

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. ULLRICH)

RIBONUCLEINSÄUREN IN DEN CHLOROPLASTEN DER BLATTZELLE

Von

ULRICH HEBER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. März 1963)

Die Frage des Vorkommens von Nucleinsäuren¹ in den Chloroplasten ist in einer Reihe von Arbeiten behandelt worden. Zusammenfassungen der Ergebnisse liegen in den Publikationen von GRANICK (1955) und MENKE (1962) vor. Danach ergibt die überwiegende Mehrzahl der Befunde, daß Ribonucleinsäuren Bestandteile der Chloroplasten sind. Über den Anteil der Chloroplasten an der gesamten RNS der Blattzelle ist jedoch nichts bekannt. Diese Frage hat neuerdings wieder besonderes Interesse gewonnen im Zusammenhang mit Befunden, wonach Chloroplasten in vitro Aminosäuren in Protein einbauen können (STEPHENSON, THIMANN und ZAMECNIK 1956, SISSAKIAN und FILIPPOVITCH 1959) und in vivo Proteinsynthese durchführen (HEBER 1962). Die Proteinsynthese läuft bekanntlich nur unter Vermittlung einer ganzen Reihe löslicher und partikulär gebundener Ribonucleinsäuren ab.

Die hier vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem RNS-Spiegel in Chloroplasten und Cytoplasma sowie der Fraktionierung der Chloroplasten-RNS. Außerdem sollte der Anteil der Chloroplasten an der gesamten RNS der Zelle bestimmt werden.

Methodik

Material. Für die Untersuchungen wurden voll entfaltete Blätter junger Pflanzen von *Vicia faba*, *Spinacia oleracea*, *Secale cereale* und *Nicotiana tabacum* verwandt. Pflanzen der erstgenannten Species wurden unter Feldbedingungen, Tabakpflanzen dagegen im Gewächshaus angezogen.

Zellfraktionierung. Chloroplasten wurden nach Gefriertrocknung von Blättern aus nicht-wäßrigem Medium (Behrens-Methode) isoliert, wie das eingehend an anderer Stelle beschrieben worden ist (HEBER 1957, HEBER und TYSZKIEWICZ 1962). Drei Fraktionen wurden erhalten: Chloroplasten, Rückstand (derjenige Gewebeanteil, der nach Isolierung der Chloroplastenfraktion verblieb) und „unverändertes“ Blattgewebe, das der gleichen Behandlung unterworfen war wie die beiden erstgenannten Fraktionen.

¹ In der Arbeit verwandte Abkürzungen: NS Nucleinsäuren; RNS Ribonucleinsäuren; DNS Desoxyribonucleinsäuren; NS-P Nucleinsäurephosphor; TRIS tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.

Nucleinsäurebestimmungen. 20—25 mg der verschiedenen Fraktionen wurden in 75% Äthanol auf etwa 70° C erhitzt, abzentrifugiert, kurz mit kalter 1%iger Perchlorsäure und mit Wasser je einmal gewaschen, durch mehrmalige Behandlung mit heißem 70%igem und absolutem Alkohol sowie Äthanol/Äther (50/50) gründlich von Lipoiden befreit und schließlich kurz in kaltem Äthanol/1% wäßrigem Perchlorsäure-Gemisch (50/50) und in Wasser je zweimal gewaschen. Wäsungen in wäßriger Lösung wurden schnell durchgeführt, da eine endogene Ribonuclease, die durch Alkohol, Säure und Erhitzung nicht inaktiviert wird, den Abbau von RNS befürchten läßt.

Aus dem Sediment wurden Nucleinsäuren nach drei verschiedenen Verfahren extrahiert:

1. nach KERN (1959; Modifikation der Methode von OGUR und ROSEN, 1950): Da wir nur in der Wärme (70° C) mit 2n-Perchlorsäure extrahierten, unterblieb eine Differenzierung in RNS und DNS, die indessen nach dieser Methode sowieso bedenklich ist;

2. nach SCHMIDT-THANNHAUSER (1945): Hydrolyse der RNS mit 3 ml 0,5 n-KOH bei 37° C über Nacht und Befreiung der Hydrolyseprodukte durch Fällung mit Perchlorsäure und Essigsäure von DNS; Extraktion von DNS aus der Säurefällung durch 2n-HClO₄ in der Wärme;

3. durch Behandlung mit Ribonuclease: Die Probe wurde in TRIS-Puffer, pH 7,2, suspendiert und zweimal je 3 Std sowie einmal über Nacht mit je 100 µg kristalliner Ribonuclease (Firma Boehringer, Mannheim) inkubiert; längere Inkubation ergab keinen Anstieg der RNS-Werte, wie sich aus Abb. 1 ersehen läßt.

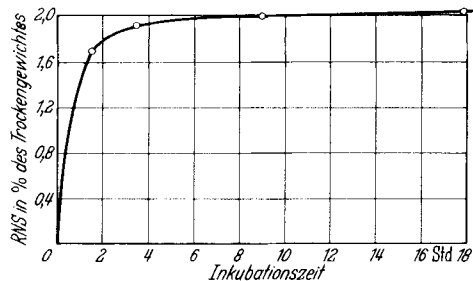


Abb. 1. Die Extraktion von RNS aus alkoholgefälltem Chloroplastenmaterial durch Ribonuclease. *Bedingungen:* 20 mg lipoidfreies, gewaschenes Chloroplastenmaterial wurden in 4 ml TRIS, pH 7,2, mit 100 µg Ribonuclease bei 37° C inkubiert, nach 1½, 3½, 9 und 18 Std zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. RNS-Bestimmungen wurden an der jeweils überstehenden Lösung vorgenommen

Von den Extrakten wurden UV-Spektren angefertigt. Aufgrund der Spektrenform ergab sich, daß insbesondere die nach SCHMIDT-THANNHAUSER erhaltenen Extrakte durch Fremdstoffen verunreinigt sind. In Tabelle 1 sind Quotienten der Extinktionen bei 280 und 260 mµ für die verschiedenen Extraktionsmethoden im Vergleich zu denen reiner

Tabelle 1. Verhältnis der Extinktionen bei 280 und 260 mµ für verschiedene RNS-Präparationen als Maß für deren Reinheit

	KOH-Extrakt ¹ pH ~ 1	Perchlorsäure-Extrakt ² pH ~ 1	RNS		Ribonuclease-Extrakt pH 7,2
			pH ~ 1	pH 7	
$\frac{E_{280\text{ m}\mu}}{E_{260\text{ m}\mu}}$	0,72—0,78	0,64—0,69	0,62	0,48	0,51—0,54

¹ Nach SCHMIDT-THANNHAUSER (1945).

² Nach KERN (1959).

