ähnlicher Weise auch in anderen Organen auftreten. Möglicherweise werden auf diesem Wege, unter Berücksichtigung der im Gehirn (s. Tab. 1) nachweisbaren ^{14}C -Aktivität, auch Erklärungen für solche neurotoxischen OPV-Wirkungen zu finden sein, welche nicht auf eine Cholinesterasehemmung zurückgeführt werden können.

Zur weiteren Klärung dieser bemerkenswerten Relationen müssen die Reaktionen phosphororgani-

scher Insektizide an biologischen Substraten, speziell Proteinen, noch umfangreichen Untersuchungen unterworfen werden. Diese sind nicht zuletzt durch die Tatsache besonders aktuell, daß es erste Anhaltspunkte für eine kanzerogene Wirkung dieser Verbindungen gibt⁴ und darüber hinaus in letzter Zeit auch die mutagene Aktivität phosphororganischer Insektizide näher untersucht wird⁹⁻¹².

⁹ G. LÖFROTH, CHUL KIM u. S. HUSSAIN, *Environmental Mutagen Soc. News Letter* Nr. 2 [1969].

¹⁰ V. BENES u. R. SRAM, *Ind. Medicine* **38**, 50 [1969].

¹¹ R. GRUNOW, KH. LOHS u. E. GEISSLER, *Z. Naturforsch.* **23b**, 1226 [1968].

¹² KH. LOHS, E. HILSCHER, R. GRUNOW u. E. GEISSLER, in Vorbereitung.

Volumen, Trockengewicht und Zusammensetzung von Etioplasten und ihren Ergrünungsstadien

Volume, Dry Weight, and Composition of Etioplasts and Greening Plastids

K. LÜRSSEN

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut)
Abteilung Menke, Köln 30

(*Z. Naturforsch.* **25 b**, 1113—1119 [1970]; eingegangen am 3. Juni 1970)

Volume, dry weight, and composition of etioplasts, of greening etioplasts and of chloroplasts were determined. During greening there was a threefold increase in volume, whereas the dry weight only doubled. Thus the relative water content was lower in etioplasts than in chloroplasts. There was no difference in the amount of plastid stroma between etioplasts and chloroplasts, but the content of water-insoluble substances increased from $3.9 \cdot 10^{-12}$ g to $12.3 \cdot 10^{-12}$ g during plastid development. The insoluble proteins increased from $1.5 \cdot 10^{-12}$ g in etioplasts to $6.6 \cdot 10^{-12}$ g in chloroplasts. After an initial decrease from $2.4 \cdot 10^{-12}$ g to $1.8 \cdot 10^{-12}$ g the total lipid content reached $5.7 \cdot 10^{-12}$ g in chloroplasts. There were only quantitative changes in lipid composition during plastid development. Both chloroplasts and etioplasts contained the major colourless lipids: monogalactosyl-diglyceride, digalactosyl-diglyceride, phosphatides, and the sulfoquinovosyl-diglyceride. Furthermore, it was observed that the spectrad composition of the light in which the plants were grown had great influence on the dry weight of the chloroplasts, though the percent composition, except chlorophyll b, was not affected.

Über die chemische Zusammensetzung der Etioplasten und ihrer Entwicklungsstadien liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. ORTH und CORNWELL¹ bestimmten den Stickstoff- und Phosphorgehalt der Etioplasten, MEGO und JAGENDORF² den Stickstoffgehalt und den Lipidanteil. Die Fettsäuren analysierte NEWMAN³. LOCKSHIN und BURRIS⁴ ge-

lang es, das Plastidenzentrum der Etioplasten in Lösung zu bringen und die Aminosäuren-Zusammensetzung zu ermitteln. DURANTON⁵ berichtet über Nucleinsäuren und Proteine der Etioplasten von *Zea mays*. Lediglich die Biochemie der Chlorophyllsynthese im Verlaufe des Ergrünnens wurde eingehender untersucht⁶.

Sonderdruckanforderungen an Dr. K. LÜRSSEN, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung Menke, D-5000 Köln-Vogelsang.

¹ G. M. ORTH u. D. G. CORNWELL, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **71**, 734 [1963].

² J. L. MEGO u. A. T. JAGENDORF, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **53**, 237 [1961].

³ D. W. NEWMAN, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **9**, 179 [1962].

⁴ A. LOCKSHIN u. R. H. BURRIS, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **56**, 1564 [1966].

⁵ J. DURANTON, Dissertation, Paris 1965.

