelektrophorese wurden Zusammensetzung und Veränderung der ribosomalen RNA (rRNA) der Plastiden und des Cytoplasmas der einzelnen Mutanten untersucht. Die Nucleinsäuren lassen sich in Abhängigkeit vom Molekulargewicht in folgende Fraktionen trennen (Abb. 84, 85): DNA, 25 S, 23 S, 18 S und 16 S rRNA (Trennung im 2,4%igen Obergel); 5 S rRNA und 4 S RNA (Trennung im 7,5%igen Untergel). Die 25 S, 18 S und die 5 S RNA sind die RNA-Komponenten der 80 S Ribosomen des Cytoplasmas (vgl. SCOTT und SMILLIE 1969, LOENING 1969, LOENING und INGLE 1967, vgl. WOODCOCK und BOGORAD 1971). Die 70 S Ribosomen der Plastiden enthalten drei RNA-Typen: 23 S, 16 S sowie eine 5 S RNA (SCOTT und SMILLIE 1969; entsprechend 23 S und 16 S, LOENING und INGLE 1967). Die 5 S RNA aus Cytoplasma und Plastiden tritt in unserem Falle als eine einheitliche Bande in den 7,5%igen Gelen auf. Durch Modifizierung der Gellänge und Gelkonzentration kann sie weiter aufgetrennt werden. Die transfer RNA (4 S) aus Cytoplasma und Plastiden bandiert unter unseren Bedingungen ebenfalls einheitlich.

Die Berechnung der prozentualen Verhältnisse einzelner Nucleinsäurefraktionen aufgrund ihrer Absorption bei 260 nm von normal grünen Primärblättern des Wildtyps ergab - nach Phenol-Extraktion mit der KIRBY-Methode - gleiche Mengen von DNA und 25 S rRNA. Das Mengenverhältnis der 25 S zur 18 S rRNA beträgt 2:1; das der plastidialen 25 S zur 16 S rRNA 1,3 : 1,0. Der Anteil der niedermolekularen 5 S RNA aus 70 S und 80 S Ribosomen macht 5% aus. Die transfer RNA hat einen mengenmäßigen Anteil von 19% der gesamten Nucleinsäuren (Tab. XVIII). Das Mengenverhältnis der 25 S : 18 S rRNA von 2:1 gilt - bis auf den viridis I-Typ und albina II - auch mehr oder weniger für alle hier untersuchten Mutanten. Setzt man ein molares Verhältnis der 25 S/18 S RNA mit 1:1 voraus, dann ergeben sich rein quantitativ für diese Fälle keine Unterschiede in der Zusammensetzung der rRNA aus den Untereinheiten der 80 S Ribosomen des Wildtyps und der Mutanten. Vom normalen 1,3 : 1,0-Verhältnis der 25 S/16 S-Fraktion des Wildtyps weichen die Ergebnisse bei den Mutanten ab. Hier wurden gefunden: 0,6 : 1,0 für die viridis I-Typen, 1,2 : 1,0 für viridis III und 1,1 : 1,0 für die xantha-Form.

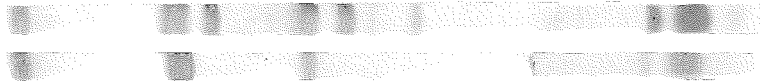
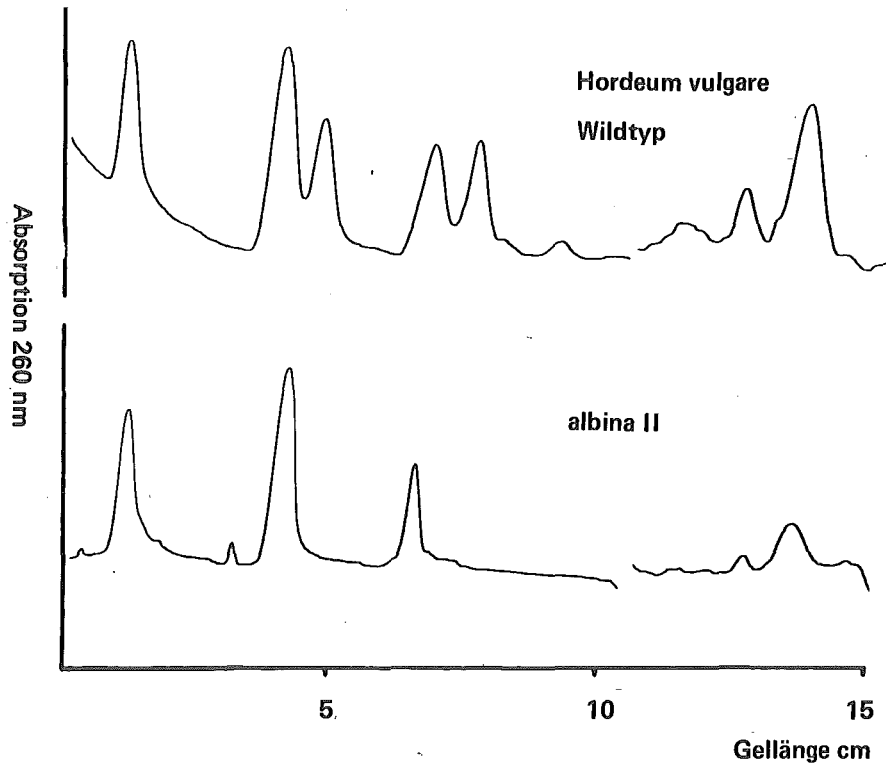


Abb. 84: Gelelektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren aus Primärblättern des Wildtyps der Gerste (oben) und des albina II-Typs (unten). Die DNA und die hochmolekulare rRNA wurden im 2,4%igen Polyacrylamidgel (links) getrennt. Die Trennung der löslichen RNA erfolgte in 7,5%igen Gelen (rechts)

Abb. 85: Pherogramme der Nucleinsäuren des Wildtyps und der weißen albina II-Mutante. Die weiße Mutante besitzt keine ribosomale RNA in ihren Plastiden

Tab. XVIII

Prozentuale Verteilung einzelner Nucleinsäurefraktionen aus Blattfarbmutanten der Gerste nach gelelektrophoretischer Trennung

	DNA	25 S	23 S	18 S	16 S	5 S	4 S
Wildtyp	21,7	21,7	12,3	11,3	9,3	4,9	18,7
viridis I	15,1	17,8	8,3	17,5	14,5	7,6	18,9
viridis III	20,1	22,2	12,3	12,2	10,1	3,3	19,8
xantha	28,8	18,0	4,1	8,0	3,7	5,4	32,0
albina II	25,1	38,3	0,0	12,4	0,0	3,7	20,5

Ribosomale RNA läßt sich in den Plastiden des albina II-Typs mit den Methoden der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht nachweisen (Abb. 84, 85). Albina I- und viridis II-Typen wurden wegen Materialmangels nicht untersucht.

Der Quotient von 25 S + 18 S rRNA und 23 S + 16 S rRNA läßt Aussagen über das Mengenverhältnis der hochmolekularen rRNA und damit über das Verhältnis der 80 S : 70 S Ribosomen zu. Er beträgt für die grünen Kontrollen, viridis I und III genau 1,5 : 1,0. Ein abweichendes Verhältnis mit 3,3 : 1,0 zeigt die xantha-Mutante. Vorausgesetzt, die Menge der 80 S Ribosomen des Wildtyps und der Mutanten wären - bezogen auf eine Zelle - gleich, dann besitzt bei gleicher Plastidenzahl die xantha-Mutante nur die Hälfte der Plastidenribosomen des Wildtyps.

Untersuchungen zum Nachweis der Plastiden-DNA wurden an den grünen Kontrollen und an der albina II-Mutante durchgeführt. Die übrigen Mutanten wurden nicht untersucht, weil Blattmaterial zur Plastidenisolierung und zur DNA-Extraktion in ausreichender Menge nicht zur Verfügung stand.

Erwartungsgemäß zeigten Chloroplasten des Wildtyps doppelsträngige DNA, die nach Phenolextraktion partiell noch mit Membranresten verbunden ist. Wahrscheinlich handelt es sich um (Thylakoid)-membrangebundene DNA. Durch wiederholte Phenolextraktion kann die Chloroplasten-DNA von den anhaftenden Membranproteinen gereinigt werden. In den farblosen, ribosomenfreien Plastiden des weißen albina II-Typs konnte ebenfalls 'membrangebundene' DNA nachgewiesen werden (Abb. 86, 87). Die gesamte Länge der offenen und z.T. schleifenartig angeordneten DNA-Stränge betrug im Falle der Wildform und der albina II-Form etwa 32  $\mu$ m. Unklar ist, ob die freien Enden der DNA nativen Charakter besitzen oder durch Zerschneiden eines einzelnen, möglicherweise ringförmigen DNA-Moleküls entstanden sind.

Die Ultrastruktur der Plastiden vom neutroneninduzierten Mutantentyp viridis I zeigt im Vergleich mit den Kontrollen eine normale Anordnung von Grana- und Stromathylakoiden. Im Gegensatz zum Normaltyp ist die Anzahl der Thylakoide pro Granum reduziert

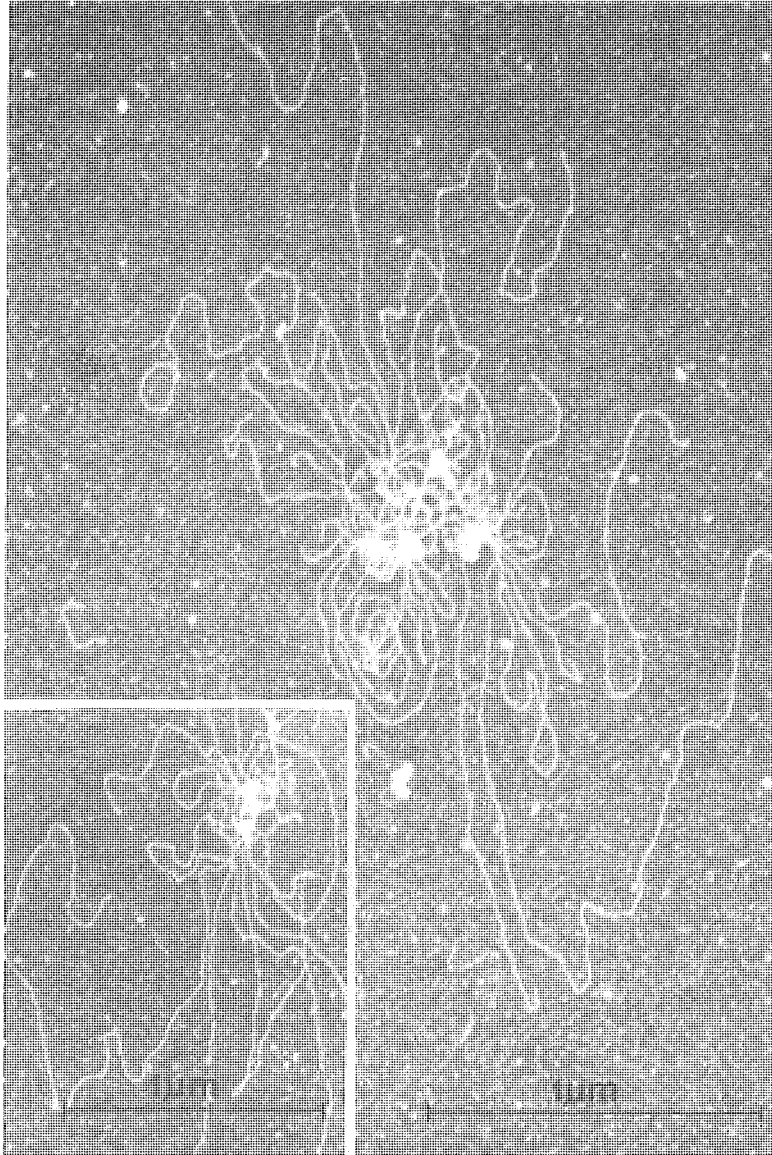


Abb. 86: Membrangebundene DNA aus Chloroplasten der Gerste.  
Elektronenmikroskopische Dunkelfeldaufnahme nach  
Spreitung der DNA mit Cytochrom c und Kontrastierung  
mit Uranylacetat

Abb. 87: DNA aus Plastiden der albina II-Mutante der Gerste.  
Präparative Bedingung wie in Abb. 86

(Abb. 88, 89). Viridis I-Typen, die übrigen viridis-Mutanten und der chlorina-Typ haben - im Gegensatz zur amöboiden Form der xantha- und albina-Plastiden - linsenförmige Chloroplasten mit typischen doppelten Hüllmembranen.

In den Plastiden der Chlorophyllmutante viridis II ist der Anteil der Granathylakoide weiter reduziert (Abb. 90). Anordnung und Form der Thylakoide der viridis III-Mutante sind normal. Plastiden des viridis III-Typs enthalten Prolamellarkörper; sie sind unfähig, den Prolamellarkörper unter Lichteinfluß völlig in Primärthylakoide umzuformen. Thylakoide an der Plastidenperipherie sind meist blasig erweitert (Abb. 91).

Die Anordnung der Plastoglobuli der viridis I-Typen ist überwiegend solitär. Plastiden der viridis II- und viridis III-Typen haben überwiegend gruppenförmig angeordnete Plastoglobuli. Ribosomen lassen sich mit Uranylacetatkontrastierung in allen drei Typen nachweisen.

Morphologisch läßt sich der chlorina-Plastidentyp in die Nähe der viridis II-Formen einordnen. Chlorina-Plastiden besitzen noch das äußere linsenförmige Plastidenprofil der Kontrollen. In den 2 - 3 Wochen alten Gewächshauskulturen finden sich ein oder zwei Prolamellarkörper pro Plastide, deren Kristallgitterstruktur nicht oder nur schlecht erhalten ist. Ein weiteres für chlorina-Plastiden typisches Charakteristikum ist eine erhöhte Plastoglobulianzahl. Die Plastoglobuli befinden sich unmittelbar an der Peripherie der Prolamellarkörper. Ursache der Differenzierungsstörung der chlorina-Plastiden dürfte in der Unfähigkeit zur Umbildung ihrer Prolamellarkörper liegen, so daß nur wenige Thylakoide gebildet werden. Der Innenraum der Granathylakoide aus chlorina-Plastiden ist z.T. vesikulär erweitert (Abb. 92).