RNS als qualitatives Maß einer Verunreinigung wiedergegeben. Die Spektren zeigen, daß die durch Ribonuclease-Behandlung erhaltenen Extrakte am wenigsten von einer Verunreinigung betroffen sind. Die Verunreinigung besteht zum größten Teil aus Proteinmaterial, wie aus Hydrolyseversuchen erschlossen wurde. Sie läßt sich auf rechnerischem Wege wie folgt eliminieren:

Eine Reihe von Chloroplastenpräparationen wurde wie oben beschrieben gewaschen und dann durch Ribonuclease-Behandlung und 20minütige Extraktion mit 2n-HClO₄ bei 70° C von NS befreit. Die NS-freien Präparationen wurden alsdann den einzelnen Extraktionsverfahren genauso unterworfen wie die Präparationen, deren NS-Gehalt bestimmt werden sollte. Die Spektren der dabei erhaltenen Extrakte spiegeln die Verunreinigung mit NS-fremdem Material wieder. Unter Benutzung der molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{NS-P}^{260\text{ m}\mu} = 10200$, $\epsilon_{NS-P}^{280\text{ m}\mu} = 4800$ (pH 7,2) und $\epsilon_{NS-P}^{280\text{ m}\mu} = 6330$ (pH ~ 1) für RNS sowie der Quotienten der Extinktionen bei 280 und 260 m μ für die Verunreinigungen (erhalten aus den Spektren der NS-freien Präparate) wurden dann aufgrund der 2-Wellenlängenmethode drei Formeln für die Bestimmung von RNS in reinen oder durch Proteinbestandteile verunreinigten Extrakten errechnet. Die Verschiedenartigkeit der Formeln erklärt sich aus den pH-Abhängigkeiten der Absorptionskoeffizienten von RNS und der Proteinverunreinigung. Sie lauten

$$1. \quad 69,2 E_{260\text{ m}\mu} - 57,5 E_{280\text{ m}\mu} = c$$

für die Bestimmung von RNS in Extrakten nach KERN (HClO₄-Hydrolyse)

$$2. \quad 62,8 E_{260\text{ m}\mu} - 47,2 E_{280\text{ m}\mu} = c$$

für die Bestimmung von RNS in Extrakten nach SCHMIDT-THANNHAUSER (KOH-Hydrolyse)

$$3. \quad 56,8 E_{260\text{ m}\mu} - 42,3 E_{280\text{ m}\mu} = c$$

für die RNS-Bestimmung nach Ribonuclease-Behandlung.

E ist die gemessene Extinktion und c die RNS-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$. Mit Hilfe dieser Formeln wurden alle RNS-Bestimmungen vorgenommen, nachdem sich gezeigt hatte, daß sie tatsächlich den Einfluß von Verunreinigungen der Extrakte durch Protein zu eliminieren gestatten. In Tabelle 2 sind einige Daten, die dies (für Formel 3) bestätigen, angegeben.

Ebenso wie die RNS- wurde auch die DNS-Bestimmung gehandhabt, die allerdings nur an Extrakten durchgeführt wurde, die nach SCHMIDT-THANNHAUSER (1945) gewonnen waren. In Anbetracht der niedrigen DNS-Mengen und der starken Verunreinigung durch Proteinbestandteile ist hier mit einer größeren Fehlerbreite zu rechnen.

Tabelle 2. Der Einfluß verschiedener Mengen Protein auf das Ergebnis von spektrophotometrischen RNS-Bestimmungen

Einwaage in $\mu\text{g/ml}$		$\frac{E_{260\text{ m}\mu}}{E_{280\text{ m}\mu}}$	Ergebnis der Bestimmung bei	
RNS	Humanalbumin ¹		268 $\text{m}\mu$ ²	260 und 280 $\text{m}\mu$ ³
25	—	0,48	22,5 $\mu\text{g/ml}$	25,1 $\mu\text{g/ml}$
25	200	0,57	25,5 $\mu\text{g/ml}$	24,2 $\mu\text{g/ml}$
25	400	0,64	28,6 $\mu\text{g/ml}$	24,0 $\mu\text{g/ml}$
25	1000	0,82	39,8 $\mu\text{g/ml}$	23,0 $\mu\text{g/ml}$

¹ Behring-Werke, Marburg.

² 11/0,285 $E_{268\text{ m}\mu} = \mu\text{g RNS/ml}$ (BURDON und SMELLIE 1961).

³ 56,8 $E_{260\text{ m}\mu} - 42,3 E_{280\text{ m}\mu} = \mu\text{g RNS/ml}$.

Vor uns wurde eine 2-Wellenlängenmethode bereits von TSANEV und MARKOV (1960) für NS-Bestimmungen vorgeschlagen, wie uns im Laufe dieser Untersuchung bekannt wurde. Diese Methode wurde von FLECK und MUNROE (1962) kritisiert. Aus der Kritik ergibt sich die Notwendigkeit, die Extraktionsbedingungen zu standardisieren sowie von Fall zu Fall eine Prüfung der Absorptionsverhältnisse der Proteinverunreinigung vorzunehmen, wie das in dieser Studie auch durchgeführt wurde.

RNS kann neben der spektrophotometrischen Bestimmung auch über Pentose- oder Phosphat-Bestimmungen an den Extrakten ermittelt werden. Nach unseren Erfahrungen sind RNS-Bestimmungen aufgrund des Pentose-Gehaltes bei Blattmaterial nicht anwendbar (Fehler über 100%!), während Phosphatbestimmungen ganz ähnliche Ergebnisse liefern wie die Spektrophotometrie, jedoch aufwendiger sind.

Weitere Bestimmungen. Chlorophyllbestimmungen wurden nach ARNON (1949) und Proteinbestimmungen nach LOWRY u. Mitarb. (1952) vorgenommen. Pyruvatkinase als Indicator einer Verunreinigung der Chloroplastenfraction mit Cytoplasma wurde nach BÜCHER und PFELEIDERER bestimmt (1955).

Berechnung der Ergebnisse. Wenn die RNS-Gehalte der Chloroplastenfraction und der gesamten Zelle sowie der Anteil der Chloroplasten am Gesamtmaterial der Zelle bekannt sind, dann läßt sich der durchschnittliche RNS-Gehalt des nicht-plastidischen Plasmateiles (von Cytoplasma und Zellkern) leicht berechnen. Ebenso erhält man den Anteil der Chloroplastenfraction an der Gesamt-RNS der Zelle. Nun ist die Chloroplastenfraction nicht rein, wie aus Enzymbestimmungen hervorgeht (HEBER 1960). Als Maß einer Verunreinigung der Chloroplastenfraction mit Cytoplasma wurde der Gehalt an Pyruvatkinase betrachtet unter der Voraussetzung, daß dieses Enzym in vivo nicht in den Chloroplasten vorkommt. Hierauf wird noch einzugehen sein. Die RNS-Werte der Chloroplastenfraction wurden dann auf eine cytoplasmatische Verunreinigung hin korrigiert. Einzelheiten der Berechnung, für die zwei verschiedene, die Ergebnisse gegenseitig kontrollierende Verfahren ausgearbeitet wurden, sind an anderer Stelle wiedergegeben

worden (HEBER, PON und HEBER 1963). Angaben zur Verteilung der RNS zwischen Chloroplasten und Cytoplasma stellen den Durchschnitt derjenigen Werte dar, die nach den beiden Verfahren errechnet wurden. Die Einzelwerte weisen dabei Abweichungen bis zu $\pm 15\%$ von den angegebenen Durchschnittswerten auf