⁶ W. L. BUTLER u. W. R. BRIGGS, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **112**, 45 [1966]; M. GASSMAN u. L. BOGORAD, *Plant Physiol.* **42**, 774 [1967]; M. GASSMAN u. L. BOGORAD, **42**, 781 [1967]; S. KLEIN u. A. POLJAKOFF-MAYBER, *J. biophysic. biochim. Cytol.* **11**, 433 [1961]; V. M. KOSKI, *Arch. Biochemistry* **29**, 339 [1950]; V. M. KOSKI et al., *Arch. Biochem. Biophysics* **31**, 1 [1951]; J. H. C. SMITH u. A. BENITEZ, *Plant Physiol.* **29**, 135 [1954]; H. J. VIRGIN, *Physiol. Plant* **8**, 389 [1955]; H. J. VIRGIN et al., *Photochem. Photobiol.* **2**, 83 [1963].

Um zu einem genaueren Bild der chemischen Veränderungen in den Plastiden während ihrer Entwicklung zu Chloroplasten zu gelangen, wurden einzelne Plastidenbestandteile in verschiedenen Entwicklungsstadien quantitativ bestimmt. Da die bisher angegebenen Methoden zur Isolierung von Etioplasten nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten⁷, wurde zunächst ein Verfahren gesucht, das es erlaubt, die Plastiden in so reiner Form zu isolieren, daß Verunreinigungen nicht mehr nachzuweisen waren. Darüberhinaus mußten die Plastiden — um einen Substanzverlust zu vermeiden — auch strukturell erhalten bleiben.

Wenn bei derartigen Untersuchungen die Analyseergebnisse auf das Trockengewicht der Plastidenpräparate bezogen werden, so geben sie die chemischen Veränderungen bei der Umwandlung von Etioplasten zu Chloroplasten nur unvollständig wieder, da beim Ergrünen das Trockengewicht der Plastiden nicht konstant bleibt. Bezieht man jedoch, wie in dieser Arbeit, die Analyseergebnisse auf die Zahl der in den Analysenproben enthaltenen Plastiden, so lassen sich Synthese und Abbau der Plastidenbestandteile quantitativ verfolgen und zu den morphologischen Veränderungen, die man in den Plastiden beobachtet hat, in Beziehung setzen.

Material und Methoden

Anzucht der Pflanzen: Saatgut von *Zea mays*, Sorte Velox, wurde nach 48-stdg. Quellen in Wasser in Sand ausgelegt und bei 25 °C angezogen. Zur Gewinnung der Etioplasten erfolgte die Anzucht in einer Dunkelkammer. Die Plastiden verschiedener Ergrünungsstadien wurden aus etiolierten Pflanzen, die unterschiedlich lange belichtet wurden, isoliert. Die Belichtung fand in einem Gewächshaus mit Zusatzbeleuchtung von etwa 8000 Lux statt (Philips HPLRH 400 W oder HLRG 400 W). Außerdem wurden grüne Pflanzen zur Isolierung von Chloroplasten angezogen. Die Ernte der Blätter erfolgte jeweils 11 Tage nach der Aussaat. Die etiolierten Pflanzen wurden bei schwacher, grüner Beleuchtung geerntet.

Isolierung der Plastiden: Etwa 350 bis 500 g Blätter wurden mit 1500 ml Isolierungsmedium (0,25 M Saccharose, 0,05 M Trispuffer-HCl pH 7,8, 0,01% Rinderserumalbumin; verändert nach l. c.⁸), in einer Dreiwalzenmühle zerkleinert. Das Blatthomogenat wurde zweimal filtriert (Schleicher & Schüll, Faltenfilter Nr. 520 b), das Filtrat zur Abtrennung der Plastiden sofort 20 Min. bei 600 g zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Zur Entfernung von Zelltrümmern und Zellkernen wurde das Sediment in 100 ml Isolierungsmedium aufgenommen und die Suspension sechsmal 2 Min. bei 100 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Plastiden (10 Min. bei 400 g). Die oberste lose Schicht des Sediments wurde mit dem Überstand entfernt, die mittlere Schicht in 25 ml Isolierungsmedium aufgenommen und der Rest verworfen. Nach erneutem Zentrifugieren (10 Min. bei 400 g) konnte man die mittlere Schicht des Sediments, welche die gereinigten Plastiden enthielt, isolieren. Der gesamte Isolierungsvorgang erfolgte bei 0 bis 4 °C. Man erhält nach dieser Methode etwa 50 bis 100 mg Plastiden, die zum überwiegenden Teil ihr Stroma enthalten.

