

BBA 75257

DIE MORPHOGENESE DES PHOTOSYNTHESEAPPARATES VON *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

II. DIE KINETIK DER THYLAKOIDSYNTHESE NACH MARKIERUNG DER MEMBRANEN MIT $[2-^{14}\text{C}]$ AZETAT

J. OELZE UND G. DREWS

Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität, Freiburg i. Br. (Deutschland)

(Eingegangen am 30. September, 1968)

SUMMARY

Morphogenesis of the photosynthetic apparatus in Rhodospirillum rubrum. II. Kinetics of chromatophore (thylakoid) synthesis by membranes labeled with $[2-^{14}\text{C}]$ acetate

1. The participation of the cytoplasmic membrane in chromatophore (thylakoid) morphogenesis was examined in *Rhodospirillum rubrum*.

2. Membrane fractions were labeled preferentially by incorporation of $[2-^{14}\text{C}]$ -acetate into phospholipids.

3. Anaerobic cultures were grown under moderate light intensity (4000 lux) and then transferred to low light intensity (400 lux). This caused bacteriochlorophyll synthesis to start immediately. However, the total protein content of the culture was not changed during the first 3 to 4 h of incubation.

4. Before lowering the light intensity the cytoplasmic membrane was labeled more rapidly by $[2-^{14}\text{C}]$ acetate than were the chromatophores (thylakoids).

5. After lowering the light intensity, even though there was no measurable growth, the rate of incorporation of radioactivity into the chromatophores (thylakoids) was equal to the rate of bacteriochlorophyll synthesis.

6. During pulse-chase experiments under low-light conditions there was a shift in the distribution of radioactivity between the cytoplasmic membrane and the chromatophores (thylakoids). Whereas the radioactivity in the chromatophores increased, the radioactivity in the cytoplasmic membrane decreased.

7. The possibility is discussed that the chromatophores and the cytoplasmic membrane form a continuous membrane system in which the chromatophores represent the modified cytoplasmic membrane.

EINLEITUNG

In der vorangegangenen Mitteilung¹ wurde die Isolierung von zwei Membranfraktionen aus *Rhodospirillum rubrum* in einem Ficoll-Gradienten beschrieben. Die schwere Fraktion besteht aus Thylakoiden (Chromatophoren). Die leichtere Fraktion enthält Teile der cytoplasmatischen Membran. Untersuchungen zur Identifizierung

der beiden Membrantypen erbrachten erste Anzeichen dafür, dass die cytoplasmatische Membran in die Thylakoidsynthese einbezogen wird. Um Informationen über die Beziehungen beider Membransysteme zueinander zu erhalten, soll im Folgenden die Morphogenese der Thylakoide durch radioaktive Markierung verfolgt werden. Die Ausbildung des Photosyntheseapparates kann durch Absenken des Sauerstoffpartialdruckes in Dunkelzellen induziert werden². Unter diesen Bedingungen wird aber das Wachstum der Zelle nicht unterbrochen und daher die Biosynthese der Membranen unübersichtlich. Die Raten des Zellwachstums und der Thylakoidsynthese sind auch durch die Lichtintensität beeinflussbar. Es ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, dass in anaeroben Lichtkulturen von *R. rubrum* die Zahl der Thylakoide pro Zelle von der wirksamen Lichtintensität in der Kultur abhängt³⁻⁵. Durch Absenken der Lichtintensität von hohen Werten auf niedrige Werte kann das Wachstum vorübergehend gestoppt und die Thylakoidsynthese gesteigert werden. Es findet also eine relative Zunahme der Thylakoide statt. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist die cytoplasmatische Membran an der Thylakoidsynthese beteiligt.

MATERIAL UND METHODEN

Die Anzucht von *R. rubrum* (Stamm FR 1) erfolgte, wie bereits beschrieben¹. Bacteriochlorophyll wurde im Methanolextrakt unter Verwendung des spezifischen Absorptionskoeffizienten nach SMITH UND BENITEZ⁶, Protein nach der Methode von LOWRY *et al.*⁷ bestimmt.

Der Zellaufschluss, die Zentrifugationsbedingungen und die Fraktionierung im Ficoll-Gradienten wurden in der vorangehenden Mitteilung beschrieben¹. Die Rohthylakoid- und Membranfraktion wurden aus dem vorgereinigten Zellhomogenat ÜI (Überstand 15 900 \times g, 20 Min) durch Sedimentation bei 313 934 \times g (60 Min) gewonnen. Die Auftrennung der ausgewaschenen Rohthylakoide im Ficoll-Gradienten verlief bei 159 203 \times g (120 Min) im Rotor SW 65 der Beckman-Spinco, Modell L 2-65. Nach dem Lauf waren eine schwere thylakoidhaltige und eine leichte pigmentierte Bande ausgebildet. Die leichte Bande enthält Anteile der cytoplasmatischen Membran. In den einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden die Radioaktivität und die Absorption bei 880 nm ermittelt. Der verwendete Puffer (Tris-HCl, 0.02 M, pH 7.8) enthielt als Zusatz 0.1 % EDTA.