Ergebnisse

Aus Tabelle 3 läßt sich der Einfluß verschiedener RNS-Extraktionsverfahren auf das Ergebnis von RNS-Bestimmungen an Blattgewebe

Tabelle 3. *Der Einfluß verschiedener RNS-Extraktionsverfahren auf das Ergebnis von RNS-Bestimmungen an Blattgewebe. RNS in mg/100 mg Blattprotein*

Material	KOH-Extrakt ¹	Perchlorsäure-Extrakt ²	Ribonuclease-Extrakt
Bohnen	6,30	5,95	5,63
Roggen	—	6,20	6,16
Klee	6,65	5,80	6,95
Tabak (Gewächshaus) . .	4,54	4,35	3,88
Spinat	8,15	6,95	8,30
Spinat	9,90	9,26	8,02
Spinat	5,70	5,65	5,28
Spinat	8,13	8,27	8,32

¹ Nach SCHMIDT-THANNHAUSER (1945).

² Nach KERN (1959): DNS + RNS.

ersehen. In Anbetracht der grundsätzlichen Verschiedenheit der angewandten Extraktionsverfahren muß die Übereinstimmung der Werte als befriedigend betrachtet werden. Dasselbe gilt auch für die Ergebnisse von RNS-Bestimmungen an Chloroplasten und an „Rückstand“, die hier nicht aufgeführt sind. In der Regel ergab die RNS-Extraktion mit KOH nach SCHMIDT-THANNHAUSER die höchsten Werte. Obwohl die Methode nach KERN (Extraktion mit warmer $2n\text{-HClO}_4$) im Gegensatz zur KOH-Extraktion neben der RNS auch die DNS fassen soll, wurden meist niedrigere Werte erhalten. Offenbar vermag die Säureextraktion unter den angewandten Bedingungen nicht alle Nucleinsäuren in Lösung zu bringen. Bei der enzymatischen RNS-Extraktion mit Ribonuclease ist zu berücksichtigen, daß möglicherweise nicht alle Nucleoproteide dem enzymatischen Angriff ausgesetzt sind, worauf Ergebnisse von SHIGEURA und CHARGAFF (1960) hinweisen. Insoweit ist damit zu rechnen, daß die Ribonuclease-Behandlung nicht alle RNS erfaßt. Jedoch kann der Fehler nicht groß sein, wie der Vergleich zur KOH-Hydrolyse nach SCHMIDT-THANNHAUSER anzeigt, die gleiche oder nur wenig höhere Werte liefert. Die Extraktion von RNS mittels Ribonuclease führt zu besser reproduzierbaren Werten als die beiden anderen Verfahren.

In Tabelle 4 sind Daten über den RNS-Gehalt der Chloroplastenfraktion, „reiner“ Chloroplasten und des nicht-plastidischen Plasmaanteiles zusammengestellt. Die RNS wurden hier mittels Ribonuclease aus dem Material extrahiert, doch führen die anderen Extraktionsmethoden zu ganz ähnlichen Ergebnissen. Übereinstimmend zeigt sich, daß im Cytoplasma bzw. dem Zellkern ein ganz wesentlich höherer RNS-Spiegel vorliegt als in den Chloroplasten. Da die Chloroplastenfraktion durch Cytoplasma verunreinigt ist, muß angenommen werden, daß der RNS-Gehalt reiner Chloroplasten niedriger ist als der der Chloroplasten-

Tabelle 4. RNS-Gehalte der Chloroplastenfraktion, „reiner“ Chloroplasten¹ und des nicht-plastischen Plasmaanteils in mg/100 mg Protein. Extraktion der RNS mittels Ribonuclease

Material	Chloroplasten-Fraktion	„Reine“ Chloroplasten ¹	Nicht-plastidischer Plasmaanteil (Cytoplasma + Zellkern)
Roggen, April 1961 . . .	5,6	5,2	7,7
Tabak, Juni 1962 (Gewächshaus)	3,6	3,0	5,8
Bohnen, Mai 1961	3,9	3,0	11,8
Spinat, März 1962	5,0	3,4	15,2
Spinat, Mai 1961	5,2	3,5	15,3
Spinat, August 1961 . . .	3,5	2,8	10,0
Spinat, Oktober 1962 . .	4,1	3,0	13,8
Spinat, November 1962 .	3,6	1,7	13,7

¹ Ermittelt mit Hilfe von Pyruvatkinase-Bestimmungen als Indicator einer Verunreinigung der Chloroplastenfraktion mit Cytoplasma.

fraktion. Wir haben nun versucht, auf folgende Weise den Gehalt reiner Chloroplasten an RNS zu ermitteln:

Es wurden Pyruvatkinase-Bestimmungen an den verschiedenen Zellfraktionen durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse wurde der Anteil der Chloroplasten an der gesamten Pyruvatkinase der Zelle errechnet. Dieser Anteil wurde als ein direktes Maß der Verunreinigung der Chloroplastenfraktion mit Cytoplasma gewertet. Aufgrund kinetischer Messungen der ¹⁴CO₂-Fixierung von Chloroplasten und Cytoplasma im Licht, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, können wir nämlich wahrscheinlich machen, daß Chloroplasten in vivo keine Pyruvatkinase enthalten. Der Anteil der Chloroplastenfraktion an Pyruvatkinase muß demnach aus dem Cytoplasma bzw. dem Zellkern stammen. Die RNS-Werte der Chloroplastenfraktion wurden nun auf eine Verunreinigung mit Cytoplasma in der Höhe, wie sie durch den Pyruvatkinasegehalt dieser Fraktion angezeigt wurde, korrigiert (HEBER, PON und HEBER 1963). So wurde der RNS-Gehalt „reiner“ Chloroplasten erhalten.

Aber selbst wenn die Chloroplasten tatsächlich geringe Mengen an Pyruvatkinase auch in vivo aufweisen, sind die korrigierten Werte von Interesse: Sie stellen dann die untere Grenze eines RNS-Gehaltes in den Chloroplasten dar, während der RNS-Gehalt der (durch eine geringe Menge Cytoplasma verunreinigten) Chloroplastenfraktion die obere Grenze wiedergibt. Der „wahre“ Wert würde dann zwischen den beiden Extremen liegen, die infolgedessen beide in Tabelle 4 wiedergegeben sind.

Aus der Tabelle ergibt sich nun, daß der RNS-Spiegel von Cytoplasma und Zellkern, zwischen denen die angewandte Methode keine Differenzierung erlaubt, bis zu fünffach höher sein kann als der reiner Chloroplasten. Da SERRA (1955) berichtet, daß in Pflanzenzellen der RNS-Gehalt von Zellkern und Cytoplasma etwa gleich hoch ist, spiegeln die für den nicht-plastidischen Plasmaanteil angegebenen RNS-Werte gleichzeitig die ungefähre Höhe des durchschnittlichen RNS-Gehaltes des Cytoplasmas wider.