Zählung, Volumen- und Gewichtsbestimmung der Plastiden: Die isolierten Plastiden wurden im Isolierungsmedium suspendiert. Zur Zählung, Aufnahme der Größenverteilungskurve und zur Volumenbestimmung wurden aliquote Teile der Suspension mit Puffer verdünnt (0,25 M Saccharose, 0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,8, 0,01% Rinderserumalbumin). Die Messungen erfolgten sofort nach Verdünnen mit einem elektrischen Teilchenzählgerät (Coulter Counter Modell F, 70 μ Kapillare), dem ein Computer zur Bestimmung des mittleren Partikelvolumens angeschlossen war. Geeicht wurden beide Geräte mit Erythrotrol⁹, für das die Hersteller ein mittleres Partikelvolumen von 70 μ^3 angeben. In dem hier verwendeten Puffer trat keine Volumenänderung des Erythrotrols gegenüber einer Suspension in physiologischer Kochsalzlösung auf.

Die Bestimmung des mittleren Trockengewichts der Plastiden konnte nicht direkt gravimetrisch erfolgen, da die Plastiden bei der Überführung aus dem Isolierungsmedium in dest. Wasser sofort platzten und ihre Stromabestandteile verloren. Es wurden zwei voneinander unabhängige Methoden zur Bestimmung des Trockengewichtes entwickelt. Die erste Methode geht von der Überlegung aus, daß das

$$\text{mittlere Trockengewicht der Plastiden} = \frac{\text{Trockengewicht der Plastiden-suspension}}{\text{Zahl der Plastiden in der Suspension}} - \text{Trockengewichts-anteil des Puffers in der Suspension}$$

ist. Das Trockengewicht der Plastidensuspension läßt sich gravimetrisch bestimmen. Den Trockengewichtsanteil des Puffers in der Suspension erhält man durch die Bestimmung des Trockengewichtes des Puffers und aus dem Volumenanteil des Puffers in der Suspension, wobei der

$$\text{Volumenanteil des Puffers in der Suspension} = \frac{\text{Volumen der Suspension}}{\text{Volumen der Plastiden in der Suspension}} - \text{Volumen der Plastiden in der Suspension}$$

ist. Das Volumen der Plastiden in der Suspension ergibt sich durch Multiplikation der Zahl der Plastiden mit dem mittleren Plastidenvolumen. Beide Größen wurden mit dem Coulter Counter ermittelt. Diese Methode setzt voraus, daß kein merklicher Anteil des Puffers in die Plastiden eindringt.

⁷ Nach Abschluß dieser Arbeit gelang es JACOBSON (J. Cell Biol. **38**, 238 [1968]), Etioplasten über einen Dichtegradienten zu isolieren.

⁸ S. I. HONDA et al., J. exp. Bot. **17**, 460 [1966].

⁹ Das Präparat wurde freundlicherweise von der Firma Asid (München) zur Verfügung gestellt.

Die zweite Methode geht von der Voraussetzung aus, daß in den Plastiden keine oder im Vergleich zur Saccharosemenge im Puffer nur sehr wenig Saccharose vorhanden ist. Aus der quantitativen Bestimmung der Saccharose in der Plastidensuspension, Bestimmung des Trockengewichtes der Suspension und des Puffers und aus dem Gewichtsanteil der Saccharose im Puffer läßt sich dann der Trockengewichtsanteil der Plastiden in der Suspension errechnen. Die Plastiden wurden wieder im Coulter Counter gezählt, so daß sich das mittlere Trockengewicht der Plastiden berechnen ließ.

Die Saccharosebestimmung erfolgte polarimetrisch mit Invertase. 2 ml der Plastidensuspension wurden viermal mit insgesamt 50 ml bidest. Wasser auf einer Ultrazentrifuge 15 Min. bei 75000 g gewaschen. Die vereinigten Überstände enthielten sowohl das Isolierungsmedium als auch die wasserlöslichen Plastidenbestandteile. Die Lösung wurde mit HCl auf pH 4,5 eingestellt und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugieren entfernt. Die optische Drehung bei 365 nm wurde vor und nach Inkubation mit Invertase (Serva, aus Hefe zur Rohrzuckerbestimmung, 1,5 mg/15 ml Überstand, 30 Min. bei 55 °C) gemessen, ebenso als Kontrolle in einer Probe ohne Invertase. Mit Hilfe einer durch Verdünnungen des Isolierungsmediums erhaltenen Eichkurve konnte die Menge des Isolierungsmediums in der Plastidensuspension ermittelt werden, wobei die Differenz der optischen Drehungen vor und nach Inkubation gegen das Puffer-Trockengewicht aufgetragen wurde. Die Messungen erfolgten mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter (Zeiss).