Die Plastiden der neutroneninduzierten xantha-Mutante besitzen 'ungeordnete' Prolamellarkörper, die möglicherweise als Vorstufen der Kristallgitter anzusehen sind. Granathylakoide fehlen diesem Plastidentyp völlig oder teilweise (Abb. 93). Die Plastoglobuli befinden sich überwiegend in solitärer Anordnung zwi-

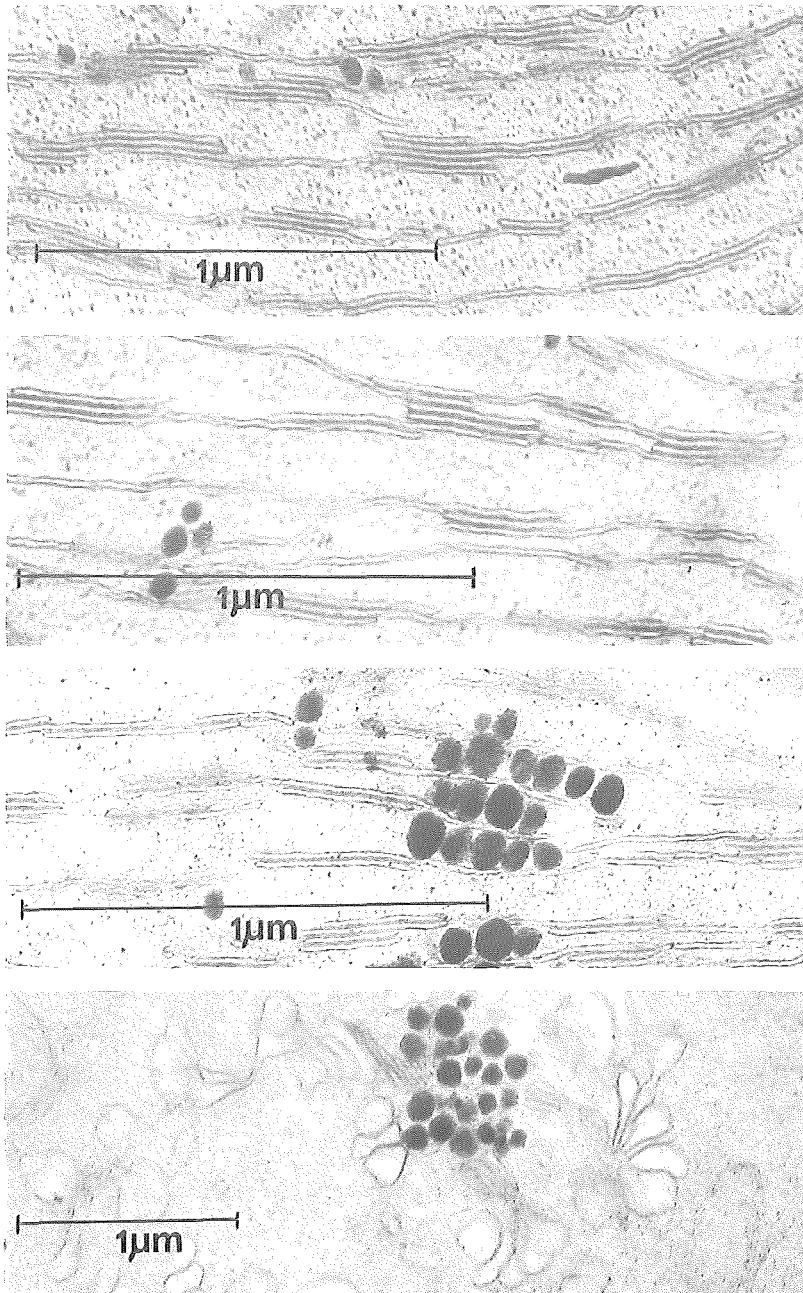


Abb. 88-91: Thylakoidanordnung in Plastiden der grünen Kontrollen, des viridis I-Typs, des viridis II-Typs und der viridis III-Form (von oben nach unten)

schen den Maschen der Tubuli; vereinzelt treten sie in Gruppen auf.

Untersuchungen der Ultrastruktur von Thylakoiden aus albina I-Mutanten mit Spuren von Chlorophyllen und Carotinoiden und aus den völlig pigmentfreien albina II-Typen erbrachten in beiden Fällen ähnliche Ergebnisse. Die beiden Typen haben 'ungeordnete' Prolamellarkörper mit vereinzelt Stromathylakoiden. Granathylakoide sind im Falle der albina II-Typen nicht vorhanden. Die Plastiden der albina I-Typen enthalten in Ausnahmefällen Granathylakoide (Abb. 94, 95). Elektronenmikroskopisch lassen sich in beiden albina-Typen keine Ribosomen im Stroma nachweisen; hingegen besitzt das Cytoplasma mit Uranylacetat kontrastierbare Ribosomen.

Die Steuerung der Chloroplastendifferenzierung, d.h. die Synthesenstrukturgebundener und pufferlöslicher Proteine und Lipide des Stromas und der Thylakoide während der Ergrünungsprozesse, unterliegt der genetischen Kontrolle der Kern- und Plastiden-DNA.

Die Rolle der Plastiden-DNA ist durch Anwendung selektiv wirkender Inhibitoren (z.B. Rifampicin, SURZYCKI 1969, GOODENOUGH 1970, BOGORAD 1970, BROWN et al. 1970) und durch Herstellung u.v.-induzierter Euglena-Stämme, die völlig frei von Plastiden-DNA sind (SCHIFF und EPSTEIN 1966, EDELMAN et al. 1965), sowie durch DNA-RNA-Hybridisierungsexperimente (SCOTT und SMILLIE 1967, STUTZ 1970) z.T. bekannt. So darf man als sicher ansehen, daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase und die rRNA der Plastiden von der Plastiden-DNA codiert wird.

Die Funktion der Kern-DNA bei der Plastidendifferenzierung ist durch die ausschließlich mendelnde Vererbung von Genen, die die Plastidenentwicklung beeinflussen, teilweise bekannt. So unterliegt die Kontrolle von Einzelschritten der Chlorophyll- und Carotinoid-Synthese der Kern-DNA. Außerdem kontrollieren Kern-gene die Insertion der Chlorophylle in die Thylakoide, die Synthese chloroplastenspezifischer Lipide, die Porphyrinsynthese (KIRK 1966, v. WETTSTEIN et al. 1970), die Proteine des Elektronentransportes und das "stacking" der Thylakoidmembran

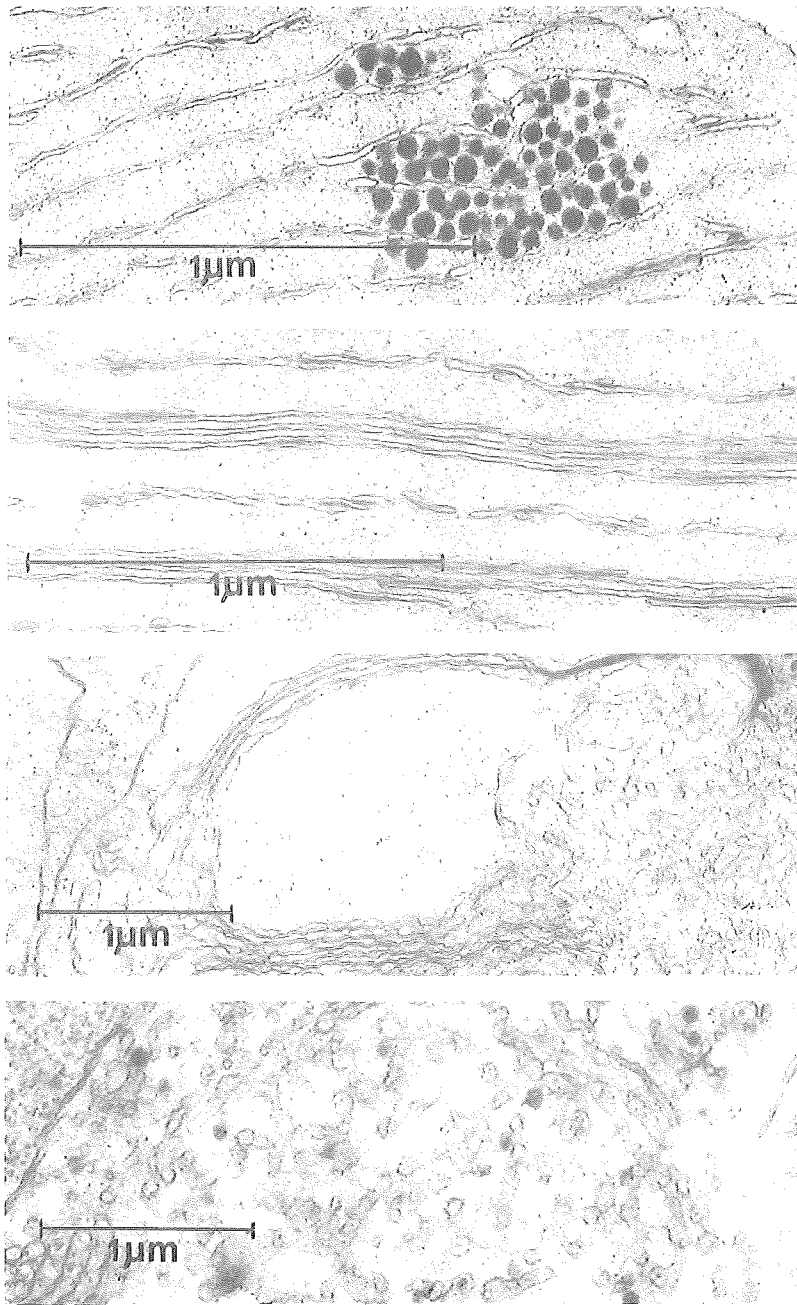


Abb. 92-95: Thylakoidanordnung in Plastiden des chlorina-Typs, des xantha-Typs und der albina I- und II-Typen (von oben nach unten)

(GOODENOUGH et al. 1970).

Bisher liegt keine Information darüber vor, inwieweit die Strukturproteine der Thylakoidmembran und die Proteine der doppelten Plastidenhüllen durch Kern- oder Plastiden-DNA codiert werden. Sicher ist jedoch, daß die Enzyme des Calvin-Zyklus, Fraction I-Proteine und die Strukturproteine der Thylakoidmembran an den Plastidenribosomen gebildet werden (SMILLIE et al. 1967, WILDMAN 1970).

Interessanterweise besitzt der albina II-Typ der Gerste zwar Plastiden-DNA, aber keine - mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und elektronenmikroskopisch nachweisbare - Plastiden-rRNA bzw. Ribosomen. Demzufolge fehlt ihm eines oder alle der untersuchten plastidenspezifischen Enzyme Phosphoriboseisomerase, Phosphoribulokinase und Carboxydismutase. Möglicherweise fehlen dieser Mutante auch die übrigen Enzyme des Calvin-Zyklus, weil sich photosynthetisch gebildete  $^{14}\text{C}$ -Intermediärprodukte nicht nachweisen lassen.

Dieses Ergebnis bestätigt den Befund von SMILLIE und Mitarbeitern (1967) über die Wirkung des selektiv wirkenden Chloramphenicols auf 70 S Ribosomen, daß die Proteine des reduktiven Pentosephosphatweges an den Plastidenribosomen gebildet werden müssen, wobei die Frage nach der Herkunft des messengers (Kern oder Plastide) weiterhin offen bleibt. Denkbar wäre, daß im Falle der albina II-Mutante noch messenger transkribiert werden, ihre Translation durch das Fehlen von 70 S Ribosomen unmöglich wird.

Die Ursache für den genetischen Block auf der Ebene der 70 S Ribosomen im Falle von albina II deutet auf eine Veränderung oder den völligen Ausfall der Cistrons für 23 S und 16 S rRNA in der Plastiden-DNA hin. Ferner muß in Betracht gezogen werden, daß im Falle der albina II-Mutante keine bzw. defekte DNA-abhängige RNA-Polymerase gebildet wird. WILDMAN (1970) konnte an einer weißen Tabak-Mutante eine Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität gegenüber der des Wildtyps nachweisen.

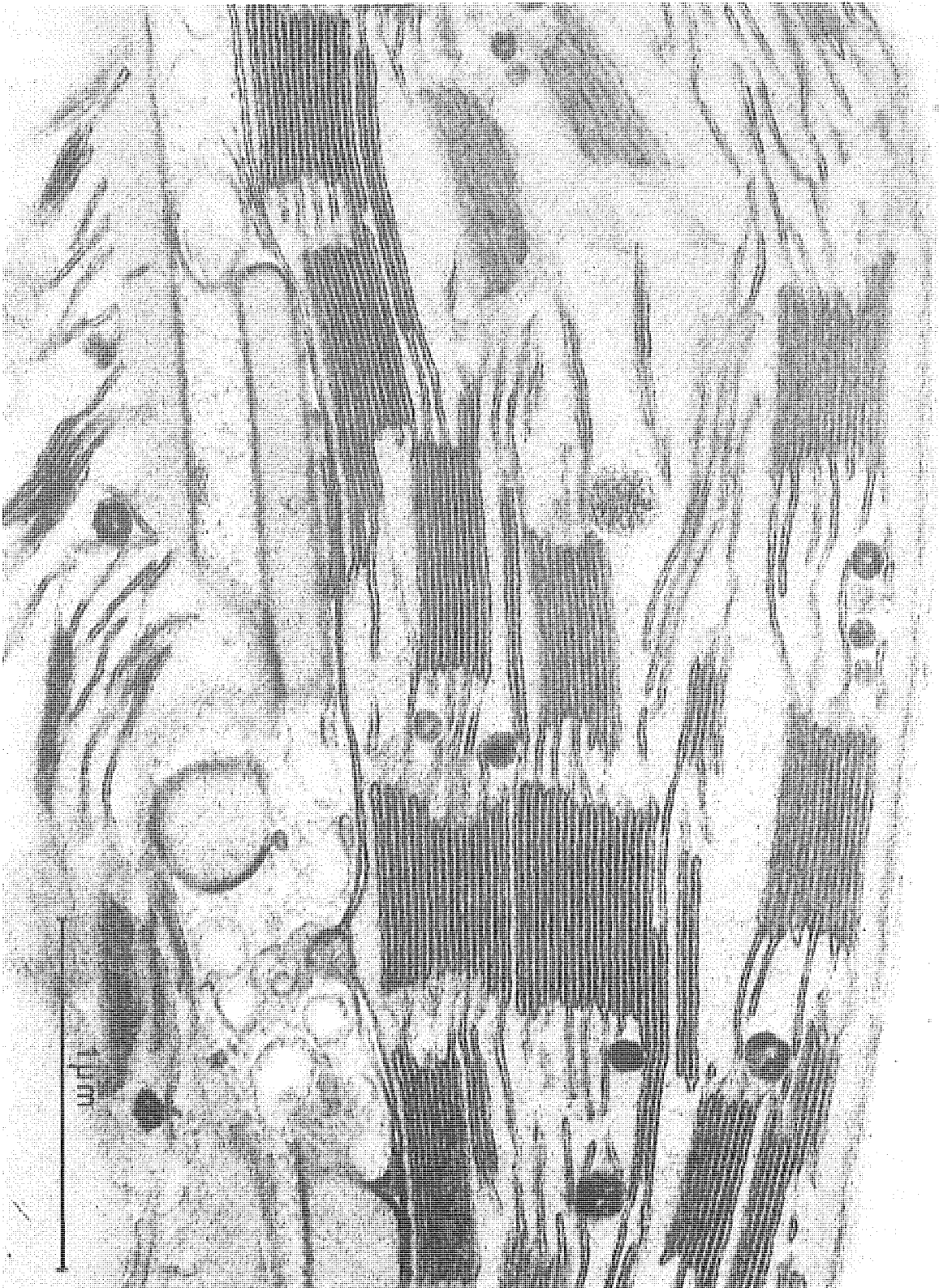


Abb. 96: Chloroplast des Wildtyps von *H. vulgare*. Fixierung:  
Glutaraldehyd -  $\text{OsO}_4$  -  $\text{KMnO}_4$

Plastiden-DNA ist elektronenmikroskopisch in Ultradünnschnitten pigmentfreier Mutanten des Mais (SHUMWAY und WEIER 1967), in weißen Tradescantia-Plastiden (SPREY 1966) und in chlorophyllfreien Plastiden in *Vicia faba* (DYER et al. 1971) nach Uranylacetat-Kontrastierung nachgewiesen worden. Wenngleich an der gespreiteten Plastiden-DNA aus der albina-Mutante und dem Wildtyp bisher keine Unterschiede in der mittleren Länge der DNA nachgewiesen werden konnten, so ist das Vorkommen von Plastiden-DNA in den rein weißen Plastiden deswegen von Interesse, weil den pigmentfreien, u.v.-induzierten *Euglena*-Stämmen Plastiden-DNA völlig fehlen kann (SCHIFF und EPSTEIN 1966).