Roggen und Tabak stellen insofern eine Ausnahme dar, als hier ein ungewöhnlich niedriger RNS-Spiegel im Cytoplasma gefunden wird. Das kommt besonders zum Ausdruck, wenn man den Anteil der Chloroplastenfraktion an der Gesamt-RNS der Zelle betrachtet (Tabelle 5). Die Chloroplastenfraktion umfaßt bei Roggen etwa 65% der gesamten Zell-RNS, während deren Anteil bei Bohnen und Spinat etwa zwischen 30 und 50% liegt.

Tabelle 5. *Der Anteil der Chloroplastenfraktion an der Gesamt-RNS der Blattzelle in %*

Material	Anteil der Chloroplastenfraktion am Gesamtprotein der Blattzelle %	Anteil der Chloroplastenfraktion an der Gesamt-RNS der Blattzelle		
		RNS-Extraktion mit		
		KOH	HClO ₄	Ribonuclease
Bohnen	76	57	47	52
Roggen	72	—	67	65
Tabak	66	44	51	58
Spinat, März	66	57	37	39
Spinat, Mai	70	42	47	44
Spinat, August	67	44	42	45
Spinat, Oktober	63	—	—	34
Spinat, November	65	30	35	33

Wenn man nun die Verteilung der RNS zwischen Chloroplasten einerseits und Cytoplasma und Zellkern andererseits mit Hilfe von RNS-Werten berechnet, die aufgrund der Pyruvatkinase-Bestimmungen korrigiert wurden, kommt man erwartungsgemäß zu einem geringeren Anteil der Chloroplasten an der Gesamt-RNS der Zelle (Tabelle 6): Roggen enthält immer noch etwa 50% der RNS der Zelle in den Chloroplasten, während bei dem restlichen Material, mit einer Ausnahme, etwa 25—35%

Tabelle 6. *Der Mindest-Anteil der Chloroplasten an der Gesamt-RNS der Blattzelle*¹

Material	Anteil „reiner“ Chloroplasten am Gesamtprotein der Blattzelle ¹ %	Anteil der Chloroplasten an der Zell-RNS in % ¹		
		RNS-Extraktion mittels		
		KOH	HClO ₄	Ribonuclease
Bohnen	68	42	34	34
Roggen	60	—	53	51
Tabak	52	17	30	38
Spinat, März	58	46	21	23
Spinat, Mai	60	22	28	25
Spinat, August	58	30	35	29
Spinat, Oktober	57	—	—	22
Spinat, November	56	11	16	13

¹ Ermittelt mit Hilfe von Pyruvatkinase-Bestimmungen an den einzelnen Fraktionen.

der gesamten RNS in den Chloroplasten lokalisiert sind. Der im November geerntete Spinat zeigt als Ausnahme einen überraschend niedrigen RNS-Gehalt in den Chloroplasten und, dementsprechend, einen niedrigen Chloroplastenanteil an der Gesamt-RNS der Zelle. Wir halten es für möglich, daß während der Dormanzperiode der RNS-Gehalt der Chloroplasten niedriger ist als während der Wachstumsperiode, in der sich rege Synthesevorgänge, insbesondere auch Proteinsynthese, in den Chloroplasten abspielen. Hier sind allerdings noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß die Berechnung der RNS-Verteilung in der Zelle mit Hilfe von korrigierten Chloroplasten-Werten, wie sie in Tabelle 6 durchgeführt wurde, den Mindestgehalt der Chloroplasten an RNS angibt. Wenn Pyruvatkinase, die wir als Indicator einer Verunreinigung der Chloroplastenfraktion mit Cytoplasma ansahen, oder ein anderes Enzym, das im optischen Pyruvatkinasetest reagiert, tatsächlich in den Chloroplasten vorkommen, dann wird der Anteil der Chloroplasten an der RNS der Zelle innerhalb des von den Tabellen 5 und 6 angezeigten Bereiches liegen. Die angegebenen Werte sind dann als Extreme aufzufassen. Wir glauben jedoch, daß die Werte der Tabelle 6 der in vivo-Situation besser Rechnung tragen als die der Tabelle 5.

Durch kurzes Zentrifugieren bei 1200 g in 0,05 m TRIS-Puffer läßt sich die chlorophyll-führende Lamellarfraktion von Chloroplasten, die in nicht-wäßrigem Medium isoliert wurden, sedimentieren, während die ungefärbten, löslichen Proteine (Stromafraktion) im Überstand verbleiben. Dieses Sedimentationsverhalten steht im Gegensatz zu dem von Chloroplasten, die aus Saccharose-Puffer isoliert und in hypotonischem Puffer aufgebrochen werden: Hier sedimentiert die Lamellarfraktion erst bei beträchtlich höherer Zentrifugalbeschleunigung. Mit

der Lamellarfraktion „nicht-wäßriger“ Chloroplasten, die 40—50% der Chloroplastenproteine umfaßt, sedimentieren etwa 25—35% der Chloroplasten-RNS, wie aus Tabelle 7 hervorgeht.

Tabelle 7. *Fraktionierung der Chloroplasten-RNS: Der Anteil der Lamellarfraktion an der Chloroplasten-RNS in %¹*

Material	% RNS in der Lamellarfraktion der Chloroplastenproteine
Bohnen . . .	26
Spinat . . .	28
Spinat . . .	33
Spinat . . .	35
Roggen . . .	37

¹ Chloroplasten wurden in 0,05 m TRIS, pH 8, suspendiert und 4 min bei 1200 g zentrifugiert, wobei die Lamellarfraktion sedimentiert. Aufarbeitung nach Alkohol-fällung wie üblich; RNS-Extraktion mit Ribonuclease.

Die Werte der Tabelle 8 differenzieren die Chloroplasten-RNS weiter: Hier ist die Chloroplasten-RNS in eine bei 1200 g und eine weitere bei 100000 g sedimentierbare Fraktion aufgeteilt, während eine dritte, „lösliche“ Fraktion im Überstand der 100000 g-Zentrifugierung verbleibt. Beim Zentrifugieren in

Tabelle 8. *Fraktionierung der Chloroplasten-RNS: Der Einfluß von Mg-Ionen auf das Sedimentationsverhalten der Chloroplasten-RNS¹*

Material	Lamellarfraktion %	„Ribosomen“-Fraktion %	„Lösliche“ RNS %
Spinat — Mg ⁺⁺	19	54	27
Spinat + Mg ⁺⁺	57	26	17
Spinat — Mg ⁺⁺	16	18	66
Spinat + Mg ⁺⁺	45	25	30
Tabak — Mg ⁺⁺	17	42	41
Tabak + Mg ⁺⁺	30	49	21

¹ Chloroplasten wurden in 0,05 m TRIS, pH 7,5, mit oder ohne 0,01 m MgCl₂ suspendiert. Die Lamellarfraktion wurde in 4 min bei 1200 g und die „Ribosomen“-Fraktion danach in 60 min bei 100000 g sedimentiert, während die „lösliche“ RNS im Überstand verblieb.