Chemische Analyse der Plastiden: Die Bestimmung der wasserunlöslichen Anteile der Plastiden erfolgte gravimetrisch nach Gefriertrocknung. Es wurde wie bei der Saccharosebestimmung ein Teil der Plastidensuspension viermal mit insgesamt 50 ml bidest. Wasser 15 Min. bei 75000 g auf einer Ultrazentrifuge gewaschen. Das letzte Sediment besteht im Falle der Chloroplastenanalysen aus dem Lamellarsystem, bei den Etioplastenanalysen aus den Plastidenzentren und bei den frühen Entwicklungsstadien aus einem Gemisch von beiden. Außerdem gehen in diese Fraktion auch die Außenmembranen der Plastiden ein. Aus den vereinigten Überständen wurden die löslichen Proteine im Eisbad mit 20-proz. Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 5% gefällt. Nach 30 Min. wurden die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert, mit Methanol und Äther gewaschen, im Vakuum getrocknet und ausgewogen.

Zur Analyse der Lipide wurden 2 ml Plastidensuspension auf einer Glasfritte mit 100 ml Methanol extrahiert. Die Chlorophylle wurden spektralphotometrisch in diesem Extrakt unter Verwendung der von COMAR und ZSCHEILE¹⁰ angegebenen Extinktionskoeffizienten bestimmt. Der Rückstand der Methanolextraktion

wurde mit 50 ml Äther extrahiert. Aus den eingegangenen Extrakten wurden die wasserlöslichen Begleitsubstanzen nach der Methode von WUTHIER¹¹ abgetrennt. Aliquote Teile der Lipide dienten zur Bestimmung des Trockengewichtes, der Galaktolipide und des Phosphorgehaltes. Der Phosphatidgehalt ergab sich durch Umrechnen des Phosphorgehaltes auf Phosphatidylglycerin (Mol.-Gew. 741). Die Phosphorbestimmung wurde nach Veraschen der von Lösungsmittel befreiten Lipide mit Wasserstoffperoxid in Schwefelsäure nach der Methode von LOWRY and LOPEZ¹² durchgeführt. Die Galaktolipide wurden nach dünnsschichtchromatographischer Trennung der Lipide an Kieselgel G in den Laufmitteln Chloroform, Methanol, Wasser (75 : 24 : 1) oder Chloroform, Methanol, Essigsäureäthylester, 3-proz. Ammoniak (50 : 25 : 25 : 1)¹³ nach der Methode von HEINZ¹⁴ bestimmt. Als Eichsubstanzen dienten aus *Antirrhinum majus* isoliertes Mono- und Digalaktosyldiglycerid¹⁵.

Die Menge des Stromas ergab sich aus der Differenz zwischen Plastidentrockengewicht und dem Gewicht des wasserunlöslichen Anteiles. Lediglich bei der Analyse der Chloroplasten wurde die Stromamenge durch Gewichtsbestimmung des wasserlöslichen Extraktes und Subtraktion des über die Saccharosebestimmung berechneten Pufferanteiles ermittelt. Die Fraktion „unlösliche Proteine“ ist die Differenz zwischen wasserunlöslichem Anteil und Lipiden.

Zur Untersuchung der Veränderungen der Zusammensetzung der Plastiden während des Ergrünnens wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt. Die Analysenergebnisse einer typischen Versuchsreihe sind in den Abbn. 2 bis 5 dargestellt. Für alle Werte ist der analytische Fehler geringer, als die Schwankungen, die bei unterschiedlichen Anzuchtbedingungen auftreten können. Zur Bestimmung der Galaktolipide wurden für jede Plastidenisolierung 9 Analysen durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Zusammensetzung von Etioplasten und Chloroplasten: Wie Tab. 1 zeigt, ist das Trockengewicht der Chloroplasten etwa doppelt so hoch wie das der Etioplasten, die Volumina stehen jedoch in einem Verhältnis 3 : 1. Bildet man den Quotienten Trockengewicht/Volumen (in Puffer), so ergibt sich für Chloroplasten ein Wert von 0,45 g cm⁻³, während dieser Wert für Etioplasten 0,70 g cm⁻³ beträgt. Der relative Wassergehalt ist in Chloroplasten also höher

¹⁰ C. L. COMAR u. F. P. ZSCHEILE, *Plant Physiol.* **17**, 198 [1942].

¹¹ R. E. WUTHIER, *J. Lipid Res.* **7**, 558 [1966].

¹² O. H. LOWRY u. J. A. LOPEZ, *J. biol. Chemistry* **162**, 421 [1946].

¹³ F. KOENIG, Veröffentlichung in Vorbereitung.

¹⁴ E. HEINZ, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **144**, 321 [1967].