Aufgrund der elektronenmikroskopischen Untersuchung der weißen Primärblätter mit den ribosomenfreien Plastiden des albina II-Typs scheint die Plastidenanzahl / Zelle gegenüber dem Wildtyp unverändert. Das bedeutet, die DNA-Polymerase der Plastiden wird nicht an den Plastidenribosomen, sondern an den Cytoplasmari-  
bosomen synthetisiert. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von SURZYCKI (1969). Danach wird die Plastiden-DNA-Polymerase von der Kern-DNA und nicht von der Chloroplasten-DNA codiert. Im Falle der u.v.-induzierten *Euglena*-Stämme könnte fehlende oder defekte DNA-Polymerase zu Störungen der Plastiden-DNA-Replikation und damit zu einer Ausbleichung infolge des Verlustes von Chloroplasten während der Zellteilung führen. Ähnliche Verhältnisse dürften im Falle der selektiv wirkenden Nalidixinsäure vorliegen. Dieser Inhibitor hemmt die DNA-Replikation in Bakterien und wahrscheinlich auch die Chloroplasten-DNA Replikation (LYMAN 1967), was im Falle von *Euglena* zur Ausbildung weißer Kolonien führt.

Trotz des Fehlens von Plastidenribosomen ist die albina II-Mutante zu gewissen Differenzierungsschritten ihrer Plastiden befähigt (Abb. 96, 97). So besitzt sie - wenn auch unvollständig ausgebildete - Prolamellarkörper und doppelte Plastidenhüllen. Die Plastidenhüllmembranen haben zwar auf den Elektronenmikrographien amöboide Umrisse, weil ihnen das stabilisierende Thylakoidsystem weitgehend fehlt (vgl. WILDMAN 1967), doch ist die Größe ihrer Oberflächen und die Anordnung ihrer Membra-



Abb. 97: Plastide aus einem Primärblatt der chlorophyllfreien albina II-Mutante

nen mit den Verhältnissen im Wildtyp vergleichbar. Die Entwicklung der Plastidenhüllen ist also von der Entwicklung des Thylakoidsystems unabhängig und verläuft in ribosomenfreien Plastiden normal. Demnach sollte man annehmen, daß die Membranen der Plastidenhülle an den 80 S Ribosomen des Cytoplasmas synthetisiert werden.

Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen kommt FREY-WYSSLING (1967) zu ähnlichen Ergebnissen. Er nimmt an, daß die Hüllmembranen von Plastiden cytoplasmatischer Herkunft sind. Gegen diese Interpretation könnte eingewendet werden, daß nur wenige Plastidenribosomen in der albina II-Mutante vorhanden sind, deren Menge unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Gelelektrophorese liegt. Es könnten also bei den albina II-Plastiden ähnliche Verhältnisse wie in den Leucoplasten von *Allium porrum* vorliegen, deren rRNA gelelektrophoretisch nicht nachweisbar ist (RUPPEL 1969). Gegen diese Annahme spricht allerdings, daß sich auch elektronenmikroskopisch in den Plastiden der Mutante albina II nie Ribosomen nachweisen ließen.

Ob die reduzierte Ribosomenanzahl in den Plastiden aus der xantha-Mutante und das Mißverhältnis von 23 S : 16 S rRNA der viridis I-Mutante als Ursache für die gehemmte Plastidendifferenzierung in Betracht gezogen werden kann, ist fraglich. Ebenso bleibt auch die Lokalisierung des Differenzierungsblocks der Plastiden der viridis II- und III-Mutanten rein hypothetischer Natur.

Unter ultrastrukturellen Aspekten ist anzunehmen, daß die Ontogenese der viridis III-Plastiden nach der Prolamellarkörperbildung, der xantha-Plastiden vor der Prolamellarkörperbildung und der albina-Plastiden vor oder nach der Prolamellarkörperbildung blockiert ist. Plastiden der viridis I- und II-Mutanten können - im Gegensatz zu den übrigen Mutanten - den Prolamellarkörper unter Lichteinfluß völlig in Thylakoide umbilden. Aufgrund dieser elektronenmikroskopischen Ergebnisse scheint die Blockierung der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Assimilation - mit Ausnahme der albina II-Typen - Folge einer Differenzierungsstörung in der Menge der Thylakoide oder in dem molekularen Bau der Thylakoidmembran zu

sein. Setzt man voraus, daß ein normaler Elektronentransport nur an Thylakoiden mit normaler Substruktur ablaufen kann, dann wäre im Falle der untersuchten chlorophylldefekten Plastiden - ähnlich den Verhältnissen bei *Oenothera*-Mutanten (DOLZMANN 1968) - eine 'Störung' im Elektronentransport oder im Photosystem I und II denkbar. HALLIER (1968) nimmt für Plastom-Mutationen von *Oenothera* einen Block im Elektronentransport im Bereich des Photosystems II an.

Ursache der reduzierten CO<sub>2</sub>-Assimilationen könnte in allen Mutanten - bis auf den *albina* II-Typ - primär ein reduzierter Elektronentransport in oder zwischen den Photosystemen I und II sein. Diese könnte durch einen verfrühten Abbruch der Thylakoidausbildung bzw. durch Störungen in der molekularen Struktur der Thylakoide erklärt werden. Ein genetischer Block im Enzymbesteck des reduktiven Pentosephosphatweges ist ähnlich wie bei den Plastommutanten von *Oenothera* (HALLIER und Mitarbeiter 1968) bei den Chlorophylldefektmutanten der Gerste nicht vorhanden. In diesen Mutanten scheint das normale Enzymmuster der Kontrolle mit normalen Enzymaktivitäten vorzuliegen. Nur im Falle der *albina* II-Mutante dürften neben den untersuchten Enzymen aufgrund fehlender 70 S Ribosomen alle weiteren Enzyme des Calvin-Zyklus nicht vorhanden sein.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit (Kap. III, IV, VII, VIII, IX, XII) wurde als Projekt O des Forschungsprogrammes des Sonderforschungsbereiches 160 'Eigenschaften biologischer Membranen' von der DFG unterstützt.

Literaturverzeichnis

- AKAZAWA T., SUGIYAMA T.:  
Subunit structure of carboxydismutase.  
In: XI Internat. Botanical Congress, Seattle, Washington,  
p. 1 (1969)
- AKAZAWA T., SATO K., SUGIYAMA T.:  
Structure and function of chloroplast proteins  
VIII. Some properties of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase  
of Athiorhodaceae in comparison with those of plant enzyme.  
Arch. Biochem. Biophys. 132, 255-261 (1969)
- AKOYUNOGLU G., ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J.H., GUIALI A., DASSIOU C.:  
On the relationship between ribulose diphosphate carboxylase and  
protochlorophyllide holocheome of Phaseolus vulgaris leaves.  
Plant Physiol. 45, 443-448 (1970)
- AKOYUNOGLU G., ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J.H., MICHEL-WOLWERTZ M.R.:  
Effect of intermittent and continuous light on chlorophyll for-  
mation in etiolated plants.  
Physiol. Plant. 19, 1101-1104 (1966)
- AKOYUNOGLU G., ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H.:  
CO<sub>2</sub>-assimilation by etiolated bean leaves exposed to inter-  
mittent light.  
In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2425-2436  
(1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., W. Junk N.V.  
Publishers - The Hague (1972)
- ALBERTE R.S., THORNBER J.P., NAYLOR A.W.:  
Biosynthesis of the photosystem I chlorophyll-protein complex  
in greening leaves of higher plants.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 134-137 (1973)
- ANDERSON J.M., BOARDMAN N.K.:  
Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis.  
I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles  
isolated from spinach chloroplasts.  
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 112, 403-421 (1966)
- ANDERSON L.A., SMILLIE R.M.:  
Binding of chloramphenicol by ribosomes from chloroplasts.  
Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 535-543 (1966)
- ANSTINE W., JACOBSEN I.V., SCANDALIOS J.G., VARNER I.E.:  
Deuterium oxide as a density label of peroxidases in germinating  
barley embryos.  
Plant Physiol. 45, 148-152 (1970)
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J.H., FELEKI Z., AKOYUNOGLU G.:  
Photoinduced formation of two different chlorophyll-protein  
complexes at the early stages of greening.  
In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2417-2426  
(1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
Publishers - The Hague (1972)

ARNON D.J.:

Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.  
Plant Physiol. 24, 1-15 (1949)

ARNTZEN C.J., DILEY R.A., CRANE F.L.:

A comparison of chloroplast membrane surfaces visualized by freeze-etch and negative staining techniques; and ultrastructural characterization of membrane fractions obtained from digitonin-treated chloroplasts.  
J. Cell Biol. 43, 16-31 (1969)

ATTARDI G., AMALDI F.:

Structure and synthesis of ribosomal RNA.  
Ann. Rev. Biochem. 39, 183 (1970)

BAILEY J.L., THORNER J.P., WHYBORN A.G.:

The chemical nature of chloroplast lamellae.  
In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I, T.W. Goodwin, ed.,  
Acad. Press London, New York, 243-255 (1966)

BAMJI M.S., JAGENDORF A.T.:

Amino acid incorporation by wheat chloroplasts.  
Plant Physiol. 41, 764-770 (1966)

BAR-NUN S., WALLACH D., OHAD I.:

Biogenesis of chloroplast membranes  
X. Changes in the photosynthesis: Specific activity and the relationship between the light harvesting system and photosynthetic electron transfer chain during greening of *Chlamydomonas reinhardi*  $\gamma$ -1 cells.  
Biochim. Biophys. Acta, 267, 125-137 (1972)

BARR R., CRANE F.L.:

Comparative studies on plastoquinones  
V. Changes in lipophilic chloroplast quinones during development.  
Plant Physiol. 45, 53-55 (1970)

BARTON R.:

Fine structure of mesophyll cells in senescing leaves of *Phaseolus*.  
Planta (Berl.) 71, 314-325 (1966)

BASTIA D., CHIANG K.S., SWIFT H., SIERSMA P.:

Heterogeneity, complexity, and repetition of the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardi*.  
Proc. nat. Sci. USA 68, 1157-1161 (1971)

BEER M.:

Electron microscopic determination of the length of single polynucleotide chains.  
In: Methods in Enzymology, Vol. 12B, L. Grossman and K. Moldave eds., Academic Press, N.Y. u. London, 377-379 (1968)

BENSON A.A., BASSHAM J.A., CALVIN M., GOODALE T.C., HAAS V.A., STEPKA W.:

The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products.  
Amer. Chem. Soc. 72, 1710-1718 (1950)

BENSON A.A., WINTERMANN J.F.G.M., WISER R.:  
Chloroplast lipids as carbohydrate reservoirs.  
Plant Physiol. 34, 315-317 (1959)

BENSON A.:  
Lipids of chloroplasts.  
In: Structure and Function of Chloroplasts, M. Gibbs ed.,  
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 129-148 (1971)

BIEDERMANN M., DREWS G.:  
Trennung der Thylakoidbausteine einiger Athirohodaceae durch  
Gelelektrophorese.  
Arch. Mikrobiol. 61, 48-58 (1968)

BIEHL B.:  
Verteilung membranassoziierter Proteine in Fraktionen ultra-  
schallfragmentierter Thylakoide aus Spinatchloroplasten.  
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 83, 465-470 (1970)

BIGGINS J., PARK R.B.:  
CO<sub>2</sub>-assimilation by etiolated *Hordeum vulgare* seedlings during  
the onset of photosynthesis.  
Plant Physiol. 41, 115-118 (1965)

BISALPUTA T., BISALPUTA A.A.:  
Chloroplast and mitochondrial DNA in a brown alga *Egregia  
menziesii*.  
J. Cell Biol. 33, 511-520 (1967)

BISALPUTRA T. BISALPUTRA A.A.:  
The ultrastructure of chloroplast of a brown alga *Spacelaria* sp.  
I. Plastid DNA configuration - The chloroplast genophore.  
J. Ultrastructure Res. 29, 151-170 (1969)

BISALPUTRA T., BURTON H.:  
The ultrastructure of chloroplast of a brown alga *Sphacelaria* sp.  
II. Association between the chloroplast DNA and the photosyn-  
thetic lamellae.  
J. Ultrastructure Res. 29, 224-235 (1969)

BISALPUTRA T., BISALPUTRA A.A.:  
The ultrastructure of chloroplast of a brown alga *Sphacelaria* sp.  
J. Ultrastructure Res. 32, 417-429 (1970)

BLOCH K., CONSTANTOPOULUS G., KENYON C., NAGAI J.:  
Lipid metabolism of algae in the light and in the dark.  
In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II, T.W. Goodwin, ed.,  
Acad. Press London, New York 197-211 (1967)

BOARDMAN N.K.:  
Ribosome composition and chloroplast development in *Phaseolus  
vulgaris*.  
Exptl. Cell Res. 43, 474-479 (1966)

BOARDMAN N.K.:

Protein synthesis by cell-free extracts of tobacco leaves  
III. Comparison of the physical properties and protein  
synthesizing activities of 70 S chloroplast and 80 S cyto-  
plasmic ribosomes.

J. Mol. Biol. 17, 470-489 (1966)

BOARDMAN N.K.:

Chloroplast structure and development.

In: Harvesting the sun, photosynthesis in plant life; A. San  
Pietro, F.A. Greer, T.J. Army, eds., Academic Press New York  
and London, 211-230 (1967)

BOARDMAN N.K., ANDERSON J.M.:

Studies on the greening of dark-grown bean plants.

I. Formation of chloroplasts from proplastids.

Aust. J. Biol. Sci. 17, 86-92 (1964)

BOARDMAN N.K., FRANCKI R.J.B., WILDMAN S.G.:

Protein synthesis by cell-free extracts of tobacco leaves.

J. Mol. Biol. 17, 470-481 (1966)

BOARDMAN N.K., ANDERSON J.M., KAHN A., THORNE S.W., TREFFRY T.E.:  
Formation of photosynthetic membranes during chloroplast  
development.

In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts;  
N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland  
Publishing Company Amsterdam-London, 70-84 (1970)

BOARDMAN N.K., ANDERSON J.M., HILLER R., KAHN A., ROUGHAN P.G.,  
TREFFRY T.E., THORNE S.W.:

Biosynthesis of the photosynthetic apparatus during chloroplast  
development in higher plants.

In: II Ind Internat. Congress, Stresa, 2265-2287 (1971); G. Forti,  
M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk Publishers, The Hague  
(1972)

BOTTOMLEY W.:

Deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase  
activity of nuclei and plastids from etiolated peas and their  
response to red and far red light in vivo.

Plant Physiol. 45, 608-611 (1970)

BOGORAD L.:

Biosynthesis and morphogenesis in plastids.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II, T.W. Goodwin, ed.,  
Acad. Press London, New York, 615-631 (1967)

BOGORAD N.K., LABER L., GASSMAN M.:

Aspects of chloroplast development: Transitory pigment-protein  
complexes and protochlorophyllide regeneration.

Biochem. Biophys. Communications, 299-312 (1968)

BOGORAD L., FLAK R.H., FORGER J.M., LOCKSHIN A.:

Properties of etioplast membranes and membrane development in  
maize.

In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts;  
N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland  
Publishing Company Amsterdam-London, 85-91 (1970)

BOGORAD L., WOODCOCK C.L.F.:

Rifamycins: The inhibition of plastid RNA synthesis in vivo and in vitro and variable effects on chlorophyll formation in maize leaves.

In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 92-97 (1970)

BOURDU R., BRANGEON J., COSTES C., BAZER R.:

Ultrastructure and molecular composition of membranes in dimorphic chloroplasts of *Zea mays*.

In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 1471-1479 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague (1972)

BOYNTON J.E., GILLHAM N.W., BURKHOLDER B.:

Mutations altering chloroplasts ribosome phenotype in *Chlamydomonas*.

II. A new Mendelian mutation.

Proc. Nat. Acad. Sciences, 67, 1505-1512 (1970)

BRADBEER J.W.:

Plastid development in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*.  
J. Exper. Botany 22, 382-390 (1971)

BRADBEER J.W., IRELAND H.M.M., GYLDENHOLM A.O., HASLETT B.G., MURRAY D.R., WHATLEY F.R.:

The biosynthesis of the enzymes of the photosynthetic carbon cycle in *Phaseolus vulgaris*.