TRIS-Puffer beträgt der Anteil der „löslichen“ RNS 30—60% der gesamten Chloroplasten-RNS; beim Zentrifugieren in Gegenwart von 10⁻² m MgCl₂ geht er zurück auf 20—30%. Dafür steigt der in der Lamellarfraktion enthaltene RNS-Anteil stark an. Das ist ein Hinweis darauf, daß ein beträchtlicher Anteil der Chloroplasten-RNS mit dem Lamellarsystem der Chloroplasten assoziiert ist. Das Verhalten eines Teiles der Chloroplasten-RNS gegen Mg-Ionen spricht dafür, daß es sich hier um ribosomale Teilchen handelt, die ja bekanntlich in Gegenwart von Mg-Ionen reversibel aggregieren und dadurch bei 100000 g leicht sedimentiert werden können. Aufgrund des Sedimentationsverhaltens ist ein dritter Teil der Chloroplasten-RNS offenbar der niedermolekularen „löslichen“ RNS zuzuordnen.

Die Untersuchungen an der Chloroplasten-RNS werden durch das Vorkommen einer aktiven Ribonuclease in den Chloroplasten erschwert, die einen beträchtlichen Teil der RNS während der Untersuchung abbaut, wenn nicht geeignete Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Wir haben bis zu 20% RNS-Abbau in 5 min bei 20° C beobachtet. Deshalb wurde die RNS-Fraktionierung an Chloroplastenpräparaten mit niedrigem Ribonucleasegehalt bei 0° C vorgenommen. In Abb. 2 ist das Verschwinden alkohol-fällbarer RNS aus Chloroplastensuspensionen in TRIS-Puffer dargestellt.

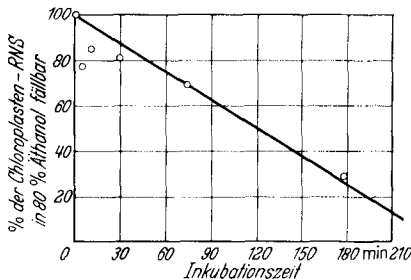


Abb. 2

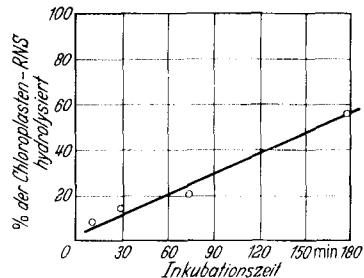


Abb. 3

Abb. 2. Hydrolyse von Chloroplasten-RNS durch endogene Ribonuclease. *Bedingungen:* Spinat-Chloroplasten wurden verschiedene Zeiten in TRIS-Puffer, pH 7,5, bei 20° C inkubiert. Das durch Alkohol-fällung erhaltene Material wurde wie beschrieben gewaschen und mit Ribonuclease extrahiert. RNS-Bestimmung an den Extrakten

Abb. 3. Hydrolyse von RNS aus Chloroplastenmaterial, das in Äthanol gekocht und mehrmals mit 1%iger Perchlorsäure gewaschen worden war, in TRIS, pH 7,5, bei 20° C

Das Enzym, das den RNS-Abbau bewirkt, ist offenbar hitze- und säurestabil: Es übersteht die unter „Methodik“ geschilderte Behandlung der Chloroplasten mit heißem Alkohol und Säure, wie Abb. 3 dokumentiert. In dieser Abbildung ist das Austreten von RNS-Hydrolyseprodukten aus Chloroplasten, die mit heißem Alkohol von Lipoiden befreit und mit 1%iger Perchlorsäure gewaschen worden waren, in Abhängigkeit von der Zeit wiedergegeben.

Neben den RNS-Bestimmungen wurden auch spektrometrische DNS-Bestimmungen anhand der 2-Wellenlängenmethode durchgeführt. Das Verhältnis von RNS zu DNS in Blattgewebe lag zwischen 5 und 8. Die Chloroplastenfraction enthielt zwischen 10 und 20% der DNS der Zelle. Unter Berücksichtigung einer Verunreinigung dieser Fraction durch Cytoplasma, wie sie durch Pyruvatkinase-Bestimmungen angezeigt wurde, ergab sich jedoch, daß reine Chloroplasten analytisch faßbare Mengen an DNS nicht enthalten. Die im Vergleich zu den RNS-Bestimmungen hohe Fehlergrenze der DNS-Bestimmung erlaubt jedoch noch keine endgültige Aussage.

Diskussion

Aufgrund der Feststellung eines Nucleoproteides in Chloroplastenfraktionen vermutete MENKE (1938), daß Nucleinsäuren Bestandteile der Chloroplasten sind. Histochemische Untersuchungen führten METZNER (1952), CHIBA (1951) und SPIEKERMANN (1957) zu der Ansicht, daß Chloroplasten neben RNS auch DNS enthalten. Es ist nun versucht worden, diese NS auch als Bestandteile isolierter Chloroplasten nachzuweisen und dabei gleichzeitig Aufschluß über die quantitativen Verhältnisse zu erhalten. Diese Versuche haben zu recht divergierenden Befunden geführt. Nach sorgfältiger Reinigung von Chloroplasten finden JAGENDORF und WILDMAN (1954), JAGENDORF (1955), NAKAMURA, CHOW und VENNESLAND (1959) sowie KERN (1959) nur sehr geringe Mengen RNS in ihren Chloroplastenpräparationen. Die beiden erstgenannten Autoren halten aufgrund ihrer niedrigen Werte (0,4—0,9 mg RNS/100 mg Protein¹) die Annahme für möglich, daß NS gar nicht in Chloroplasten vorkommen und die gefundenen Anteile eine Verunreinigung der Chloroplastenfraktion mit Cytoplasma reflektieren.

Später sind jedoch wesentlich höhere RNS-Werte in isolierten Chloroplasten gefunden worden. So geben CHIBA und SUGAHARA (1957) sowie WOLLGIEHN (1961) für Tabakchloroplasten RNS-Werte von etwa 4 mg/100 mg Protein an. BÖTTGER und WOLLGIEHN (1958) finden 1,8—3,6 mg RNS, COOPER und LORING (1957) etwa 4 mg RNS/100 mg Chloroplastenprotein, während SISSAKIAN und ODINZOWA (1956) 0,5 bis 3,5% des Trockengewichtes als RNS betrachten (etwa 1—6 mg RNS/100 mg Protein). SZARKOWSKI und GOLASZEWSKI (1961) berichten sogar über RNS-Gehalte in Chloroplasten in Höhe von 5—18 mg/100 mg Protein.