¹⁵ Freundlicherweise von Frl. F. KOENIG zur Verfügung gestellt.

	Etioplasten	Chloroplasten
Trockengewicht	16,8 ± 0,9 ^a	35 ± 2 ^a 38 ± 2 ^b
wasserunlöslicher Anteil	3,9 ± 0,1	16,7 ± 0,5
Stroma	12,9 ± 0,8	20 ± 1
lösliche Proteine	3,5 ± 0,3	—
unlösliche Proteide	1,5 ± 0,1	8,3 ± 0,5
Lipide	2,41 ± 0,07	8,4 ± 0,2
Rückstand Lipidextraktion	6,47 ± 0,09	—
Chlorophyll a	0,00	1,45 ± 0,02
Chlorophyll b	0,00	0,58 ± 0,03
Monogalaktosyldiglycerid	0,77 ± 0,03	2,51 ± 0,09
Digalaktosyldiglycerid	0,88 ± 0,03	2,10 ± 0,07
Phosphatide	0,19 ± 0,01	0,52 ± 0,02
Volumen in μ^3 ^c	23,9 ± 0,5	77 ± 3

Tab. 1. Mittlere Zusammensetzung von Etioplasten und Chloroplasten in 10^{-12} g/Plastide. Die Streuung ist als einfacher mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Den Werten liegen jeweils Analysen von 11 Plastidenisolationen zugrunde. Für die Galaktolipide wurden von jedem Präparat 5 Einzelbestimmungen durchgeführt. ^a Nach Volumen-Methode berechnet. ^b Nach Saccharose-Methode berechnet. ^c Volumen in Puffer gemessen.

als in Etioplasten. JAGENDORF¹⁶ stellte fest, daß alte Chloroplasten aus Tabak in einer Saccharoselösung schon bei einer geringeren Dichte sedimentieren als junge Chloroplasten. Das ist mit dem Ergebnis dieser Arbeit gut in Einklang zu bringen. PRICE und HIRVONEN¹⁷ dagegen geben an, daß Etioplasten eine geringere Dichte haben als Chloroplasten. Möglicherweise ist dieser Befund auf ein Fehlen des Stromas zurückzuführen.

Wenn man von den Pigmenten absieht, so wurden, was die Lipide betrifft, nur quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung von Etioplasten und Chloroplasten gefunden. Die Konzentration an Protochlorophyll konnte in den zur Verfügung stehenden geringen Mengen nicht quantitativ bestimmt werden, scheint aber nicht weit unter $0,01 \cdot 10^{-12}$ g/Etioplast zu liegen. Das Sulfoquinosyldiglycerid konnte qualitativ sowohl in Chloroplasten als auch in Etioplasten nachgewiesen werden. Während das Lamellarsystem der Chloroplasten (wasserunlöslicher Anteil) zu je 50% aus Lipiden und unlöslichen Proteiden besteht, ist der Lipidanteil der Plastidenzentren (wasserunlöslicher Anteil der Etioplasten) mit 62% höher als der Anteil der unlöslichen Proteide. Bei dieser Betrachtung muß

allerdings berücksichtigt werden, daß in Chloroplasten wie in Etioplasten ein Teil der Lipide, vorwiegend Chinone, in den Plastoglobuli, also außerhalb der Membranen lokalisiert ist^{18, 19}.

Es ist überraschend, daß nur etwa ein Viertel des Stromas der Etioplasten und der ergrünenden Plastiden aus Trichloressigsäure-fällbaren Proteinen besteht (Tab. 1 und Abb. 3), nachdem NICKEL²⁰ 50% Proteine im Stroma der Chloroplasten von *Antirrhinum majus* fand. Man könnte deshalb annehmen, daß im vorliegenden Fall bei der Aufarbeitung in wäßrigem Medium ein Teil der Stromaproteine aus den Plastiden herausgelöst worden ist. Dies ist unwahrscheinlich, da in *Antirrhinum*- und Mais-Chloroplasten die gleiche Stromamenge gefunden wurde. Ein weiterer Hinweis dafür, daß bei der Isolierung der Plastiden keine größeren Stromaverluste auftraten, ergibt sich aus den Größenverteilungs-Diagrammen für Etioplasten und Chloroplasten (Abb. 1), die nach RIDLEY und LEECH²¹ mit

Abb. 1. Größenverteilungs-Diagramme von Chloroplasten und Etioplasten.

dem Coulter Counter in dieser Form nur von überwiegend unversehrten Plastiden erhalten werden können. Zudem läßt sich lichtmikroskopisch durch die osmotischen Reaktionen die Außenmembran bei dem größten Teil der isolierten Plastiden noch nachweisen. Der von den Werten NICKELS abweichende Gehalt an löslichen Proteinen dürfte demnach auf artspezifischen Unterschieden beruhen.