In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2383-2389 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague (1972)

BRAUNITZER G., BAUER-STÄB G.:

Analytical characterisation and preparative isolation of the proteins of chloroplast lamellae.

Progress in Photosynthesis Res. I, 179-185 (1969)

BROCK T.D.:

Chloramphenicol.

Bacteriol. Res. 25, 32-48 (1961)

BROWN G.L.:

Preparation, fractionation, and properties of sRNA.

Progr. Nucl. Acid Res. 2, 259 (1963)

BROWN D.D., LITTNA E.:

RNA synthesis during the development of *Xenopus laevis*, the South African clawed toad.

J. Mol. Biol. 8, 669 (1964)

BROWN R.D., BASTIA D., HASELKORN R.:

Effect of Rifampicin on transcription in chloroplasts of *Euglena*.  
Le Petit Colloquium on Biology and Medicine 1. RNA-polymerase and transcription, L. Silvester ed., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 309-328 (1970)

BROWN F.A.M., GUNNING B.E.S.:

Distribution of ribosome-like particles in Avena plastids.  
In: Biochemistry of Chloroplast, Vol. I, T.W. Goodwin, ed.,  
Acad. Press London, New York, 365-373 (1966)

BROWNLEE G.G.:

Sequence of 6 S RNA of E. coli.  
Nature New Biol. 229, 147-148 (1971)

BURTON W.G.:

Dihydrospectinomycin binding to chloroplast ribosomes from  
antibiotic-sensitive and resistant strains of Chlamydomonas  
rheinhardtii.  
Biochim. Biophys. Acta 272, 305-311 (1972)

BUTLER W.L.:

Chloroplast development: energy transfer and structure.  
Arch. Biochim. Biophys. 92, 287-295 (1961)

BUTLER W.L.:

Development of photosynthetic systems I and II in a greening leaf.  
Biochim. Biophys. Acta 102, 1-8 (1961)

BUTLER W.L., BRIGGS W.R.:

The relation between structure and pigments during the first  
stages of proplastid greening.  
Biochim. Biophys. Acta 112, 45-53 (1966)

BUTLER W.L., de GREEF J., ROTH T.F., OELZE-KAROW H.:

The influence of carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone and  
3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea on the fusion of primary  
thylakoids and the formation of crystalline fibrils in bean  
leaves partially greened in far red light.  
Plant Physiol. 49, 102-104 (1972)

CAIRNS J.:

A minimum estimate for the length of the DNA of Escherichia  
coli obtained by autoradiography.  
J. Mol. Biol. 4, 407-409 (1962)

CAIRNS J.:

The bacterial chromosome and its manner of replication as seen  
by autoradiography.  
J. Mol. Biol. 6, 208-213 (1963)

CAVALIERI L.F., NEMEHIN R.G.:

The mode of interaction of actinomycin D with deoxyribonucleic  
acid.  
Biochim. Biophys. Acta 87, 641-652 (1964)

CHAN P.-H., WILDMAN S.G.:

Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large  
subunit of Fraction I protein.  
Biochim. Biophys. Acta 277, 677-680 (1972)

CHATTORAJ D.K.:

Isolation of high molecular weight DNA from amphibian erythrocytes.  
Biochim. Biophys. Acta 240, 353-357 (1971)

CHEN J.L., WILDMAN S.G.:

"Free" and membrane-bound ribosomes and nature of products formed by isolated tobacco chloroplasts incubated for protein synthesis.

Biochim. Biophys. Acta 209, 207-219 (1970)

CHEN S., McMAHON D., BOGORAD L.:

Early effects of illumination on the activity of some photosynthetic enzymes.

Plant Physiol. 42, 1-5 (1967)

CHIANG K.S., SUEOKA N.:

Replication of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* during vegetative cell cycle: its mode and regulation.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 1506-1513 (1967)

CHUNG E.H.L., VAUGHAN M.H. jr., RICH A.:

The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations.

J. Mol. Biol. 7, 130-141 (1963)

CLARK D.J.:

The regulation of DNA replication and cell division in *E. coli* B/r.

In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 33, 823-838 (1968)

COOK T.M., BROWN K.G., BOYLE J.V., GOSS W.A.:

Bactericidal action of nalidixic acid on *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol. 92, 1510-1514 (1966)

CRANE F.L., HENNINGER M.D., WOOD P.M., BARR R.:

Quinones in chloroplasts.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I, T.W. Goodwin, ed., Acad. Press London, New York, 134-151 (1966)

CRANE F.L., ARNTZEN C.J., HALL J.D., RUZICKA F.J., DILLEY R.A.:

Binary membranes in mitochondria and chloroplasts.

In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts, N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.W. Smillie, eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 53-69 (1970)

CRIDDLE R.S.:

Protein and lipoprotein organization in the chloroplast.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I, T.W. Goodwin, ed., Acad. Press London, New York, 204-231 (1966)

COMB D.G., KATZ S.:

Studies on the biosynthesis and methylation of transfer RNA.

J. Mol. Biol. 8, 790 (1964)

COMB D.G., KATZ S., BRANDA R., PINZINO Ch.J.:

Characterization of RNA species synthesized during early development of sea urchins.

J. Mol. Biol. 14, 195-213 (1965)

COMB D.G., SARKAR N., DEVALLET J., PINZINO C.J.:  
Properties of transfer-like RNA associated with ribosomes.  
J. Mol. Biol. 12, 509 (1965)

DAHLBERG A.E., DINGMAN C.W., PEACOCK A.C.:  
Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in  
agaroseacrylamide gels.  
J. Mol. Biol. 41, 139-148 (1969)

DAHLBERG A.E., PEACOCK A.:  
Studies of 16 and 23 S ribosomal RNA of Escherichia coli using  
composite gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. 55, 61-74 (1971)

DANON D., MARIKOSKY Y., LITTAUER U.Z.:  
A comparative electron microscopical study of RNA from  
different sources.  
J. Biophys. Biochem. Cytology 9, 253-261 (1961)

de GREEF J., BUTLER W.L., ROTH T.F.:  
Grenning of etiolated bean leaves in far-red light.  
Plant physiol. 47, 457-464 (1971)

DEMUS H., MEHL E.:  
The protein component of the erythrocyte membrane and their  
molecular weight.  
Biochim. Biophys. Acta 203, 291-297 (1970)

van DEENEN L.L.M. HAVERKATE F.:  
Chemical characterization of phosphatidylglycerol from photo-  
synthetic tissues.  
In: Biochemistry of Chloroplast, Vol. I, T.W. Goodwin, ed.,  
Acad. Press London, New York, 118-131 (1966)

DEZELEE S., SENTENAC A., FROMAGEOT P.:  
Study on yeast RNA polymerase. Effect of  $\alpha$ -Amanitin and  
Rifampicin.  
FEBS Letters 7, 220-222 (1970)

DOERFLER W., KLEINSCHMIDT A.K.:  
Denaturation pattern of the DNA of Adenovirus type 2 as  
determined by electron microscopy.  
J. Mol. Biol. 50, 579-593 (1970)

DOLZMANN P.:  
Photosynthese in Reaktionen einiger Plastom-Mutanten  
III. Strukturelle Aspekte.  
Z. Pflanzenphysiol. 58, 300-309 (1968)

DORNER R.W., KAHN A., WILDMAN S.G.:  
Proteins of green leaves.  
III. Distribution of Fraction I protein in the plant kingdom  
as detected by precipitin and ultracentrifuge analysis.  
Biochim. Biophys. Acta 29, 240-245 (1958)

DREWS G., LAMPE H.H.:

The differentiation of the intracytoplasmic membrane system of *Rhodospseudomonas capsulata*.

In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2715-2719 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague (1972)

DREWS G., LEUTIGER I., LADWIG R.:

Production of protochlorophyll, protopheophytin, and bacteriochlorophyll by mutant A 1a of *Rhodospseudomonas capsulata*.

Arch. Mikrobiol. 76, 349-363 (1971)

DRUM R.W.:

Light and electron microscope observation on the tube-dwelling diatom *Amphipleura rutilans* (Trentepohlia) cleve.

J. Phycol. 5, 21-26 (1969)

DRUMM H.W., MARGULIES M.M.:

In vitro protein synthesis by plastids of *Phaseolus vulgaris*.

IV. Amino acid incorporation by etioplasts and effect of illumination of leaves on incorporation by plastids.

Plant Physiol. 45, 435-442 (1970)

DYER T.A., LEECH R.M.:

Chloroplast and cytoplasmic low-molecular-weight ribonucleic acid, components of the leaf of *Vicia faba* L.

Biochim. J. 106, 689-698 (1968)

DYER T.A., MILLER R.H., GREENWOOD A.D.:

Leaf nucleic acids. I. Characteristics and role in the differentiation of plastids.

J. Exper. Bot. 22, 125-136 (1971)

EDELMAN M., COWAN C.A.; EPSTEIN H.T., SCHIFF J.A.:

Studies of chloroplast development in *Euglena*. VIII. Chloroplast-associated DNA.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 52, 1214-1219 (1964)

EILAM Y., KLEIN S.:

Effect of light intensity and sucrose on plastid structure and chlorophyll content.

J. Cell. Biol. 14, 169-182 (1962)

ERICKSON H., BEER M.:

Electron microscopic study of the base sequence in nucleic acids.

Biochemistry 6, 2694-2700 (1967)

ERIKSSON G., KAHN A., WALLEB B., v. WETTSTEIN D.:

Zur makromolekulären Physiologie der Chloroplasten III.

Ber. deutsch. Botan. Ges. 74, 221-232 (1961)

EVANS W.R., SMILLIE R.M.:

Inhibition of light-dependence of chloroplasts by 5-fluorouracil.

J. Exper. Bot. 22, 371-381 (1971)

FALK H.:

Rough thylakoids: polysomes attached to chloroplast membranes.  
J. Cell Biol. 42, 582-287 (1969)

FILNER B., KLEIN A.O.:

Changes in enzymatic activities in etiolated bean seedling leaves after a brief illumination.  
Plant Physiol. 43, 1587-1596 (1968)

FILNER P., VARNER J.E.:

A test for de novo synthesis of enzymes: Density labeling with  $H_2O^{18}$  of barley amylase induced by gibberellic acid.  
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 58, 1520-1526 (1967)

FEIERABEND J., PIRSON A.:

Die Wirkung des Lichtes auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen.  
Z. Pflanzenphysiol. 55, 235-245 (1966)

FEIERABEND J.:

Enzymbildung in Roggenkeimlingen während der Umstellung von heterotrophem auf autotrophes Wachstum.  
Planta 71, 326 (1966)

FREY-WYSSLING A.:

The organelles of the cell, their comparative ultrastructure and physiology.  
Aust. J. Sci. 29, 458 (1967)

GALIBERT F., LELONG J.C., LARSEN C.J., BOIRON M.:

Position of 5 S RNA among cellular ribonucleic acids.  
Biochim. Biophys. Acta 142, 89 (1967)

GALIBERT F., ELADARI M.E., HAMPE A., BOIRON M.:

Maturation et intégration du RNA 5 S au cours de la biosynthèse de la particule ribosomale 50 S.  
Eur. J. Biochem. 13, 281-288 (1970)

GALIBERT F., LARSEN C.J., LELONG J.C., BOIRON M.:

RNA of low molecular weight in ribosomes of mammalian cells.  
Nature 207, 1039 (1965)

GALLING G.:

Zur Synthese und Basenzusammensetzung der transfer-like RNA in Chlorella.  
Naturwissenschaften 54, 20 (1967)

GASSMAN M., BOGORAD L.:

Control of chlorophyll production in rapidly greening bean leaves.  
Plant Physiol. 42, 774-780 (1967)

GASSMAN M., BOGORAD L.:

Studies on the regeneration of protochlorophyllide after brief illumination of etiolated bean leaves.  
Plant Physiol. 42, 781-784 (1967)

GOODCHILD P.J., PARK R.B.:  
Further evidence for stroma lamellae as a source of photosystem I Fractions from spinach chloroplasts.  
Biochim. Biophys. Acta 226, 393-399 (1971)

GOODENOUGH U.W.:  
The effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on chloroplast structure and function in wild-type *Chlamydomonas reinhardi*.  
J. Cell Biol. 50, 35-49 (1971)

GOODENOUGH U.W., LEVINE R.P.:  
The effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the recovery of chloroplast ribosomes, membran organization, and photosynthetic electron transport in the ac-20 strain of *Chlamydomonas reinhardi*.  
J. Cell Biol. 50, 50-62 (1971)

GOODENOUGH U.W., STAEBLIN L.A.:  
Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membranes. Freeze-etch electron microscopy of wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas*.  
J. Cell Biol. 48, 594-619 (1971)

GOODENOUGH U.W., TOGASAKI R.K., PASZEWSKI A., LEVINE R.P.:  
Inhibition of chloroplast ribosome formation by gene mutation in *Chlamydomonas reinhardi*.  
In: *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*; N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 224-234 (1970)

GOODWIN T.W.:  
Terpenoids and chloroplast development.  
In: *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. II, T.W. Goodwin, ed., Acad. Press London, New York, 721-733 (1967)

GRANICK S.:  
Magnesium porphyrins formed by barley seedlings treated with aminolevulinic acid.  
Plant Physiol. 34 (Suppl.): XVIII (1959)

GRANICK S.:  
The induction in vitro of the synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria. A response to certain drugs, sex hormones and foreign chemicals.  
J. Biol. Chem. 241, 1359-1375 (1966)

GRANICK S.:  
The heme and chlorophyll biosynthetic chain.  
In: *Biochemistry of Chloroplasts*; T.W. Goodwin, ed., Vol. II, Academic Press, New York, 373-410 (1967)

GRANICK S., GASSMAN M.:  
Rapid regeneration of protochlorophyllide.  
Plant Physiol. 45, 201-205 (1970)

GRANBOULAN N., SCHERRER K.:

Visualisation in the electron microscope and size of RNA from animal cells.

European J. Biochem. 9, 1-20 (1969)

GRAY P.N., MONIER R.:

Formation of a complex between 23 S RNA, 5 S RNA and proteins from *Escherichia coli* 50 S ribosomal subunits.

FEBS Letters 18, 145-153 (1971)

GREEN B.R., BURTON H., HEIPORN V., LIMBOSCH S.:

The cytoplasmic DNA's of *Acetabularia mediterranea*: their structure and biological properties.

In: *Biology of Acetabularia*; J. Brachet, S. Bonnotto, eds., Academic Press, New York, London, 35-59 (1970)

GREGORY P., BRADBEER J.W.:

Plastid development in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*: The light-induced development of the chloroplast cytochromes.

*Planta* (Berl.) 109, 317-326 (1973)

GUNNING B.E.S.:

The fine structure of chloroplast stroma following aldehyde osmium-tetroxide fixation.

*J. Cell Biol.* 24, 79-93 (1965)

GUNNING B.E.S., JAGOE M.P.:

The prolamellar body.

In *Biochemistry of chloroplasts*, Vol. II; T.W. Goodwin, ed., Acad. Press London, New York, 655-676 (1967)

GUNNING B.E.S., STEER M.W., COCHRANE M.P.:

Occurrence, molecular structure and induced formation of the stromacentre in plastids.

*J. Cell Sci.* 3, 445-456 (1968)

HADZIYEV D., MEHTA S.L., ZALIK S.:

Studies on the ribonucleic acid from wheat leaves and chloroplasts.

*Plant Physiol.* 13, 229-237 (1968)

HALLIER, U.W.:

Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von *Oenothera*. II. Die Bildung von ATP und NADPH.

*Z. Pflanzenphysiol.* 58, 289-299 (1968)

HALLIER U.W., HEBBER U., STUBBE W.:

Photosynthese-Reaktion einiger Plastom-Mutanten.

I. Der reduktive Pentosephosphatzyklus.

*Z. Pflanzenphysiol.* 58, 222-239 (1968)

HARTMANN G, HONIKEL K.O., KNÜSEL F., NÜSCH J.:

The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin.