METZNER (1952) erhebt nun gegen RNS-Bestimmungen an Chloroplasten nach deren Isolierung aus wäßriger Lösung folgenden Einwand: Er hält es für möglich, daß beim Homogenisieren von Gewebe in wäßrigem Milieu sekundär in oder an den Chloroplasten Nucleoproteide, deren Nucleinsäureanteil aus dem Cytoplasma stammen mag, gebildet und bei der Isolierung dann mitgerissen werden. Eine solche Bildung von Nucleoproteiden aus NS und Protein ist seit langem wohlbekannt. Ebenso ist natürlich ein Auslaugen von NS aus den Chloroplasten heraus möglich. Die RNS-Gehalte der so isolierten Chloroplasten würden dann unkontrollierbar sein und nicht die Verhältnisse in der intakten Zelle widerspiegeln. METZNERs Ansicht wird gestützt durch Befunde von CAYEN und NORRIS (1953), die sekundäre Veränderungen der Lokalisation von NS in der Zelle beim experimentellen Eingriff beobachten konnten.

¹ Hier wie im folgenden sind die Daten der Autoren auf mg RNS/100 mg Protein umgerechnet.

Im Gegensatz zur Chloroplastenisolierung aus wäßrigem Milieu ist eine sekundäre Lageveränderung von NS während der Isolierungsprozedur unmöglich, wenn die Chloroplasten in einem Medium isoliert werden, in dem NS völlig unlöslich sind. Wir haben Blätter in flüssige Luft geworfen und dann bei -25°C gefriergetrocknet. Diese Behandlung schließt eine Diffusion von NS vom Orte ihrer ursprünglichen Lokalisation in der Zelle hinweg zuverlässig aus. Erst aus dem getrockneten Zellmaterial wurden Chloroplasten isoliert, wobei als Medium ein Gemisch von Petroläther/Tetrachlorkohlenstoff diente, in dem NS nicht löslich sind. Auch hierbei sind Lageveränderungen der NS innerhalb der Zelle ausgeschlossen. Eine sekundäre, artifizielle Bildung von Nucleoproteiden, die dann mit den Chloroplasten sedimentieren können und somit erhöhte RNS-Gehalte vortäuschen, kann also ebensowenig stattfinden wie ein Auslaugen von NS während der Isolierung. Trotzdem finden wir RNS-Gehalte zwischen 3 und 6 mg/100 mg Protein in der Chloroplastenfraction. BIGGINS und PARK (1961), die ebenfalls aus nichtwäßrigem Milieu erhaltene Chloroplastenpräparationen verwenden, geben sogar 7,5 Gewichtsprozent RNS (bzw. etwa 14 mg RNS/100 mg Protein) in Chloroplasten an. Allerdings berücksichtigen sie nicht eine Verunreinigung ihrer Fraktionen mit Cytoplasma. Obwohl lichtmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen (THALACKER und BEHRENS 1959, HEBER und TYSZKIEWICZ 1962, STOCKING und ONGUN 1962) keinen Aufschluß über eine solche Verunreinigung geben, ist auch nach unserer Methode eine „mechanische“ Verunreinigung der erhaltenen Chloroplastenfraction mit Cytoplasma möglich, wie aus enzymatischen Untersuchungen hervorgeht (HEBER 1960). Aber auch wenn man die erhaltenen Werte auf das Maximum einer möglichen Verunreinigung hin korrigiert, wie das in den Tabellen 4 und 6 geschehen ist, bleibt noch ein substantieller Anteil der Gesamt-RNS einer Zelle als Inhaltsbestandteil der Chloroplasten bestehen. Dieser Anteil variiert in den meisten Experimenten zwischen 25 und 35%. Gewisse Anzeichen deuten darauf hin, daß auch physiologische Schwankungen im RNS-Gehalt der Chloroplasten auftreten können, worauf SISSAKIAN und ODINZOWA (1954) sowie SZARKOWSKI und GOLASZEWSKI (1961) bereits aufmerksam gemacht haben.

Bisher existieren nur wenige Angaben über den Anteil der Chloroplasten an der Gesamt-RNS der Zelle. Bei *Euglena* enthält eine durch nichtplastidische Bestandteile verunreinigte Chloroplastenfraction im Regelfalle 10—15% der RNS der Zelle (BRAWERMAN und CHARGAFF 1959, BRAWERMAN, POGO und CHARGAFF 1962). Bei *Acetabularia* werden dagegen 81% der RNS in der Chloroplastenfraction gefunden (NAORA, NAORA und BRACHET 1961). Schließlich gibt WOLLGIEHN (1961) in weitgehender Übereinstimmung mit unseren Befunden für Tabakblätter

25—35% der RNS als Bestandteil der Chloroplastenfraktion an, erwähnt aber Verunreinigungen seiner Fraktion (60% der DNS in der Chloroplastenfraktion!), die die Werte als unsicher erscheinen lassen. Unsere Befunde einer Lokalisation von 30—60% der RNS in der Chloroplastenfraktion spiegeln sicher nicht die in vivo-Situation wider, da unsere Chloroplastenfraktion durch Cytoplasma mit hohem RNS-Gehalt verunreinigt ist. Die nach der Korrektur erhaltenen Werte von 25—35% sind jedoch als Minimalwerte anzusehen, die sicher in den Chloroplasten auch in vivo vorkommen. Möglicherweise ist in vivo sogar noch mehr RNS in den Chloroplasten zu finden, jedoch keinesfalls mehr als durch die Werte der Chloroplastenfraktion angezeigt.

Das Vorkommen von RNS in den Chloroplasten kann somit als gesichert betrachtet werden. Der RNS-Spiegel der Chloroplasten beträgt jedoch nur etwa ein Drittel bis ein Viertel dessen im Cytoplasma. Die RNS der Chloroplasten scheint sich ebenso wie die des Cytoplasmas in eine „lösliche“ und eine ribosomale Fraktion aufzuteilen, die sich durch fraktionierte Zentrifugierung trennen lassen: Von LYTTLETON (1962) sowie MIKULSKA, ODINZOWA und SISSAKIAN (1962) ist die Isolierung von Ribosomen aus Chloroplasten berichtet worden. Eigene Untersuchungen ergaben, daß in „nichtwäßrigen“ Chloroplasten ein großer Teil der endogenen RNS mit dem Lamellensystem assoziiert ist und mit diesem durch Zentrifugieren bei 1200 g sedimentiert werden kann. Der nicht-gebundene Anteil läßt sich durch Zentrifugieren bei 100000 g in Gegenwart von Mg-Ionen in „Ribosomen“ und „lösliche“ RNS fraktionieren.