¹⁶ A. T. JAGENDORF, Plant Physiol. **30**, 138 [1955].

¹⁷ C. A. PRICE u. A. P. HIRVONEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **148**, 531 [1967].

¹⁸ H. K. LICHTENTHALER u. B. SPREY, Z. Naturforsch. **21 b**, 690 [1966].

¹⁹ B. SPREY u. H. K. LICHTENTHALER, Z. Naturforsch. **21 b**, 697 [1966].

²⁰ H. NICKEL, Flora [Jena], Abt. A. **159**, 233 [1968].

²¹ S. M. RIDLEY u. R. M. LEECH, Planta **83**, 20 [1968].

Veränderungen der Zusammensetzung der Plastiden bei der Ausbildung des Lamellarsystems: Obwohl das mittlere Plastidenvolumen in den 3 Versuchsreihen während der ersten Std. Belichtung abnahm, konnte man eine Zunahme des Trockengewichtes der Plastiden sowie der Fraktionen „wasserunlöslicher Anteil“, „Rückstand der Lipidextraktion“ und „unlösliche Proteide“ beobachten (Abb. 2 und 3). Nach etwa 12 Std. Belichtung waren ungefähr wieder die Werte der Etioplasten erreicht. Es

Abb. 2. Änderungen von Gewicht und Volumen der Plastiden in Abhängigkeit von der Belichtungszeit der Pflanzen.

Abb. 3. Änderungen der Zusammensetzung der Plastiden in Abhängigkeit von der Belichtungszeit.

ist aber nicht wahrscheinlich, daß Komponenten, die z.T. das Lamellarsystem bilden, während des Ergrünnens nach ihrem Aufbau sofort wieder abgebaut werden. Diese Schwankung kann auch nicht auf synchrone Plastidenteilungen zurückgehen, da das

mittlere Trockengewicht der Plastiden zunimmt. Eine lichtmikroskopische Überprüfung ergab, daß die Plastiden aus 3 und 6 Std. lang belichteten Pflanzen große Mengen Stärke enthielten, während alle anderen Stadien fast stärkefrei waren. Da die Stärke in Wasser und organischen Lösungsmitteln nicht löslich ist, muß sie in den Fraktionen „wasserunlöslicher Anteil“, „Rückstand der Lipidextraktion“ und „unlösliche Proteide“ erfaßt werden. Die Zu- und Abnahme dieser Komponenten und die Veränderungen des mittleren Trockengewichtes während der ersten 12 Std. Belichtung können also wenigstens teilweise auf Synthese und Abbau der Stärke zurückgeführt werden. Eine quantitative Schätzung ergibt nach 3 Std. Belichtung einen Stärkegehalt zwischen $1,7$ und $2,1 \cdot 10^{-12}$ g und nach 6 Std. Belichtung zwischen $1,9$ und $2,4 \cdot 10^{-12}$ g.

Abb. 4. Änderungen der Zusammensetzung der Plastidenlipide in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Abkürzungen: MGD Monogalaktosyldiglycerid, DGD Digalaktosyldiglycerid, P Phosphatide, Chl a Chlorophyll a, Chl b Chlorophyll b.

Abb. 5. Prozentuale Änderungen der Lipidzusammensetzung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Abkürzungen wie in Abb. 4.

Gleichzeitig mit dem Aufbau der Stärke verringerte sich die Lipidmenge in den ersten Std. der Belichtung. Obwohl die Galaktolipide nach Belichtung ebenfalls zuerst abnahmen, zeigte ihr prozentualer Anteil am Lipidgemisch einen starken Anstieg (Abbn. 4 und 5). Im Gegensatz zu den Galaktolipiden zeigten die Phosphatide bei Belichtung auch absolut eine Zunahme, gefolgt von einem Abfall bis zu 18 Std. Belichtung. Es muß also in den ersten Std. eine weitere, nicht erfaßte Lipidkomponente in großen Mengen abgebaut worden sein. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von SPREY und LICHTENTHALER¹⁹ interessant, daß die Zahl der Plastoglobuli in den Etioplasten nach Belichtung abnimmt. Die Plastoglobuli enthalten vorwiegend Chinone und Chinon-Derivate (Plastochinon 45, Phyllochinon, α -Tocochinon, α -Tocopherol und in den Etioplasten auch geringe Mengen Carotinoiden)^{18, 19}. SPREY und LICHTENTHALER diskutieren die Möglichkeit, daß die Plastoglobuli in Etioplasten eine Speicherfunktion für Lipide besitzen, die später in das Lamellarsystem eingebaut werden. Betrachtet man die Ergebnisse der beiden Autoren im Zusammenhang mit den hier vorliegenden Analysenergebnissen, so ist anzunehmen, daß die Chinone der Plastoglobuli abgebaut werden und höchstens zu einem geringen Teil bei der Bildung des Lamellarsystems Verwendung finden.