*Biochim. Biophys. Acta* 145, 843-854 (1967)

HENDRICKS S.B., BORTHWICK H.A.:

The function of phytochrome in regulation of plant growth.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 2125-2130 (1967)

HASELKORN R., FERNANDEZ-MORAN H., KIERAS F.J., van BRUGGEN E.F.J.:

Electron microscopic and biochemical characterization of  
Fraction I protein.

Scienc. 150, 1598-1601 (1965)

HEBER U., PON N.G., HEBER M.:

Localisation of carboxydismutase and triosephosphate dehydro-  
genase in chloroplasts.

Plant Physiol. 38, 355-360 (1963)

HERMANN R.G.:

Are chloroplasts polyploid?

Expt. Cell Res. 55, 414-416 (1968)

HERMANN R.G.:

Do chromoplasts contain DNA?

II. The isolation and characterization of DNA from chromoplasts,  
chloroplasts, mitochondria, and nuclei of Narcissus.

Protoplasma 74, 7-17 (1972)

HENNINGSEN K.W.:

An action spectrum for vesicle dispersal in bean plastids.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II; T.W. Goodwin, ed.,  
Acad. Press London, New York, 453-457 (1967)

HENNINGSEN K.W., BOYNTON J.E.:

Macromolecular physiology of plastids

VI. Changes in the membrane structure associated with shifts  
in the absorption maxima of the chlorophyllous pigments.

J. Cell Sci. 7, 587-621 (1970)

HENNINGSEN K.W., BOYNTON J.E.:

Macromolecular physiology of plastids

VII. The effect of a brief illumination on plastids of dark-  
grown barley leaves.

J. Cell Sci. 5, 757-793 (1969)

HENNINGSEN K.W., BOYNTON J.E.:

Macromolecular physiology of plastids

VIII. Pigment and membrane formation in plastids of barley  
greening under low light intensity.

J. Cell Biol. 44, 290-304 (1970)

HERRMANN F.:

Chloroplast lamellar proteins of the plastid mutant:

viridis-1 of Antirrhinum majus having impaired photosystem II.

Exptl. Cell Res. 70, 452-453 (1972)

HERRMANN R.G.:

Multiple amounts of DNA related to the size of chloroplasts.

Planta (Berl.) 90, 80-96 (1970)

- HIGHTON P.J., BEER M.:  
An electronmicroscopic study of extended single polynucleotide chains.  
J. Mol. Biol. 7, 70-77 (1963)
- HIRVONEN A.P., PRICE C.A.:  
Chloroplast ribosomes in the proplastids of *Euglena gracilis*.  
Biochim. Biophys. Acta 232, 696-704 (1971)
- HOLLOWINSKY A.W., SCHIFF J.A.:  
Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts.  
Plant Physiol. 45, 339-347 (1970)
- HOMANN P.H., SCHMID G.H.:  
Photosynthetic reactions of chloroplasts with unusual structures.  
Plant Physiol. 42, 1619-1632 (1967)
- HOOBER J.K.:  
A major polypeptide of chloroplast membranes of *Chlamydomonas reinhardi*.  
J. Cell Biol. 52, 84-96 (1972)
- HOOBER J.K., BLOBEL G.:  
Characterization of the chloroplastic and cytoplasmic ribosomes of *Chlamydomonas reinhardi*.  
J. Mol. Biol. 41, 121-138 (1969)
- HU A.S., BOCK M., HALVORSON H.O.:  
Separation of labelled and unlabelled proteins by equilibrium density gradient sedimentation.  
Anal. Biochem. 4, 489-504 (1962)
- HUBERMAN J.A.:  
Visualizations of replicating mammalian and T4 bacteriophage DNA.  
In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 33, 509-524 (1968)
- HUDSON B., CLAYTON D.A., VINOGRAD J.:  
Complex mitochondrial DNA.  
In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 33, 435-442 (1968)
- INGLE J.:  
The effect of light and inhibitors on chloroplast and cytoplasmic RNA Synthesis.  
Plant Physiol. 43, 1850-1854 (1968)
- INGLE J., WELLS R., POSSINGHAM J.V., LEAVER C.J.:  
The origins of chloroplast ribosomal-RNA.  
In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts; N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 393-401 (1970)
- INMAN R.B.:  
Some factors affecting electron microscopic length of deoxyribonucleic acid.  
J. Mol. Biol. 25, 209-216 (1967)

- van ITERSOM W., GROEN J.B.:  
DNA-membrane complexes of *Bacillus subtilis*.  
*J. Cell Biol.* 49, 553-560 (1971)
- JACOB F., RYTER A., CUZIN F.:  
On the association between DNA and membrane in bacteria.  
*Proc. Roy. Soc., Ser. B* 164, 267-278 (1966)
- JARRY B., ROSSET R.:  
Heterogeneity of 5 S RNA in *Escherichia coli*.  
*Molec. Gen. Genetics* 113, 43-50 (1971)
- JOHNSON M.W., HILLS G.J.:  
Electron microscopy of turnip yellow mosaic virus ribonucleic acid.  
*Virology* 21, 517-520 (1963)
- JORDAN B.R.:  
Studies on 5 S RNA conformation by partial ribonuclease hydrolysis.  
*J. Mol. Biol.* 55, 423-439 (1971)
- JORDAN B.R., FORGET B.G., MONIER R.:  
A low molecular weight ribonucleic acid synthesized by *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol: characterization and relation to normally synthesized 5 S ribonucleic acid.  
*J. Mol. Biol.* 55, 407-421 (1971)
- JORDAN B.R., MONIER R.:  
5 S RNA Molecules formed by reassociation of separated fragments.  
*J. Mol. Biol.* 59, 219-222 (1971)
- JORDAN B.R., FEUNTEUN J., MONIER R.:  
Identification of a 5 S RNA precursor in exponentially growing *Escherichia coli* cells.  
*J. Mol. Biol.* 50, 605-615 (1970)
- KAHN A.:  
Developmental physiology of bean leaf plastids.  
II. Negative contrast electron microscopy of tubular membranes in prolamellar bodies.  
*Plant Physiol.* 43, 1769-1780 (1968)
- KAHN A.:  
Developmental physiology of bean leaf plastids.  
III. Tube transformation and protochlorophyllide photoconversion by flash irradiation.  
*Plant Physiol.* 43, 1781-1785 (1968)
- KANNANGARA G.C.:  
The formation of ribulose diphosphate carboxylase protein during chloroplast development in barley.  
*Plant Physiol.* 44, 1533-1537 (1969)
- KAWASHIMA N.:  
Comparative studies on Fraction I protein from spinach and tobacco leaves.  
*Plant and Cell Physiol.* 10, 31-40 (1969)

KAWASHIMA N., WILDMAN S.G.:

Studies on Fraction I protein.

I. Effect of crystallization of Fraction I protein from tobacco leaves on ribulose diphosphate carboxylase activity. Biochim. Biophys. Acta 229, 240-249 (1971)

KAWASHIMA N., WILDMAN S.G.:

Studies on Fraction I proteins.

II. Comparison of physical, chemical, immunological and enzymatic properties between spinach and tobacco Fraction I proteins.

Biochim. Biophys. Acta 229, 749-760 (1971)

KAWASHIMA N., KWOK S.Y., WILDMAN S.G.:

Studies on Fraction I Protein.

III. Comparison of the primary structure of the large and small subunits obtained from five species of Nicotiana.

Biochim. Biophys. Acta 236, 578-586 (1971)

KERSTEN H.:

Interaction of actinomycin C with constituents of nucleic acids.

Biochim. Biophys. Acta 47, 610-611 (1961)

KERSTEN W., KERSTEN H., SZYBALSKI W.:

Physicochemical properties of complexes between deoxyribonucleic acid and antibiotics which affect ribonucleic acid synthesis (actinomycin, daunomycin, cinerubin, nogalamycin, chromomycin, mithramycin, and olivomycin).

Biochemistry 5, 236-244 (1966)

KIERAS F.J., HASELKORN R.:

Properties of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase (carboxy-dismutase) from chinese cabbage and photosynthetic micro-organism.

Plant Physiol. 43, 1264-1270 (1968)

KIRBY K.S.:

Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid.

Biochim. J. 96, 266-269 (1965)

KIRBY K.S., FOX-CARTER E., GUEST M.:

Isolation of desoxyribonucleic acid and ribosomal ribonucleic acid from bacteria.

Biochem. J. 104, 258-268 (1967)

KIRK J.T.O.:

The deoxyribonucleic acid of broad bean.

Biochim. Biophys. Acta 76, 417-424 (1963)

KIRK J.T.O.:

Nature and function of chloroplast DNA.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I; T.W. Goodwin, ed., Acad. Press, London, New York, 319-340 (1966)

KIRK J.T.O.:

Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in *Euglena gracilis*, together with a nomogram for determination of chlorophyll concentration.

Planta (Berl.) 78, 200-207 (1968)

KIRK J.T.O.:

The ultrastructure of the chromoplasts of different colour varieties of *Capsicum*.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II; T.W. Goodwin, ed., Acad. Press London, New York, 691-701 (1967)

KIRK J.T.O.:

The genetic control of plastid formation: Recent advances and strategies for the future.

Sub-Cell. Biochem. 1, 333-361 (1972)

KIRK J.T.O.:

Structure and development of the chloroplast thylakoid membrane system.

In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2333-2347 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague (1972)

KIRK J.T.O., ALLEN R.L.:

Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 523-530 (1965)

KIRK J.T.O., PYLIOTIS N.A.:

Attempts to detect succinyl-CoA synthetase in chloroplasts.

Z. Pflanzenphysiol. 66, 325-336 (1972)

KIRK J.T.O., TILNEY-BASSETT R.A.E.:

The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance.

W.H. Freeman and Co., London and San Francisco (1967)

KISSELEV N.A., GAVRILOVA L.P., SPIRIN A.S.:

On configuration of high-polymer ribonucleic acid macromolecules as revealed by electron microscopy.

J. Mol. Biol. 3, 778-783 (1963)

KLEIN S., BRYAN G., BOGORAD L.:

Early stages in the development of plastid fine structure in red and far-red light.

J. Cell Biol. 22, 433-442 (1964)

KLEIN S., POLFAKOFF-MAYBER A.:

Fine structure and pigment conversion in isolated etiolated proplastids.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 433-440 (1961)

KLEIN S., SCHIFF J.A.:

The correlated appearance of prolamellar bodies, protochlorophyll(ide) species, and the Shibata shift during development of bean etioplast in the dark.

Plant Physiol. 49, 619-626 (1972)

KLEIN S., SCHIFF J.A., HOLOWINSKY A.W.:  
Events surrounding the early development of Euglena chloroplasts.  
2. Normal development of fine structure and the consequences  
of preillumination.  
Plant Physiol. 45, 339-347 (1971)

KLEINHOF S A., SHUMWAY L.K.:  
Correlation of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase activity  
with chlorophyll content and ultrastructure in induced mutants  
of Hordeum vulgare.  
Biochem. Genetics 3, 485-492 (1969)

KLEINHOF S A., SHUMWAY L.K., SIDERIS E.G.:  
Biochemical and ultrastructural characterization of chlorophyll-  
deficient barley mutants.  
Barley Genetics II, 194-200 (1970)

KLEINIG H., WRISCHER M.:  
Die Feinstruktur von Acetabularia-Chloroplasten bei Sekundär-  
carotinoidbildung.  
Z. Pflanzenphysiol. 58, 248-251 (1968)

KLEINKOPF G.E., HUFFAKER R.C., MATHESON A.:  
Light-induced de novo synthesis of ribulose 1,5-diphosphate  
carboxylase in greening leaves of barley.  
Plant Physiol. 46, 416-418 (1970)

KLEINKOPF G.E., HUFFAKER R.C., MATHESON A.:  
A simplified purification and some properties of ribulose  
1,5-diphosphate carboxylase from barley.  
Plant Physiol. 46, 204-207 (1970)

KLEINSCHMIDT A.K.:  
Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid  
molecules.  
In: Methods in Enzymology, Academic Press, New York, London,  
Vol. 12, 361-377 (1968)

KLEINSCHMIDT A.K., LANG D.:  
Intrazelluläre Desoxyribonukleinsäure von Bakterien.  
In: Electron Microscopy; S.S. Breese jr., ed., Academic Press,  
New York, London, Vol. 2, 0-8 (1962)

KLEINSCHMIDT A.K., LANG D., JACHERTS D., ZAHN R.:  
Darstellung und Längenmessung des gesamten Desoxyribonuklein-  
säure-Inhaltes von T2-Bakteriophagen.  
Biochim. Biophys. Acta 61, 857-864 (1962)

KORTSCHAK H.P., HARTT C.E., BURR G.O.:  
Carbon dioxide fixation in sugar cane leaves.  
Plant Physiol. 45, 515-516 (1965)

KOSKI V.M.:  
Chlorophyll formation in seedlings of Zea mays L.  
Arch. Biochem. Biophys. 29, 339-343 (1950)

KOWALLIK K.V., HERRMANN R.G.:  
Do chromoplasts contain DNA?  
I. Electron-microscopic investigation of Narcissus chromoplasts.  
Protoplasma 74, 1-6 (1972)

KREUTZ W.:  
Strukturuntersuchungen an Plastiden.  
V. Bestimmung der Elektronendichte-Verteilung längs der  
Flächennormalen im Thylakoid der Chloroplasten.  
Z. Naturforsch. 18b, 1098-1104 (1963)

KREUTZ W.:  
Strukturuntersuchungen an Plastiden.  
VI. Über die Struktur der Lipoproteinlamellen in Chloroplasten  
lebender Zellen.  
Z. Naturforsch. 19b, 441-446 (1964)

KREUTZ W.:  
Structural principles of biomembranes.  
Angew. Chemie internat. Edit. 11, 551-651 (1972)

KREUTZ W., MENKE W.:  
Strukturuntersuchungen an Plastiden.  
III. Röntgenographische Untersuchungen an isolierten Chloro-  
plasten und Chloroplasten lebender Zellen.  
Z. Naturforsch. 17b, 675-683 (1962)

LAETSCH W.M.:  
Chloroplast structural relationship in leaves of C<sub>4</sub> plants.  
In: Photosynthese and photorespiration; M.D. Hatch, C.B. Osmond,  
R.O. Slayter, eds., Wiley-Interscience, New York, 323-349 (1971)

LAETSCH W.M., KORTSCHAK H.P.:  
Chloroplast structure and function in tissue cultures of a C<sub>4</sub>  
plant.  
Plant Physiol. 49, 1021-1023 (1972)

LAGOUTTE B., DURANTON J.:  
Physico-chemical study of plastidial structure proteins from  
Zea mays L.  
In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 1575-  
1582 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
N.V. Publishers - The Hague (1972)

LANG D., BUJARD H., WOLFF B., RUSSELL D.:  
Electron microscopy of size and shape of viral DNA in solutions  
of different ionic strengths.  
J. Mol. Biol. 23, 163-181 (1967)

LANGENBACH R.J., KNOCH H.W.:  
Phospholipids in the uredospores of Uromyces phaseoli.  
I. Identification and localization.  
Plant Physiol. 48, 728-734 (1971)

LANGENBACH R.J., KNOCH H.W.:  
Phospholipids in the uredospores of Uromyces phaseoli.  
II. Metabolism during germination.  
Plant Physiol. 48, 735-739 (1971)

LATZKO E., GIBBS M.:

Distribution and activity of enzymes of the reductive pentose phosphate cycle in spinach leaves and in chloroplasts isolated by different methods.

Z. Pflanzenphysiol. 59, 184-194 (1968)

LEECH R.M.:

Comparative biochemistry and comparative morphology of chloroplasts isolated by different methods.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I; T.W. Goodwin, ed., Acad. Press London, New York, 66-74 (1966)

LEECH R.M., DYER T.A.:

The ribonucleic acids of the chloroplasts of *Vicia faba* L.