Jedoch werden solche Untersuchungen durch das Vorkommen einer aktiven Ribonuclease in der Chloroplastenfraktion kompliziert. Ribonucleasen sind in Chloroplasten von SISSAKIAN und ODINZOWA (1956), von NAKAMURA, CHOW und VENNESLAND (1959) sowie von SZARKOWSKI, GOLASZEWSKI und OMBACH (1962) angegeben worden. In unseren Versuchen wurden innerhalb von 5 min bis zu 20% der endogenen Chloroplasten-RNS im gepufferten Medium abgebaut. Dieser Befund läßt es als sehr zweifelhaft erscheinen, daß der Einbau von radioaktiven Aminosäuren in das Protein von isolierten Chloroplasten in vitro, der von verschiedener Seite beobachtet wurde (STEPHENSON, THIMANN und ZAMECNIK 1956, SISSAKIAN und FILIPPOVITCH 1959, HEBER 1962), tatsächlich eine Synthese von Protein widerspiegelt: Es ist sehr wahrscheinlich, daß sowohl die Template-RNS als auch lösliche Ribonucleinsäuren, die für die Synthese von Protein erforderlich sind, während der zur Chloroplastenisolierung benötigten Zeit durch die Ribonuclease inaktiviert werden. Zur Inaktivierung genügt ja bereits die Lösung weniger Bindungen. Wir haben bereits früher auf die Möglichkeit von Artefakten bei solchen in vitro-Untersuchungen hingewiesen. Aus unseren ^{14}C -Ver-

suchen an Blättern *in vivo* (HEBER 1962) geht jedoch zweifelsfrei hervor, daß die Chloroplasten zur Proteinsynthese befähigt sind und zu einem beträchtlichen Teil zur Eiweißsynthese des Blattes beitragen.

Diese Befunde finden eine indirekte Bestätigung durch die hier mitgeteilten Resultate sowie durch die Ergebnisse der Arbeiten von BOVÉ und RAACKE (1959) und von LITTLETON (1962), die zuerst aminosäureaktivierende Enzyme und Ribosomen in isolierten Chloroplasten nachweisen konnten: Nach den heutigen Kenntnissen findet die peptidische Verknüpfung von Aminosäuren, ein Hauptschritt der Proteinsynthese, an Ribosomen statt, nachdem die Aminosäuren durch spezifische Enzyme aktiviert und von löslichen Ribonucleinsäuren auf die Ribosomen übertragen wurden. Das Vorkommen aller dieser Stoffe in Chloroplasten erscheint heute gesichert, so daß nunmehr die Beweiskette für die Synthese spezifischer Proteine in Chloroplasten geschlossen sein dürfte.

Obwohl wir RNS mit Sicherheit in den Chloroplasten nachweisen können, ist uns ein solcher Nachweis für DNS nicht gelungen. Wir befinden uns mit diesem negativen Ergebnis in Übereinstimmung mit MENKE und einigen anderen Forschern (MENKE 1960) und vermuten, daß die relativ hohen DNS-Werte in Chloroplasten von 1—3 mg/100 mg Protein, über die COOPER und LORING (1957) sowie CHIBA und SUGAHARA (1957) neben anderen berichten, aufgrund einer Verunreinigung der Chloroplastenfraktionen mit Kernmaterial zu erklären sind, wie das vor allem auch bei WOLLGIEHN (1961) ersichtlich wird. Neuerdings hat jedoch WOLLGIEHN (1963) klare Befunde erhalten, denen zufolge junge Chloroplasten Thymidin einbauen und somit Merkmale des DNS-Stoffwechsels zeigen.

Zusammenfassung

Das Vorkommen von Nucleinsäuren in Chloroplasten wurde untersucht. Um Artefakte durch eine Sekundärverlagerung von Nucleinsäuren während der Präparation auszuschließen, die bei der üblichen Chloroplastenisolierung in Saccharose- oder NaCl-Puffer möglich sind, wurden Chloroplasten nach Gefriertrocknung von Blättern in einem nicht-wäßrigen Medium isoliert. Es ergab sich, daß reine Chloroplasten von Bohnen, Roggen, Tabak und Spinat 2—5 mg RNS/100 mg Protein enthalten. Der nicht-plastische Plasmaanteil wies demgegenüber einen durchschnittlichen RNS-Gehalt von 10—15 mg RNS/100 mg Protein auf. Der RNS-Spiegel von Chloroplasten liegt somit wesentlich niedriger als der des restlichen Plasmas. Der Anteil der Chloroplasten an der Gesamt-RNS der Blattzelle ist im Regelfalle höher als 25—35%.

Ein beträchtlicher Anteil der Chloroplasten-RNS ist mit dem Lamellarsystem der Chloroplasten assoziiert. Aufgrund des Sedimentationsverhaltens kann weiter auf das Vorhandensein von hochmolekularer, „ribosomaler“, und niedermolekularer, „löslicher“ RNS geschlossen werden.

Die Chloroplasten enthalten eine hitze-, alkohol- und säurestabile Ribonuclease, die RNS schnell abbaut.

Summary

The occurrence of nucleic acids in chloroplasts has been investigated. Chloroplasts were isolated from freeze-dried leaves in a non-aqueous procedure, since isolation techniques in aqueous media do not exclude the possibility of artifacts due to leaching of nucleic acids from or adsorption onto the chloroplasts. Chloroplasts of rye, broad bean, tobacco and spinach leaves were found to contain, after suitable corrections for cytoplasmic contaminations of the chloroplast fraction were made, between 2 and 5 mg RNA/100 mg protein. The RNA content of the non-chloroplast part of the cell plasm was about 10 to 15 mg/100 mg protein. Since nuclei and cytoplasm are supposed to contain approximately equal amounts of RNA, this figure also reflects the RNA content of the cytoplasm. Thus, chloroplasts possess, on a unit protein basis, considerably less RNA than the surrounding cytoplasm. However, since the major part of the cell proteins is located in the chloroplasts (50 to 60%), still at least 25 to 35% of the total RNA of the leaf cell are contained in the chloroplasts.

A considerable part of the chloroplastic RNA, possibly of ribosomal nature, is associated with the lamellar system of the chloroplast. From ultracentrifugal studies it is concluded, that chloroplasts also contain soluble and ribosomal RNA.

The investigation of chloroplastic RNA is complicated because of the presence of an alcohol- and heat-resistant ribonuclease in the chloroplasts.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und Herrn Prof. Dr. H. ULLRICH sei für die Unterstützung dieser Untersuchung, Fräulein RENATE SUSTMANN für ihre einsatzfreudige und sorgfältige Mitarbeit gedankt.

Literatur

- ARNON, D. I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1—15 (1949).
- BIGGINS, J., and R. B. PARK: The nucleic acid content of *Spinacia oleracea* chloroplasts. *Univ. Calif. Radiat. Lab. Report 9900*, 39—45 (1961).
- BÖTTGER, I., u. R. WOLLGIEHN: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel in grünen Blättern höherer Pflanzen. *Flora (Jena)* **146**, 302—320 (1958).
- BOVÉ, J., and I. D. RAACKE: Amino acid activating enzymes in isolated chloroplasts from spinach leaves. *Arch. Biochem.* **85**, 521—531 (1959).
- BRAWERMAN, G., and E. CHARGAFF: Changes in protein and ribonucleic acids during the formation of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **31**, 164—171 (1959).
- , A. O. POGO and E. CHARGAFF: Induced formation of ribonucleic acids and plastid protein in *Euglena gracilis* under the influence of light. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **55**, 326—334 (1962).
- BÜCHER, TH., and G. PFLEIDERER: Pyruvate kinase from muscle. In: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. I, pp. 435—440. New York 1955.
- BURDON, R. H., and R. M. S. SMELLIE: The incorporation of uridine-5'-phosphate into ribonucleic acids by the enzyme fractions from Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **51**, 153—162 (1961).
- CHIBA, Y.: Cytochemical studies on chloroplasts I. Cytologic demonstration of nucleic acids in chloroplasts. *Cytologia (Tokyo)* **16**, 259—264 (1951).