Zur weiteren Auftrennung wurde die leichte Bande dem Ficoll-Gradienten entnommen, ausgewaschen und in 0.5 % Ionagar No. 2 (Oxoid, London) elektrophoretisch aufgetrennt¹. Proteinhaltige Zonen wurden mit Amidoschwarz angefärbt.

Die Lipide wurden nach einer leicht modifizierten Methode extrahiert⁸. Das zu untersuchende wässrige Material wurde mit Chloroform und Methanol im Verhältnis 0.8:1:2 gemischt, bei 5° im Dunkeln gehalten und abzentrifugiert. Das Sediment wurde ein zweites Mal extrahiert. Beide Extrakte wurden mit Wasser und Chloroform versetzt, so dass das endgültige Lösungsmittelverhältnis von Wasser-Chloroform-Methanol 1.8: 2: 2 (v/v/v) betrug. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt. Die lipidhaltige Chloroformphase wurde von der wässrigen Phase abgetrennt, mit Wasser gewaschen, unter N₂ eingengt und durch Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt.

Die Beschichtung der Dünnschichtplatten erfolgte mit einer Mischung von 25 g Kieselgel G (Merck, Darmstadt), 2.5 g Ammoniumsulfat und 60 ml Wasser⁹. Zur

Trennung der Phospholipide wurde das Fließmittel von WAGNER, HÖRHAMMER UND WOLFF¹⁰ verwandt. Lipide wurden mit Rhodamin B (Lit. 11), Phosphatgruppen mit Ammonium-Molybdat⁹ nachgewiesen.

Zur Durchführung der radioaktiven Markierung wurden 50 ml Schraubdeckelflaschen mit anaeroben Lichtkulturen beimpft, die 20–24 Std bei 4000 Lux gewachsen waren. Die Impfdichte lag bei 0.03 mg Protein pro ml Nährlösung. Das Nährmedium R8ÄH enthielt zusätzlich 0.025 % oder 0.05 % Natriumazetat.

Die frisch angesetzten Kulturen wurden zunächst 5 Std bei 4000 Lux und anschließend 3–4 Std bei 400 Lux bebrütet. Vor dem Umschalten auf 400 Lux wurde der Inhalt der Flaschen in einen mit Helium durchspülten 1 l Erlenmeyerkolben überführt und bei Beleuchtung mit einer 150 W Birne (Osram D, 235 V, imatt) unter Sauerstoffausschluss weitere 30 Min mit Helium begast. Anschließend wurde der Kultursuspension 6.2 μ C trägerfreies [2-¹⁴C]Azetat (Radiochemical Centre, Amersham, England) pro 100 ml R8ÄH zugesetzt. Für Langzeitmarkierungen wurden die Kulturen in R8ÄH mit 0.05 % Natriumazetat angezogen, sofort nach Zugabe der Radioaktivität in Schraubdeckelflaschen abgefüllt und bei 400 Lux inkubiert. Die für "pulse-chase"-Experimente vorgesehenen Kulturen wurden weitere 15 Min im Erlenmeyerkolben gehalten und dann nach Erhöhung der ursprünglichen Natriumazetat-Konzentration von 0.025 % auf 0.2 % in Schraubdeckelflaschen gefüllt und bei 400 Lux bebrütet. Zur Aufarbeitung wurden die Proben vor der Homogenisierung über Eis gegossen, abzentrifugiert und mit gekühltem Puffer ausgewaschen.

Die Verteilung von [2-¹⁴C]Azetat wurde an Zellen untersucht, die unter anaeroben Lichtbedingungen 20–24 Std unter Zusatz von [2-¹⁴C]Azetat gewachsen waren. Die Messung der Radioaktivität in den Pherogrammen und Dünnschichtchromatogrammen erfolgte mit einem Dünnschicht-Scanner (LB 2721, Berthold, Wildbad). Alle übrigen Messungen wurden am Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard, Modell 3003) vorgenommen. Als Szintillationsgemisch diente folgendes System¹²: in einer Mischung von Toluol, p.a. (Merck, Darmstadt) mit Äthanol, absolut (Merck, Darmstadt) 7:3, wurden 0.4 % 2,5-Diphenyloxazol (Packard) und 0.01 % 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (Packard) gelöst. Zu 10 ml des Szintillationsgemisches wurden 0.2 ml wässrige Probe pipettiert. Die verdünnten Fraktionen des Ficoll-Gradienten besaßen einen einheitlichen Löscheffekt, eine Korrektur der gemessenen Zählraten war deshalb nicht nötig. Alle anderen Werte wurden korrigiert.