Progress in Photosynthesis Research, Vol. I, 359-367 (1969)

LEWICKI P., SINSKEY A.K.:

Precision of RNA separation by polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochemistry 33, 273-278 (1970)

LICHTENTHALER H.-K.:

Untersuchungen über die osmiophilen Globuli der Chloroplasten.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 77, 398-402 (1964)

LICHTENTHALER H.-K.:

Plastoglobuli und Plastidenstruktur.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 79, 82-88 (1966)

LICHTENTHALER H.-K.:

Beziehungen zwischen Zusammensetzung und Struktur der Plastiden in grünen und etiolierten Keimlingen von *Hordeum vulgare* L.

Z. Pflanzenphysiol. 56, 273-281 (1967)

LICHTENTHALER H.-K.:

Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe und Zusammensetzung während der Chloroplastendegeneration.

Protoplasma 68, 315-326 (1969)

LICHTENTHALER H.-K.:

Zur Synthese der lipophilen Plastidenchinone und Sekundär-carotinoide während der Chromoplastenentwicklung.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 483-497 (1969)

LICHTENTHALER H.-K.:

Light-stimulated synthesis of plastid quinones and pigments in etiolated barley seedlings.

Biochim. Biophys. Acta 184, 164-172 (1969)

LICHTENTHALER H.-K.:

Localization and functional concentrations of lipo-quinones in chloroplasts.

Progress in Photosynthesis Research I, 304-314 (1969)

LICHTENTHALER H.-K.:

Die Lokalisation der Plastidenchinone und Carotinoide in den Chromoplasten der Petalen von *Sarothamnus scoparius* (L) Wimm ex Koch.

Planta (Berl.) 90, 142-152 (1970)

LICHTENTHALER H.-K., BECKER K.:  
Changes of the plastidquinone and carotinoid metabolism  
associated with the formation of functioning chloroplasts in  
continous far-red and white light.  
In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2451-  
2459 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
Publishers - The Hague (1972)

LICHTENTHALER H.-K., PARK R.B.:  
Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach.  
Nature 198, 1070-1072 (1963)

LICHTENTHALER H.-K., SPREY B.:  
Über die osmiophilen globulären Lipideinschlüsse der Chloro-  
plasten.  
Z. Naturforsch. 21b, 690-697 (1966)

LICHTENTHALER H.-K., WEINERT H.:  
Die Beziehungen zwischen Lipochinonsynthese und Plastoglobuli-  
bildung in den Chloroplasten von *Ficus elastica* Roxb.  
Z. Naturforsch. 25b, 619-623 (1970)

LJUBESIC N.:  
Feinbau der Chloroplasten während der Vergilbung und Wieder-  
ergrünung der Blätter.  
Protoplasma 66, 369-379 (1968)

LOENING U.E.:  
The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid  
by polyacrylamide-gel electrophoresis.  
Biochem. J. 102, 251-257 (1967)

LOENING U.E., INGLE J.:  
Diversity of RNA components in green plant tissue.  
Nature 215, 363-367 (1967)

LOENING U.E.:  
Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution.  
J. Mol. Biol. 38, 355-365 (1968)

LOWRY O.H., ROSEBROUGHT N.J., FARR A.C., RANDALL R.J.:  
Protein measurement with folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

LÜRSEN K.:  
Volumen, Trockengewicht und Zusammensetzung von Etioplasten  
und ihren Ergrünungsstadien.  
Z. Naturforsch. 25b, 1113-1119 (1970)

LÜRSEN K.:  
Zur Lokalisierung der Proteinsynthese bei der Entwicklung des  
Lamellarsystems ergrünender Etioplasten.  
Z. Naturforsch. 26b, 725-729 (1971)

LYMAN H.:  
Specific inhibition of chloroplast replication in *Euglena*  
*gracilis* by nalidixic acid.  
J. Cell Biol. 35, 726-730 (1967)

LYTTLETON J.W.:

Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts.  
Exp. Cell Res. 26, 312-317 (1962)

MACHATTIE, BERNIS K.J., THOMAS C.A. jr.:

Electron microscopy of DNA from Hemophilus influenzae.  
J. Mol. Biol. 11, 648-649 (1965)

MACHOLD O.:

Lamellar proteins of green and chlorotic chloroplasts as  
affected by iron deficiency and antibiotics.  
Biochim. Biophys. Acta 238, 324-331 (1971)

MACKENDER R.O., LEECH R.M.:

The isolation and characterization of plastid envelope membranes.  
In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 1431-  
1440 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
N.V. Publishers - The Hague (1972)

MacKINNEY G.:

Absorption of light by chlorophyll solutions.  
J. Biol. Chem. 140, 315-322 (1941)

MANNING J.E., RICHARDS O.C.:

Isolation and molecular weight of circular chloroplast DNA from  
Euglena gracilis.  
Biochim. Biophys. Acta 259, 285-296 (1972)

MANNING J.E., WOLSTENHOLME D.R., RYAN S., HUNTER A., RICHARDS C.:

Circular chloroplast DNA from Euglena gracilis.  
Proc. nat. Acad. Sci. USA 68, 1169-1173 (1971)

MANNING J.E., WOLSTENHOLME D.R., RICHARDS O.:

Circular DNA molecules associated with chloroplasts of spinach,  
Spinacia oleracea.  
J. Cell Biol. 53, 594-601 (1972)

MARGULIES M.:

Effect of chloramphenicol on light dependent development of  
seedlings of Phaseolus vulgaris, var. Black Valentine, with  
particular reference to development of photosynthetic activity.  
Plant Physiol. 37, 473-480 (1962)

MARGULIES M.M.:

Effect of chloramphenicol on light dependent synthesis of protein  
and enzymes of leaves and chloroplast of Phaseolus vulgaris.  
Plant Physiol. 39, 579-585 (1964)

MARGULIES M.M.:

Relationship between red light mediated glyceraldehyde-3-  
phosphate dehydrogenase formation and light dependent develop-  
ment of photosynthesis.  
Plant Physiol. 40, 57-61 (1965)

- MARGULIES M.M.:  
Effect of chloramphenicol on formation of chloroplast structure and protein during greening of etiolated leaves of *Phaseolus vulgaris*.  
Plant Physiol. 41, 992-1003 (1966)
- MARGULIES M.M.:  
Effect of chloramphenicol on chlorophyll synthesis of bean leaves.  
Plant Physiol. 42, 218-220 (1967)
- MARGULIES M.M.:  
In vitro protein synthesis by plastids of *Phaseolus vulgaris*.  
Plant Physiol. 46, 136-141 (1970)
- MARGULIS L.:  
Origin of eucaryotic cells.  
New Haven and London, Yale University Press (1970)
- MARKHAM R.:  
The analytical ultracentrifuge as a tool for the investigation of plant viruses.  
Virus Res. 9, 241-270 (1962)
- MAURER H.R.:  
Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.  
W. de Gruyter, Berlin (1971)
- McLEISH J., SUNDERLAND N.:  
Measurements of deoxyribonucleic acid (DNA) in higher plants by Feulgen photometry and chemical methods.  
Exptl. Cell Res. 24, 527-540 (1961)
- McMAHON D., BOGORAD L.:  
Inhibition of the formation of photosynthetic enzymes by inhibitors of photosynthesis.  
Plant Physiol. 43, 188-192 (1968)
- MEGO J.I., JAGENDORF A.:  
Effect of light on growth of Black Valentine bean plastids.  
Biochim. Biophys. Acta 53, 237-254 (1961)
- MENKE W.:  
Zur Stereometrie der Heitz-Leyonschen Kristalle von *Chlorophytum comosum*.  
Z. Naturforsch. 18b, 821-826 (1963)
- MENKE W.:  
The structure of the chloroplast: The morphological structure.  
In: Biochemistry of Chloroplasts; T.W. Goodwin, ed., Academic Press, London and New York, Vol. I, 3-18 (1966)
- MENKE W., SCHÖLZEL E.:  
Molecular weight of polypeptides of the thylakoid membrane.  
Z. Naturforsch. 26b, 378-379 (1971)

MENKE W., RUPPEL H.-G.:

Molekulargewicht, Größe und Gestalt von Proteinen der Thylakoidmembran.

Z. Naturforsch. 26b, 825-831 (1971)

MILLER K.R., STAEHELIN L.A.:

Fine structure of the chloroplast membranes of *Euglena gracilis* as revealed by freeze-cleaving and deep-etching techniques.

Protoplasma 77, 55-78 (1973)

MIYACHI S.:

Structure and function of chloroplast proteins

VII. Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase of *Chlorella ellipsoidea*.

Arch. Biochem. Biophys. 129, 597-603 (1969)

MIZUNO S., YAMAZAKI H., NITTA K., UMEZAWA H.:

Inhibition of initiation of DNA-dependent RNA synthesis by an antibiotic B44P.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 379-385 (1968a)

MOHR H.:

Untersuchungen zur phytochrominduzierten Photomorphogenese des Senfkeimlings (*Sinapis alba* L.).

Z. Pflanzenphys. 54, 63-83 (1966)

MOHR H.:

Differential gene activation as a mode of action of phytochrome 730.

Photochem. Photobiol. 5, 469-483 (1966)

MOHR H.:

Regulation der Enzymsynthese bei höheren Pflanzen.

Naturw. Rdsch. 23, 187-194 (1970)

MOOR H., MÜHLETHALER K.:

Fine structure in frozen-etched yeast cells.

J. Cell Biol. 17, 609-628 (1963)

MOON K.E., THOMPSON O.P.:

Subunits from reduced and carboxymethylated ribulose diphosphate carboxylase (Fraction I Protein).

Aust. J. Biol. Sci. 22, 463-470 (1969)

MÜHLETHALER K.:

Freeze-etch on chloroplast thylakoids.

In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 1424-

1429 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk

N.V. Publishers - The Hague (1972)

MÜHLETHALER K.:

The ultrastructure of the plastid lamellae.

In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I; T.W. Goodwin, ed.,

Acad. Press London, New York, 49-64 (1966)

MÜHLETHALER K.:

The ultrastructure of plastids.

In: Structure and function of chloroplasts; M. Gibbs, ed.,

Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 7-34 (1971)

- MÜHLETHALER K., MOOR H., SZARKOWSKI J.W.:  
The ultrastructure of the chloroplast lamellae.  
Planta 67, 305-323 (1965)
- MULLINS jun. D.W., LACEY J.C., HEARN R.A.:  
5 S rRNA and tRNA: Evidence for a common evolutionary origin.  
Nature New Biol. 242, 80-83 (1973)
- MARAMATSU M., SHIMADA N., HIGASHINAKAGAWA T.:  
Effect of cycloheximide on the nucleolar RNA synthesis in rat  
liver.  
J. Mol. Biol. 53, 91-106 (1970)
- NADLER K., GRANICK S.:  
Controls on chlorophyll synthesis in barley.  
Plant Physiol. 46, 240-246 (1970)
- NAKANE P.K., PIERCE G.B. jr.:  
Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscop-  
ic localization of tissue antigens.  
J. Cell Biol. 33, 307-318 (1967)
- NANDI D.L., WAYGOOD E.R.:  
Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves.  
Can. J. Biochem. 43, 1605-1614 (1965)
- NICHOLS B.W.:  
Light induced changes in the lipids of *Chlorella vulgaris*.  
Biochim. Biophys. Acta 106, 274-279 (1965)
- NICHOLS B.W., STUBBS J.M., JAMES A.T.:  
The lipid composition and ultrastructure of normal developing  
and degenerating chloroplasts.  
In: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II; T.W. Goodwin, ed.,  
Academic Press London, New York, 677-690 (1967)
- NEVILLE D.M. jr.:  
Fractionation of cell membrane protein by disc electrophoresis.  
Biochim. Biophys. Acta 133, 168-170 (1967)
- OELZE-KAROW H., BUTLER W.L.:  
The development of photophosphorylation and photosynthesis in  
greening bean leaves.  
Plant Physiol. 48, 621-625 (1971)
- OHAD I., SIEKEVITZ P., PALADE G.E.:  
Biogenesis of chloroplast membranes.  
II. Plastid differentiation during greening of a dark grown  
algal mutant (*Chlamydomonas reinhardi*).  
J. Cell Biol. 35, 553 (1967)
- OHAD I., EYTAN G., JENNINGS R.C., GOLDBERG I., BAR-NUN S.,  
WALLACH D.:  
Biogenesis of chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardi*.  
In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2563-  
2584 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
Publishers - The Hague (1972)

PALMER J.M., WEDDING R.T.:  
Purification and properties of succinyl-CoA synthetase from  
Jerusalem artichoke mitochondria.  
Biochim. Biophys. Acta 113, 167-174 (1966)

PAOLETTI C., RIOU G., PAIRAULT J.:  
Circular oligomers in mitochondrial DNA of human and beef  
nonmalignant thyroid glands.  
Proc. nat. Acad. Sci. USA 69, 847-850 (1972)

PARK R.B., PON N.G.:  
Correlation of structure with function in Spinacea oleracea  
chloroplasts.  
J. Mol. Biol. 3, 1-10 (1961)

PARK R.B., PON N.G.:  
Chemical composition and the substructure of lamellae isolated  
from Spinacea oleracea chloroplasts.  
J. Mol. Biol. 6, 105-114 (1963)

PARK R.B., BRANTON D.:  
Freeze-etching of chloroplasts from glutaraldehyd-fixed leaves.  
Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus, Brookhaven  
Symp. Biol. 19, 341-352 (1966)

PAYNE P.I., DYER T.A.:  
Characterization of cytoplasmic and chloroplast 5 S ribosomal  
ribonucleic acid from broad-bean leaves.  
Biochem. J. 124, 83-89 (1971)

PAYNE P.I., DYER T.A.:  
The isolation of 5 S ribosomal RNA from plants.  
Biochim. Biophys. Acta 228, 167-172 (1971)

PAYNE P.I., DYER T.A.:  
Plant 5.8 S RNA is a component of 80 S but not 70 S ribosomes.  
Nature New Biol. 235, 145-147 (1972)

PAYNE P.I., DYER T.A.:  
Characterization of the ribosomal ribonucleic acids of blue-  
green algae.  
Arch. Mikrobiol. 87, 29-40 (1972)

PEACOCK A.C., DINGMAN C.W.:  
Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid  
by electrophoresis in agaroseacrylamide composite gels.  
Biochemistry 7, 668-674 (1968)

PENE J.J., KNIGHT E., DARNELL J.E. jr.:  
Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa  
cell ribosomes.  
J. Mol. Biol. 33, 609-623 (1968)

PHILIPPOVICH I.I., TONGUR A.M., ALINA B.A., OPARIN A.:  
Localization and conformation of polyribosomes bound to chloro-  
plast lamellae.  
Exper. Cell Res. 62, 399-406 (1970)

PHUNG NHU HUNG S., LACOURLY A., SARDA C.:  
Etude de l'évolution en chloroplastes des plastes étiolés d'orge.  
I. Structure examinée par cryodécapage.  
Z. Pflanzenphysiol. 62, 1-16 (1970a)

PHUNG NHU HUNG S., HOARAU A., MOYSE A.:  
Etude de l'évolution en chloroplastes des plastes étiolés d'orge.  
II. Photophosphorylation et photoréduction du NADP, formation  
de ferrédoxine en éclaircissement continu et par l'action d'éclairs.  
Z. Pflanzenphysiol. 62, 237-244 (1970b)

POGO B.G.T., POGO A.O.:  
DNA dependence of plastid differentiation. Inhibition by  
Actinomycin D.  
J. Cell Biol. 22, 296-301 (1964)

POLLARD C.J., STEMLER A., BLAYDES D.F.:  
Ribosomal ribonucleic acids of chloroplastic and mitochondrial  
preparation.  
Pl. Physiol., Lancaster 41, 1323 (1966)