Bei der Beurteilung der Analysenergebnisse der Lipide ist noch zu beachten, daß nach den Befunden von SASTRY und KATES²², MCCARTY und JAGENDORF²³, BAMBERGER und PARK²⁴, HEINZ^{14, 25} und KOENIG¹³ ein Teil der Galaktolipide während der Isolierung der Chloroplasten und der Abtrennung der Lipide zerstört werden kann. Bei *Zea mays* ist jedoch auf den Dünnschichtchromatogrammen, im Gegensatz zu den Ergebnissen von KOENIG¹³ bei *Antirrhinum majus*, kein zuckerhaltiges Abbauprodukt nachzuweisen.

Die Menge der unlöslichen Proteine, die um mehr als das Vierfache während der Ausbildung des Lamellarsystems anstieg, wurde aus der Differenz zwischen den wasserunlöslichen Anteilen und den Lipiden erhalten. MENKE und JORDAN²⁶, WEBER²⁷ und VAN WYK²⁸ konnten zeigen, daß an diese Proteide

des Lamellarsystems noch Kohlenhydrate gebunden sind.

Indem die Analysenergebnisse auf die Zahl der untersuchten Plastiden bezogen wurden, konnte nachgewiesen werden, daß sich der Proteingehalt (Summe der löslichen und unlöslichen Proteine) der Plastiden bei der Ausbildung des Lamellarsystems verdoppelt (Abb. 3). Dies steht im Widerspruch zu Angaben von DURANTON⁵, nach denen der Proteingehalt in Etioplasten und Chloroplasten gleich sein soll. DURANTON hat jedoch keine ganzen Plastiden isoliert. Er erhielt seine Ergebnisse, indem er aus dem Protein- und Pigmentgehalt einer Chromoproteinfraktion, die unserer wasserunlöslichen Fraktion entsprochen haben dürfte, und aus dem Pigmentgehalt der übrigen Fraktionen, die während der Isolierung der Plastiden anfielen, den Gesamtproteingehalt der Plastiden ausrechnete und ihn auf den Pigmentgehalt der Blätter, auf die Blattfläche und auf das Trockengewicht der Blätter bezog. Es ist nicht verwunderlich, daß dieses Verfahren zu abweichenden Resultaten führte, zumal hierbei nicht berücksichtigt wird, daß die Chromoproteidkomplexe unterschiedliche Zusammensetzung haben können.

Erst nach 6 Std. Belichtung konnte das Chlorophyll quantitativ erfaßt werden. Erstaunlicherweise betrug das Verhältnis Chlorophyll a : b auch nach 72 Std. Belichtung 6,7, während es in den vorher analysierten Chloroplasten den Wert 2,6 aufwies. Auch die übrigen Plastidenkomponenten erreichten nach 72 Std. noch nicht die Werte, die in Tab. 1 angegeben sind. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das Ergrünen in einem Licht erfolgte, welches einen höheren Blauanteil und im roten Spektralbereich oberhalb 600 nm eine um 30% geringere Energie aufwies. Der Unterschied in der Zusammensetzung unter den beiden Anzuchtbedingungen ist weder auf das vorhergehende Etiolement noch auf das Dauerlicht zurückzuführen. Dies wurde durch einen Kontrollversuch nachgewiesen. Ein Vergleich zeigt, daß die Chloroplasten aus Pflanzen, die bei geringerem Rotlichtanteil angezogen worden waren, bei etwa gleicher prozentualer Zusammensetzung klei-

²² P. S. SASTRY u. M. KATES, *Biochem.* **3**, 1280 [1964].

²³ R. E. MCCARTY u. A. T. JAGENDORF, *Plant Physiol.* **40**, 725 [1965].

²⁴ E. S. BAMBERGER u. R. B. PARK, *Plant Physiol.* **41**, 1591 [1966].

²⁵ E. HEINZ, *Z. Naturforsch.* **20b**, 83 [1965]; *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **144**, 333 [1967].

²⁶ W. MENKE u. E. JORDAN, *Z. Naturforsch.* **14b**, 234 [1959].

²⁷ P. WEBER, *Z. Naturforsch.* **17b**, 683 [1962].