- CHIBA, Y., and K. SUGAHARA: The nucleic acid content of chloroplasts isolated from spinach and tobacco leaves. *Arch. Biochem.* **71**, 367—376 (1957).
- COOPER, W. D., and H. S. LORING: Ribonucleic acid composition and phosphorus distribution of chloroplasts from normal and diseased Turkish tobacco plants. *J. biol. Chem.* **228**, 813—822 (1957).
- FLECK, A., and H. N. MUNROE: The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **55**, 571—583 (1962).
- GRANICK, S.: Plastid structure, development and inheritance. In: W. RULAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. I, S. 507—564. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- HEBER, U.: Über die Lokalisation von löslichen Zuckern in der Pflanzenzelle. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **70**, 371—382 (1957).
- Vergleichende Untersuchungen an Chloroplasten, die durch Isolierungsoperationen in nicht-wässrigem Milieu erhalten wurden. II. Kritik der Reinheit und Ferment-Lokalisationen in Chloroplasten. *Z. Naturforsch.* **15b**, 100—109 (1960).
- Protein synthesis in chloroplasts during photosynthesis. *Nature (Lond.)* **195**, 91—92 (1962).
- , N. G. PON and M. HEBER: Localization of carboxydismutase and triosephosphate dehydrogenases in chloroplasts. *Plant Physiol.* **38** (1963) im Druck.
- , and E. TYSZKIEWICZ: The rate of photosynthesis in isolated chloroplasts. *J. exp. Bot.* **13**, 185—200 (1962).
- JAGENDORF, A. T.: Purification of chloroplasts by a density technique. *Plant Physiol.* **30**, 138—142 (1955).
- , and S. G. WILDMAN: The proteins of green leaves II. *Plant Physiol.* **29**, 270—279 (1954).
- KERN, H.: Über das Vorkommen von Nucleinsäuren in isolierten Chloroplasten. *Protoplasma (Wien)* **50**, 505—543 (1959).
- Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Nucleinsäuren in grünen Blättern. *Planta (Berl.)* **53**, 595—601 (1959).
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
- LYTTLETON, J. W.: Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts. *Exp. Cell Res.* **26**, 312—317 (1962).
- MARCUS, A.: Amino acid dependent exchange between pyrophosphate and ATP in spinach preparations. *J. biol. Chem.* **234**, 1238—1240 (1959).
- MENKE, W.: Untersuchungen über das Protoplasma grüner Pflanzenzellen I. Isolierung von Chloroplasten aus Spinatblättern. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **257**, 43—48 (1938).
- Über das Modell der Plastidenmutation. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 152—157 (1960).
- Structure and chemistry of plastids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**, 27—44 (1962).
- METZNER, H.: Über den Nachweis von Nucleinsäuren in den Chloroplasten höherer Pflanzen. *Naturwissenschaften* **39**, 64 (1952).
- Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nucleinsäuren in Chloroplasten. *Biol. Zbl.* **71**, 257—272 (1952).
- MIKULSKA, E., M. S. ODJINTSOVA and N. M. SISSAKIAN: On the isolation of ribosomes from chloroplasts. *Naturwissenschaften* **49**, 549 (1962).
- NAKAMURA, H., C. T. CHOW and B. VENNESLAND: Note on the distribution of phosphorus in photophosphorylating spinach chloroplast preparations. *J. biol. Chem.* **234**, 2202—2204 (1959).
- NAORA, H., H. NAORA and J. BRACHET: Independent synthesis of cytoplasmic ribonucleic acids in *Acetabularia mediterranea*. *J. gen. Physiol.* **43**, 1083—1102 (1960).

- OGUR, M., and G. ROSEN: The nucleic acids of plant tissues I. The extraction and estimation of deoxyribose nucleic acid and ribose nucleic acid. *Arch. Biochem.* **25**, 262—276 (1950).
- SCHMIDT, G., and S. J. THANNHAUSER: A method for the determination of deoxyribonucleic acids and phosphoproteins in animal tissues. *J. biol. Chem.* **161**, 83—89 (1945).
- SERRA, J. A.: Chemistry of the nucleus. In: W. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. I, S. 413—444. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- SHIGEURA, H. T., and E. CHARGAFF: Action of ribonuclease on a ribosomal ribonucleoprotein. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **37**, 347—349 (1960).
- SISSAKIAN, N. M., and I. I. FILIPPOVITCH: Proteinsynthese und Zellstrukturen. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.* **1959**, 839—854. *Ref. Chem. Abstr.* **54**, 16495 (1960).
- , u. M. S. ODJINTSOVA: Über die Veränderungen der Plastiden-RNS im Entwicklungsgang eines Organismus. *Dokl. Akad. Nauk SSSR, N.S.* **97**, 119 (1954). *Ref. Protoplasma (Wien)* **50**, 505 (1959).
- — The ribonucleic acid of plastids and its conversion in the process of the organism's development. *Biochimija* **21**, 577—582 (1956). *Ref. Chem. Abstr.* **51**, 5919 (1956).
- SPIEKERMANN, R.: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Proplastiden. *Protoplasma (Wien)* **48**, 303—324 (1957).
- STEPHENSON, M. L., K. V. THIMANN and P. C. ZAMECNIK: Incorporation of ¹⁴C-amino acids into proteins of leaf disks and cell free fractions of tobacco leaves. *Arch. biochem. Biophys. (Amst.)* **65**, 194—209 (1956).
- STOCKING, C. R., and A. ONGUN: The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. *Amer. J. Bot.* **49**, 284—289 (1962).
- SZARKOWSKI, J. W., u. T. GOLASZEWSKI: RNS-Gehalt der Plastiden von grünen und etiolierten Pflanzen. *Naturwissenschaften* **48**, 457 (1961).
- — u. M. OMBACH: Die Ribonucleaseaktivität in Plastiden. *Naturwissenschaften* **49**, 135 (1962).
- THALACKER, R., u. M. BEHRENS: Über den Reinheitsgrad der in einem nicht-wäßrigen spezifischen Gewichtsgradienten gewonnenen Chloroplasten. *Z. Naturforsch.* **14b**, 443—446 (1959).
- TSANEV, R., and G. G. MARKOV: Substances interfering with spectrophotometric estimations of nucleic acids and their elimination by the two-wavelength method. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **42**, 442—452 (1960).
- WOLLGIEHN, R.: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsel in grünen Blättern. II. *Flora (Jena)* **150**, 117—127 (1961).
- 1963: Private Mitteilung.

Priv.-Doz. Dr. U. HEBER,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität,
53 Bonn a. Rh., Meckenheimer Allee 176