POULSON R., BEEVERS L.:  
Nucleic acid metabolism during greening and unrolling of barley  
leaf segments.  
Plant Physiol. 46, 315-319 (1970)

POULSON R., BEEVERS L.:  
Effects of growth regulators on ribonucleic acid metabolism of  
barley leaf segments.  
Plant Physiol. 46, 782-785 (1970)

PRICE L., KLEIN W.H.:  
Red, far-red response and chlorophyll synthesis.  
Plant Physiol. 36, 733-735 (1961)

RACKER E.:  
The reductive pentose phosphate cycle.  
I. Phosphoribulokinase and ribulosediphosphate carboxylase.  
Arch. Biochem. Biophys. 69, 300-310 (1957)

van REGENMORTEL M.H.V.:  
Plant virus serology.  
Advan. Virus Res. 12, 207-271 (1966)

REGER B. J., SMILLIE R.M., FULLER R.C.:  
Protein synthesis by isolated etioplasts and chloroplasts from  
pea and wheat and the effects of chloramphenicol and cyclohexi-  
mide.  
Plant Physiol. 50, 19-23 (1972)

REGER B.J., SMILLIE R.M., FULLER R.C.:  
Light-stimulated production of a chloroplast-localized system  
for protein synthesis in *Euglena gracilis*.  
Plant Physiol. 50, 24-27 (1972)

REMY R.:

Pre-existence of chloroplast lamellar proteins in wheat etioplasts. Functional and protein changes during greening under continuous or intermittent light.  
FEBS Letters 31, 308-312 (1973)

REYNOLDS E.S.:

The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.  
J. Cell Biol. 17, 208-212 (1963)

RHODES M.J.C., YEMM E.W.:

Development of chloroplasts and the synthesis of proteins in leaves.  
Nature 200, 1077-1080 (1963)

RÖBBELEN G.:

Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei Arabidopsis.  
Planta (Berl.) 80, 237-254 (1968)

RÖBBELEN G., WEHRMEYER W.:

Gestörte Granabildung in Chloroplasten einer Chlorina-Mutante von Arabidopsis Thaliana (L) Heynh.  
Planta (Berl.) 65, 105-128 (1965)

ROSENBERG B.H., CAVALIERI L.F.:

Shear sensitivity of the E. coli genome: multiple membrane attachment points of the E. coli DNA.  
In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 33, 65-72 (1968)

ROSSET R., MONIER R.:

A propos de la présence d'acide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'Escherichia coli.  
Biochim. Biophys. Acta 68, 653 (1963)

ROUGHAN P.G., BOARDMAN N.K.:

Lipid composition of pea and bean leaves during chloroplast development.  
Plant Physiol. 50, 31-34 (1972)

RUPPEL H.G.:

Nucleinsäuren in Chloroplasten.  
II. Isolierung und Charakterisierung der Chloroplasten-Ribosomen von Antirrhinum majus.  
Z. Naturforsch. 23b, 997-1004 (1968)

RUPPEL H.G.:

Nucleinsäuren in Chloroplasten.  
III. Nachweis einer niedermolekularen RNS-Fraktion in den Chloroplasten-Ribosomen von Allium porrum und Zea mays.  
Z. Naturforsch. 24b, 1467-1475 (1969)

RUPPEL H.G., v. WYK D.:

Über die Desoxyribonucleinsäure in Chloroplasten von Antirrhinum majus.  
Z. Pflanzenphysiol. 53, 32-38 (1965)

RUTNER A.C.:

Estimation of the molecular weight of ribulose diphosphate carboxylase subunits.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 923-929 (1970)

RUTNER A.C., LANE M.D.:

Nonidentical subunits of ribulose diphosphate carboxylase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 531-537 (1967)

RYTER A., HIROTA Y., JACOB F.:

DNA-membrane complex and nuclear segregation in bacteria.

In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 33, 669-676 (1968)

SABATINI D.V., BENSCH K., BARNETT R.:

Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.

J. Cell Biol. 17, 19-58 (1963)

SANE P.V., GOODCHILD D.J., PARK R.B.:

Characterization of chloroplast photosystems I and II separated by a non-detergent method.

Biochim. Biophys. Acta 216, 162-178 (1970)

SCHANTZ R., DOUCE R., DURANTON H.M.:

Biosynthesis of phosphatidylglycerol during greening of synchronous dark-grown *Euglena gracilis* Z.

In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2659-2668 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague (1972)

SCHIFF J.A., EPSTEIN H.T.:

The replicative aspect of chloroplast continuity in *Euglena*.

In: Biochemistry of Chloroplasts; T.W. Goodwin, ed., Academic Press, London, Vol. I, 341-353 (1966)

SCHNEIDER H.A.W.:

Chlorophyllides in green and etiolated leaves.

Phytochemistry 7, 885-886 (1968)

SCHNEPF E.:

Über Zusammenhänge zwischen Heitz-Lyon-Kristallen und Thylakoiden.

Planta 61, 371-373 (1964)

SCHNEPF E.:

Membranfluß und Membrantransformation.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 407-413 (1969)

SCHNEPF E., BROWN R.M.:

On the relationship between the endosymbiosis and the origin of plastids and mitochondria.

In: Origin and Continuity of Cell Organelles; W. Beerman, J. Reinert, H. Ursprung, eds., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, Vol. II, 299-322 (1971)

SCHNEPF E., CZYGAN F.-C.:

Feinbau und Carotinoide von Chromoplasten im Spadix-Appendix von Typhonium und Arum.

Z. Pflanzenphysiol. 54, 345-355 (1966)

SCHOPFER, P.:

Phytochrome and the control of enzyme activity.

In: Phytochrome; K. Mitrakos, W. Shropshire, eds., Academic Press, London, New York, 486-514 (1972)

SCHOPFER P., HOCK B.:

Nachweis der Phytochrom-induzierten de novo-Synthese von Phenylalaninammoniumlyase (PAL, E.C. 4.3.1.5) in Keimlingen von *Sinapis alba* L. durch Dichtemerkierung mit Deuterium.

Planta 69, 248-253 (1971)

SCHOPFER P., SIEGELMAN H.W.:

Purification of protochlorophyllide holochrome.

Plant Physiol. 43, 990-996 (1968)

SCHWELITZ F.D., DILLEY R.A., CRANE F.L.:

Structural characteristics of a photosynthetic mutant *Euglena gracilis* blocked in Photosystem II.

Plant Physiol. 50, 166-170 (1972)

SCOTT N.S., SMILLIE R.M.:

Evidence for the direction of chloroplast ribosomal RNA synthesis by chloroplast DNA.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 598-603 (1967)

SCOTT N.S., MUNNS R., GRAHAM D., SMILLIE R.M.:

Origin and synthesis of chloroplast ribosomal RNA and photo-regulation during chloroplast biogenesis.

In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts; N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.W. Smillie, eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 383-392 (1970)

SEBALD W., BÜCHER Th., OLBRICH B., KAUDEWITZ F.:

Electrophoretic pattern and amino acid incorporation in vitro into the insoluble mitochondrial protein of *Neurospora crassa* wild type and Mi-1 Mutant.

FEBS Letters 1, 235-240 (1968)

SHIBATA K.:

Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves.

J. Biochem. 44, 147-173 (1957)

SHUMWAY L.K., WEIER T.E.:

The chloroplast structure of Iojap maize.

Amer. J. Bot. 54, 773-780 (1967)

SIDDIQUI M.A.Q., HOSOKAWA K.:

Role of 5 S ribosomal RNA in polypeptide synthesis.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 711 (1969)

SINGER S.J.L., EGGMAN L., CAMPBELL J.M., WILDMAN S.G.:

The proteins of green leaves.

IV. A high molecular weight protein comprising a large part of the cytoplasmic proteins.

J. Biol. Chem. 197, 233-239 (1952)

SIRONVAL C., BRONCHART R., MICHEL J.-M., BROUERS M., KUYPER Y.:

Structure macromoléculaire et activités photochimiques des lamelles plastidiales.

Bull. Soc. Franc. Physiol. Végét. 14, 195-225 (1968)

SIRONVAL C., MICHEL J.M., BRONCHART R., ENGLERT-DUJARDIN E.:

On the primary thylakoids of chloroplasts grown under a flash regime.

In: Progress in Photosynthesis Research; H. Methner, ed., International Union of Biological Sciences, Tübingen, 47-54 (1969)

SISLER E.C., KLEIN W.H.:

The effect of age and various chemicals on the lag phase of chlorophyll synthesis in dark grown bean seedlings.

Physiol. Plantarum 16, 315-322 (1963)

SITTE P.:

Biomembranen: Struktur und Funktion.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 329-383 (1969)

SLACK C.R., HATCH M.D., GOODCHILD D.J.:

Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis.

Biochem. J. 114, 489-498 (1969)

SMILLIE R.M.:

Formation and function of soluble proteins in chloroplasts.

Canad. J. Botany 41, 123-154 (1963)

SMILLIE R.M., SCOTT N.S.:

Organelle biosynthesis: The chloroplast progress in molecular and subcellular biology.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, Vol. 1, 137-202 (1969)

SMILLIE R.M., BISHOP D.G., GIBBONS G.C., GRAHAM D., GRIEVE A.M., RAISON J.K., REGER B.J.:

Determination of the sites of synthesis of proteins and lipids of the chloroplast using chloramphenicol and cycloheximide.

In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts; N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 422-433 (1970)

SMILLIE R.M., GRAHAM D., DWYER M.R., GRIEVE A., TOBIN N.F.:

Evidence for the synthesis in vivo of proteins of the Calvin cycle and the photosynthetic electron-transfer pathway on chloroplast ribosomes.

Biochim. Biophys. Res. Commun. 28, 604-610 (1967)

SMILLIE R.M., SCOTT N.S., GRAHAM D.:

Biogenesis of chloroplasts: Roles of chloroplast DNA and chloroplast ribosomes.

In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis; K. Shibata, A. Takamiya, A. Jagendorf, R.C. Fuller, eds., University Park Press, State College, Pennsylvania, 322-354 (1968)

SMILLIE R.M., MUNNS R., GRAHAM D., STEELE SCOTT N., GRIEVE A.M.:  
Comparative study of the developing of protein synthesis capacity in chloroplasts.

In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2511-2518 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague (1972)

SMITH J.H.C., BENITEZ A.:

The effect of temperature on the conversion of protochlorophyll to chlorophyll a in etiolated barley leaves.

Plant Physiol. 29, 135-143 (1954)

SMITH H.:

Changes in plastid ribosomal-RNA and enzymes during the growth of barley leaves in darkness.

Phytochemistry 9, 965-975 (1970)

SMITH H., STEWART G.R., BERRY D.R.:

The effects of light on plastid ribosomal-RNA and enzymes at different stages of barley etioplast development.

Phytochemistry 9, 977-983 (1970)

SMITH-JOHANNSEN H., GIBBS S.P.:

Effects of chloramphenicol on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Ochromonas danica*.

J. Cell Biol. 52, 598-614 (1972)

SPENCER D.:

Protein synthesis by isolated spinach chloroplasts.

Arch. Biochem. Biophys. 111, 381-390 (1965)

SPENCER D., WILDMAN S.G.:

Incorporation of amino acids into protein by cell-free extracts from tobacco leaves.

Biochemistry 3, 954-959 (1964)

SPENCER D., WHITFIELD P.R.:

The nature of the ribonucleic acid of isolated chloroplasts.

Arch. Biochem. Biophys. 117, 337-346 (1966)

SPENCER D., WHITFIELD P.R.:

The characteristics of spinach chloroplast DNA polymerase.

Arch. Biochem. Biophys. 132, 477-488 (1969)

SPIRIN A.S.:

Some problems concerning the macromolecular structure of ribonucleic acids.

In: Progress in Nucleic Acid Research, Academic Press, New York and London, Vol. I, 301-345 (1963)

SPIRIN A.S.:

On masked forms of messenger RNA in early embryogenesis and in other differentiating systems.

In: Current Topics in Developmental Biology; A.A. Moscona, A. Monroy, eds., Academic Press, New York, Vol. I, 2-38 (1966)

SPREY B.:

Beiträge zur makromolekularen Organisation der Plastiden I.  
Z. Pflanzenphysiol. 53, 255-261 (1965)

SPREY B.:

Beiträge zur makromolekularen Organisation der Plastiden II.  
(Zur Verbreitung von DNS in Plastiden).  
Z. Pflanzenphysiol. 54, 386-394 (1966)

SPREY B.:

Eine verbesserte Methode zur Herstellung von AgBr-Einkornschichten für die elektronenmikroskopische Autoradiographie.  
Z. Pflanzenphysiol. 58, 108-117 (1967)

SPREY B.:

Zur Feinstruktur des Plastidenstromas von *Hordeum vulgare* L.  
Protoplasma 66, 469-479 (1968)

SPREY B.:

Zum Verhalten DNS-haltiger Areale des Plastidenstromas bei der Plastidenteilung.  
Planta (Berl.) 78, 115-133 (1968)

SPREY B.:

Die Lokalisierung von Sekundär-carotinoiden von *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille.  
Protoplasma 71, 235-250 (1970)

SPREY B.:

Lokalisation von Sekundär-carotinoiden in Plastoglobuli.  
In: Septième Congrès International de Microscopie Electronique, Grenoble, 207-208 (1970)

SPREY B.:

Untersuchungen zur Wirkung von Röntgenstrahlen auf die lichtabhängige Differenzierung von Etioplasten zu Chloroplasten.  
Jül-638-B0, 1-187 (1970)

SPREY B.:

Ribosomale RNA und Thylakoidmembranen in Plastiden von Chlorophylldefektmutanten der Gerste.  
Z. Pflanzenphysiol. 67, 223-243 (1972)

SPREY B.:

Effect of X radiation on plastid differentiation in primary leaves of barley.  
Radiation Botany 12, 399-405 (1972)

SPREY B., KAJA H.:

Zum Form- und Funktionswechsel ergrünender Plastiden von *Tradescantia albiflora* Kunth. em. Brückn. cv. 'aureo-vittata'.  
Z. Pflanzenphysiol. 53, 140-156 (1965)

SPREY B., LICHTENTHALER H.K.:

Zur Frage der Beziehungen zwischen Plastoglobuli und Thylakoidgenese in Gerstenkeimlingen.

Z. Naturforsch. 21b, 697-699 (1966)

SPREY B., WEINERT H.:

Beiträge zur Formvariabilität von Plastidengrenzschichten.

Z. Naturforsch. 21b, 72-73 (1966)

SPREY B., KAJA H.:

Zur Entwicklung chlorophylldefekter Plastiden.

Z. Naturwissenschaften 54, 120-121 (1967)

SPREY B., HASCHE A.:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kernmembran während der Mitose mit Hilfe der Gefrierätzung und Ultradünnschnittserien.

Jül-723-BO, 1-66 (1971)

SPREY B., HASCHE A.:

Untersuchungen zur Kernporenhäufigkeit und zur Kernporenstruktur diploider und tetraploider Kerne von *Hordeum vulgare* L. nach Gefrierätzung.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, 261-265 (1971)

SPREY B., GIETZ N.:

Isolierung von Etioplasten und elektronenmikroskopische Abbildung membranassoziierter Etioplasten-DNA.

Z. Pflanzenphysiol. 68, 314-397 (1973)

SPREY B., HASCHE A.:

Ultrastrukturelle Veränderungen der Kernmembran von *Lepidium sativum* L in der Mitose.

Cytologia 37, 721-745 (1972)

SPREY B., LAMBERT C.:

Ribosomale RNA von *Hordeum vulgare* L.: Gelelektrophoretische Trennung und elektronenmikroskopische Abbildung.

Z. Pflanzenphysiol. 69 (1973), im Druck

SPURR A.R.:

A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.

J. Ultrastructure Res. 26, 31-43 (1969)

SPURR A.R., HARRIS W.M.:

Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum annum*.