²⁸ D. VAN WYK, *Z. Naturforsch.* **21b**, 700 [1966].

ner waren. Lediglich der Gehalt an Chlorophyll b war auch prozentual erheblich geringer.

Elektronenmikroskopische Arbeiten haben ergeben, daß das Lamellarsystem der Chloroplasten z. T. aus den Plastidenzentren der Etioplasten hervorgeht. Andererseits können unter bestimmten Bedingungen

Teile des Lamellarsystems der Chloroplasten wieder in Plastidenzentren umgewandelt werden²⁹. Die chemischen Analysen haben nun gezeigt, daß in den Plastidenzentren der Etioplasten und im Lamellarsystem der Chloroplasten die gleichen farblosen Lipide vorkommen. Ihr Mengenverhältnis ist jedoch in den beiden Formen des Membransystems verschieden.

²⁹ M. WRISCHER, Z. Pflanzenphysiol. **55**, 296 [1966].

Inhibition of RNA Synthesis by α -Amanitin in Vivo

J. NIESSING, B. SCHNIEDERS, W. KUNZ, K. H. SEIFART, and C. E. SEKERIS

Departments of Physiological Chemistry and Pharmacology, University of Marburg,
Marburg/Lahnberge, W. Germany

(Z. Naturforsch. **25 b**, 1119–1125 [1970]; eingegangen am 12. Juni 1970)

Injection of α -amanitin inhibits both the synthesis of ribosomal and DNA-like RNA as measured by the incorporation of radioactively labelled orotic acid and *ortho*-phosphate into RNA extracted by phenol and subsequently fractionated by density gradient centrifugation and MAK column chromatography.

α -amanitin, a very potent and toxic cyclic peptide isolated from the toadstool *amanita phalloides*¹, inhibits RNA synthesis either after injection into mice² or after addition to isolated mouse or rat liver nuclei^{2, 3} and it has been recently demonstrated that the toxin exerts its effect by acting directly on the enzyme RNA polymerase^{3–6}. Enzymes from mammals and yeast⁷ are susceptible to the toxin whereas bacterial polymerase is not affected at all^{3–6}. In addition it could be shown that neither the binding of the enzyme to the DNA template nor initiation is effected, but that the chain elongation step is probably completely arrested. KEDINGER et al.⁶ recently isolated two species of RNA polymerase from calf thymus, only one of which is susceptible to amanitin. Similarly ROEDER and RUTTER⁸ separated RNA polymerase from rat liver into two main components one of which they attributed to a nucleolar RNA polymerase⁹ and the other to

the polymerase of the nucleoplasm. According to JACOB et al.¹⁰ only the latter polymerase is inhibited by amanitin whereas the nucleolar enzyme is fully resistant to the toxin. On the basis of these findings, the above mentioned authors concluded that amanitin does not impair the formation of ribosomal RNA.

To gain more insight into the nature of the RNA(s) inhibited after administration of amanitin in vivo we have analysed ribonucleic acid synthesized in rat liver by phenol extraction at different temperatures, by density gradient centrifugation and MAK column chromatography. The results of these experiments are presented below.

Materials and Methods

a) Animals and Chemicals

Male Wistar BR II rats (130–200 g) were obtained commercially. 6-¹⁴C-orotic acid (44.5 mCi/

Reprints request to Dr. J. NIESSING, Dept. of Physiological Chemistry, Univ. Marburg, D-3550 Marburg/Lahn, Lahnberge.

¹ TH. WIELAND, Science [Washington] **159**, 946 [1968].

² F. STIRPE and L. FIUME, Biochem. J. **105**, 776 [1967].

³ K. H. SEIFART and C. E. SEKERIS, Z. Naturforsch. **24 b**, 1538 [1969].

⁴ F. NOVELLO and F. STIRPE, Biochem. J. **112**, 721 [1969].

⁵ S. T. JACOB, E. M. SAJDEL, and H. N. MUNRO, Nature [London] **225**, 60 [1970].

⁶ C. KEDINGER, M. GNIAZDOWSKI, J. L. MANDEL, F. GISSINGER, and P. CHAMBON, Biochem. biophysic. Res. Commun. **38**, 165 [1970].

⁷ S. DEZELEÉ, A. SENTENAC, and P. FROMAGEOT, FEBS letters **77**, 220 [1970].

⁸ R. G. ROEDER and W. J. RUTTER, Nature [London] **224**, 234 [1969].

⁹ R. G. ROEDER and W. J. RUTTER, Proc. nat. Acad. Sci. USA **65**, 675 [1970].

¹⁰ S. T. JACOB, E. M. SAJDEL, and H. N. MUNRO, Biochem. biophysic. Res. Commun. **38**, 765 [1970].