I. Thylakoidmembrane changes during fruit ripening.

Amer. J. Bot. 55, 1210-1224 (1968)

STEELE SCOTT N., NAIR H., SMILLIE R.M.:

The effect of red irradiation on plastid ribosomal RNA synthesis in dark grown pea seedlings.

Plant Physiol. 47, 385-388 (1971)

STEER M.W., GUNNING B.E.S., CARR D.J.:  
Fraction I protein from oat leaves.  
In: Biochemistry of Chloroplasts; T.W. Goodwin, ed., Acad. Press  
London, New York, Vol. I, 285-291 (1966)

STEER M.W., GUNNING B.E.S., GRAHAM T.A., CARR D.J.:  
Isolation, properties, and structure of Fraction I protein  
from *Avena sativa* L.  
*Planta* (Berl.) 79, 254-267 (1968)

STEER B.T., GIBBS M.:  
Changes in succinyl-CoA synthetase in etiolated bean leaves  
caused by illumination.  
*Plant Physiol.* 44, 775-780 (1969)

STETLER D.A., LAETSCH W.M.:  
Chloroplast development in *Nicotiana tabacum* "Maryland mammoth".  
*Amer. J. Bot.* 56, 260-270 (1969)

STRAUS W.:  
Properties of isolated carrot chromoplasts.  
*Exptl. Cell Research* 6, 392-402 (1954)

STRAUS W.:  
Studies on chromoplasts of carrots.  
*Protoplasma* 53, 405-421 (1961)

STUTZ E.:  
Characterization of *Euglena gracilis* chloroplast single  
strand DNA.  
In: *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*;  
N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland  
Publishing Company, Amsterdam-London, 277-281 (1970)

STUTZ E., NOLL H.:  
Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in  
plants: Evidence for three classes of ribosomal RNA in nature.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 774-781 (1967)

SUEOKA N., CHENG T.-Y.:  
Fractionation of nucleic acids with methylated albumin column.  
*J. Mol. Biol.* 4, 161-172 (1962)

SUEOKA N., QUINN W.G.:  
Membrane attachment of the chromosome replication origin in  
*Bacillus subtilis*.  
In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 33,  
695-705 (1968)

SÜZER S., SAUER K.:  
The sites of photoconversion of protochlorophyllide to chloro-  
phyllide in barley seedlings.  
*Plant Physiol.* 48, 60-63 (1971)

SUGIYAMA S., AKAZAWA T.:  
Structure and function of chloroplast proteins  
I. Subunit structure of Wheat Fraction I protein.  
*J. Biochem.* 62, 474-482 (1967)

SUGIYAMA T., MATSUMOTO C., AKAZAWA T., MIYACHI S.:  
Structure and function of chloroplast proteins.  
VII. Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase of *Chlorella*  
*ellipsoidea*.  
Arch. Biochem. Biophys. 129, 597-602 (1969)

SURZYCKI S.J.:  
Genetic functions of the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardi*:  
Effect of rifampin on chloroplast-DNA dependent RNA polymerase.  
Proc. N.A.S. 63, 1327-1334 (1969)

SZYBALSKI W., IYER V.N.:  
Cross-linking of DNA by enzymatically or chemically activated  
mitomycins and porfiromycins, bifunctionally "alkylating"  
antibiotics.  
Fed. Proc. 23, 946-952 (1964)

TABER R.L., VINCENT W.S.:  
Effects of cycloheximide on ribosomal RNA synthesis in yeast.  
Biochem. a. Biophys. Res. 34, 488-494 (1969)

TAKEBE I., OTSUKI Y.:  
Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco.  
Plant (Berl.) 113, 21-27 (1973)

TAYLOR M.M., GLASGOW J.E., STORCK R.:  
Sedimentation coefficients of RNA from 70 S and 80 S ribosomes.  
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 164-169 (1967)

TAYLOR M.M., STORCK R.:  
Uniqueness of bacterial ribosomes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 958-965 (1964)

TEVINI M.:  
Der Einfluß von Phosphat- und Nitratmangel auf die Synthese der  
Phospho- und Glykolipide bei *Impatiens balsamina*.  
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, 595-606 (1971)

TEVINI M.:  
The formation of lipids following illumination of etiolated  
seedlings.  
In: IInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2472-  
2478 (1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
N.V. Publishers - The Hague (1972)

TEWARI K.K., WILDMAN S.G.:  
DNA polymerase in isolated tobacco chloroplasts and nature of  
the polymerized product.  
Proc. N.A.S. 58, 689-716 (1967)

THOMSON W.W., ELLIS R.J.:  
Inhibition of grana formation by lincomycin.  
Planta (Berl.) 108, 89-92 (1972)

THOMSON W.W., LEWIS L.N., COGGINS C.W.:  
The reversion of chromoplasts to chloroplasts in Valencia  
oranges.  
Cytologia 32, 117-124 (1967)

THORNBUR J.P., RIDLEY S.M., BAILEY J.L.:

Some observations on the Fraction I protein of *Beta vulgaris*.  
In: *Biochemistry of Chloroplasts*; T.W. Goodwin, ed., Academic  
Press London-New York, Vol. I, 243-255 (1966)

THORNBUR J.P., GREGORY R.P.F., SMITH C.A., BAILEY J.L.:

(1) Studies on the nature of the chloroplast lamella  
I. Preparation and some properties of two chlorophyll-protein  
complexes.

*Biochemistry* 6, 391-396 (1967)

THORNBUR J.P., STEWART J.C., HATTON M.W.C., BAILEY J.:

(2) Studies on the nature of chloroplast lamella  
II. Chemical composition and further physical properties of  
two chlorophyll-protein complexes.

*Biochemistry* 6, 2006-2014 (1967)

THORUN W., MEHL E.:

Determinations of molecular weights of microgram quantities of  
protein components from biological membranes and other complex  
mixtures: Gel electrophoresis across linear gradients of  
acrylamide.

*Biochim. Biophys. Acta* 160, 132-134 (1968)

TOLBERT N.E., GAILEY R.B.:

Carbon dioxide fixation by etiolated plants after exposure to  
white light.

*Plant Physiol.* 30, 491-499 (1955)

TOYAMA S., FUNAZAKI K.:

Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids.  
V. Concerning one-dimensional metamorphosis of the plastids  
in *Cryptomeria* leaves.

*Bot. Mag. Tokyo* 84, 123-136 (1971)

TREFFRY T.:

Phytylation of chlorophyllide and prolamellar-body trans-  
formation in etiolated peas.

*Planta* 91, 279-284 (1970)

TROWN P.W.:

An improved method for the isolation of carboxydismutase.  
Probable identity with Fraction I and the protein moiety  
of protochlorophyll holochrome.

*Biochemistry* 4, 908-918 (1965)

UDEM S.A., KAUFMAN K., WARNER J.R.:

Small ribosomal ribonucleic acid species of *Saccharomyces*  
*cerevisiae*.

*J. Bacter.* 105, 101-106 (1971)

VAZQUEZ D.:

Binding of chloramphenicol to ribosomes. The effect of a number  
of antibiotics.

*Biochim. Biophys. Acta* 114, 277-295 (1966)

VEDEL F., D'AOUST M.J.:

Polyacrylamide gel analysis of high molecular weight ribonucleic acid from etiolated and green cucumber cotyledons.  
Plant Physiol. 46, 81-85 (1970)

VIRGIN H.I.:

Protochlorophyll formation and greening in etiolated barley leaves.  
Physiol. Plantarum 8, 630-643 (1955)

VIRGIN H.I.:

Chlorophyll a content and transpiration of etiolated wheat leaves after pretreatment with a short light impulse followed by dark periods of varying lengths.  
Physiol. Plantarum 10, 445-453 (1957)

VIRGIN H.I.:

Studies on the formation of protochlorophyll and chlorophyll a under varying light treatments.  
Physiol. Plantarum 11, 347-362 (1958)

VIRGIN H.I.:

Action spectrum for the elimination of the lag-phase in chlorophyll formation in previously dark-grown leaves of wheat.  
Physiol. Plantarum 14, 439-452 (1961)

VIRGIN H.I.:

Carotenoid synthesis in leaves of etiolated wheat seedlings after varying light and dark treatments.  
Physiol. Plantarum 20, 314-320 (1967)

VIRGIN H.I., von WETTSTEIN D., KAHN A.:

The physiology of chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts.  
Photochem. Photobiol. 2, 83-91 (1963)

WALLACH D., BAR-NUN S., OHAD I.:

Biogenesis of chloroplast membranes.  
IX. Development of photophosphorylation and proton pump activities in greening *Chlamydomonas reinhardi*  $\gamma$ -1 as measured with an open-cell preparation.  
Biochim. Biophys. Acta 267, 125-137 (1972)

WALTHER F.:

Effectiveness of mutagenic treatments with ionizing radiation in barley.  
International Atomic Energy Agency, Vienna (1969)

WANKA F., POELS C.L.M.:

On the problem of an enzymatic regulation of DNA synthesis in *Chlorella*.  
European J. Biochem. 9, 478-482 (1969)

WANKA F., SCHRAUWEN P.J.A.:

Selective inhibition by cycloheximide of ribosomal RNA synthesis in *Chlorella*.  
Biochim. Biophys. Acta 254, 237-240 (1971)

WEHRLI W., NÜESCH J., KNÜSEL F., STAEBELIN M.:  
Action of rifamycins on RNA polymerase.  
Biochim. Biophys. Acta 157, 215-217 (1968)

WEHRMEYER W.:  
Über Membranbildungsprozesse im Chloroplasten  
I. Zur Morphogenese der Granamembranen.  
Planta 59, 280-295 (1963)

WEHRMEYER W.:  
Über Membranbildungsprozesse im Chloroplasten.  
II. Zur Entstehung der Grana durch Membranüberschiebung.  
Planta 63, 13-30 (1964)

WEHRMEYER W.:  
Zur Klärung der strukturellen Variabilität der Chloroplasten-  
grana des Spinats in Profil und Aufsicht.  
Planta 62, 272-293 (1964)

WEIER T.E., BENSON A.A.:  
The molecular nature of chloroplast membranes.  
In: Biochemistry of Chloroplasts; T.W. Goodwin, ed., Acad. Press  
London, New York, Vol. I, 91-113 (1966)

WEIER T.E., BROWN D.L.:  
Formation of the prolamellar body in 8-day, dark-grown seedlings.  
Amer. J. Bot. 57, 267-275 (1970)

WEIER T.E., SJOLAND R.D., BROWN D.L.:  
Changes induced by low light intensities on the prolamellar  
body of 8-day, dark-grown seedlings.  
Amer. J. Bot. 57, 276-284 (1970)

WEIER T.E., THOMSON W.W.:  
The grana of starch-free chloroplasts of *Nicotiana rustica*.  
J. Cell Biol. 13, 89-108 (1962)

WEISSBACH A., HORECKER B.L., HURWITZ J.:  
The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose  
diphosphate and carbon dioxide.  
J. Biol. Chem. 218, 795-810 (1956)

WELLBURN A.R., WELLBURN F.A.M.:  
Ultrastructural morphogenesis in isolated etioplasts at high  
and low temperature and light flux.  
In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2349-2365  
(1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
N.V. Publishers - The Hague (1972)

WERZ G., KELLNER G.:  
Molecular characteristics of chloroplast DNA of *Acetabularia*  
cells.  
J. Ultrastructure Res. 24, 109-115 (1968)

WETTSTEIN D.V., HENNINGSEN K.W., BOYNTON J.E., KANNANGARA G.C.,  
NIELSEN O.F.:

The genic control of chloroplast development in barley.  
In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts;  
N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland  
Publishing Company, Amsterdam-London, 205-223 (1970)

WHATLEY F.R., GREGORY P., HASLETT B.G., BRADBEER J.W.:  
Development of electron transport intermediates in greening  
chloroplasts.

In: IIInd Internat. Congress on Photosynthesis, Stresa, 2375-2381  
(1971); G. Forti, M. Avron, A. Melandri, eds., Dr. W. Junk  
N.V. Publishers - The Hague (1972)

WIESSNER W., AMELUNXEN F.:

Beziehungen zwischen submikroskopischer Chloroplastenstruktur  
und der Art der Kohlenstoffquelle unter phototrophen Ernährungs-  
bedingungen bei Chlamydomonas stellata.  
Arch. Mikrobiol. 66, 14-24 (1969)

WIESSNER W., AMELUNXEN F.:

Umwandlung der submikroskopischen Chloroplastenstruktur parallel  
zur Veränderung der stoffwechselphysiologischen Leistung von  
Chlamydomonas stellata.  
Arch. Mikrobiol. 67, 357-369 (1969)

WILDMAN S.G.:

The organisation of grana-containing chloroplasts in relation  
to location of some enzymatic systems concerned with photo-  
synthesis, protein synthesis and ribonucleic acid synthesis.  
In: Biochemistry of Chloroplasts; T.W. Goodwin, ed., Academic  
Press, London, Vol. II, 295-319 (1967)

WILDMAN S.G.:

An approach towards ascertaining the function of chloroplast DNA  
in tobacco plant.  
In: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts;  
N.K. Boardman, A.W. Linnane, R.M. Smillie, eds., North-Holland  
Publishing Company, Amsterdam-London, 402-412 (1970)

WILLIAMS G.R., NOVELLI G.D.:

Stimulation of an in vitro amino acid incorporation system by  
illumination of dark-grown bean plants.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 23-27 (1964)

WILLIAMS G.R.:

Some effects of light on nucleic acid synthesis in etiolated  
plant leaves.  
Plant Physiol. Supp. 40, 6 (1965)

WINTERMANS J.F.G.M.:

Concentrations of phosphatides and glycolipids in leaves and  
chloroplasts.  
Biochim. Biophys. Acta 44, 49-54 (1960)

- WITHROW R.B., WOLFF J.B., PRICE L.:  
Elimination of the lag phase of chlorophyll synthesis in dark grown bean leaves by a pretreatment with low irradiances of monochromatic energy.  
Plant Physiol. Suppl. 31, 13 (1956)
- WOLFF J.B., PRICE L.:  
Terminal steps of chlorophyll a biosynthesis in higher plants.  
Arch. Biochem. Biophys. 72, 293-301 (1957)
- WOLFF J.B., PRICE L.:  
Effect of sugars on chlorophyll biosynthesis in higher plants.  
J. Biol. Chem. 235, 1603-1608 (1960)
- WONG F.Y., WILDMAN S.G.:  
Simple procedure for isolation of satellite DNA's from tobacco leaves in high yield and demonstration of minicircles.  
Biochim. Biophys. Acta 259, 5-12 (1972)
- WOO K.C., ANDERSON J.M., BOARDMAN N.K., DOWNTON W.J.S., OSMOND C.B., THORNE S.W.:  
Deficient Photosystem III in agranal bundle sheat chloroplast of C<sub>4</sub> plants.  
Proc. Nat. Acad. Sciences 67, 18-25 (1970)
- WOODCOCK C.L.F., BOGORAD L.:  
Evidence for variation in the quantity of DNA among plastids of Acetabularia.  
J. Cell Biol. 44, 361-375 (1970)
- WOODCOCK C.L.F., BOGORAD L.:  
Nucleic acids and information processing in chloroplasts.  
In: Structure and Function of Chloroplasts; M. Gibbs, ed., Springer Verlag, 89-128 (1971)
- WOODCOCK C., FERNANDEZ-MORAN H.:  
Electron microscopy of DNA conformations in spinach chloroplasts.  
J. Mol. Biol. 31, 627-631 (1968)
- WRISCHER M.:  
Protein crystalloids in the stroma of bean plastids.  
Protoplasma 77, 141-150 (1973)
- WUTHIER:  
Purification of lipids from nonlipid contaminants on Sephadex bead columns.  
J. Lipid Res. 7, 558 (1966)
- YOKOMURA E.:  
An electron microscopic study of DNA-like fibrils in chloroplasts.  
Cytologia 32, 361-377 (1967)