ERGEBNISSE

Der Einbau von [2-¹⁴C]Azetat

Vorversuche hatten ergeben, dass ein Zusatz von Natriumazetat bis zu einer Konzentration von 0.2 % zur Nährlösung R8ÄH, die Malat als C-Quelle enthält, die Wachstumsrate von *R. rubrum* nicht beeinträchtigt. Es wurde zunächst überprüft ob sich [2-¹⁴C]Azetat für eine Markierung der Membranen eignet und in welche Fraktionen die Radioaktivität eingebaut wird. Eine Kultur von *R. rubrum* wurde mit 30 μ C [2-¹⁴C]Azetat und 0.05 % Natriumazetat versetzt und bei 4000 Lux angezogen. Die Rohthylakoidfraktion wurde nach der Bebrütung aus den Bakterien isoliert und mit Methanol-Chloroform extrahiert. Wie aus Tabelle I hervorgeht, befand sich die Radioaktivität überwiegend im Chloroform-Extrakt. Die eingeengte Chloroformphase

TABELLE I

DIE VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT IN DER ROHTHYLAKOIDFRAKTION

Die Rohthylakoide wurden aus Zellen von *R. rubrum* isoliert, die 20 Std mit 30 μ C [2- 14 C]Azetat/50 ml R8AH plus 0.05% Natriumazetat anaerob im Licht gewachsen waren. Als Fraktionen werden die nach Lipidextraktion erhaltenen Phasen vermessen

Fraktion	Radioaktivität (%)
Rohthylakoide	100
Chloroformphase	59.3
Wässrige Phase	14.5
Unlösliche Phase	22.0

wurde dünnsschichtchromatographisch aufgetrennt und ausgemessen. Das Scanner-Diagramm (Fig. 1) zeigt, dass die drei langsam laufenden Substanzen 1, 2 und 3 die Hauptaktivität enthielten. Die am schnellsten gewanderten Carotinoide (Substanz 5) waren weniger markiert. In einer grün-grauen Komponente (Substanz 4) konnte kaum Radioaktivität gemessen werden. In den Banden 1, 2 und 3 war Phosphat nachzuweisen, ausserdem wurden Lipide mit Rhodamin B angefärbt. Demnach werden bei Langzeitmarkierung mit [2- 14 C]Azetat in den Thylakoiden vorwiegend die Phospholipide markiert. Ein anderer Teil der Rohthylakoid-Fraktion wurde zur Isolation der leichten pigmentierten Bande im Ficoll-Gradienten aufgetrennt. Die leichte Bande wurde ausgewaschen und in 0.5 % Agargel elektrophoretisch getrennt (Fig. 2). Von den beiden Zonen 1 und 2 im Gel war die Zone 1, die Proteine, Lipide, Pigmente und Aktivität der Succinat-Dehydrogenase enthielt¹, auch am weitest stärksten radioaktiv markiert. In die Membran der leichten roten Bande wird also weit mehr Radioaktivität eingebaut, als in die übrigen Bestandteile dieser Bande.

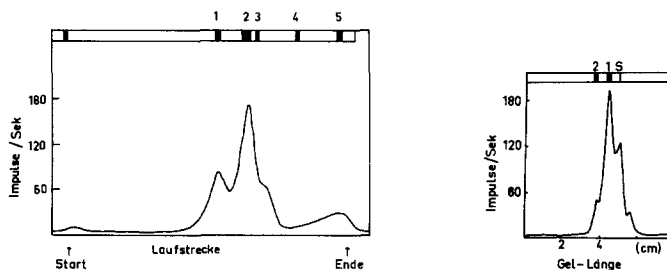


Fig 1. Verteilung der Radioaktivität in einem durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Chloroformextrakt aus der Rohthylakoidfraktion von *R. rubrum* (vergl. Tabelle 1). 1, 2 und 3, phosphor- und lipid-haltige Substanzen, 4, graugrüne Substanz, 5, braun-rote Substanz (Carotinoide).

Fig 2. Verteilung der Radioaktivität auf die Komponenten der leichten pigmentierten Bande des Ficoll-Gradienten nach Auftrennung durch Agargel-Elektrophorese. S, Start; 1, pigment-, protein-, lipid- und succinat-dehydrogenasehaltige Zone, 2, proteinhaltige Zone.

Bacteriochlorophyllsynthese unter wechselnden Lichtintensitäten

Die Veränderung des spezifischen Bacteriochlorophyll-Gehaltes in Kulturen, die einem Starklicht-Schwachlicht Wechsel ausgesetzt wurden, ist in Tabelle II wiedergegeben. Bei der hohen Lichtintensität (4000 Lux) erfolgt in der dünnen Suspension

TABELLE II

BACTERIOCHLOROPHYLL- UND PROTEINSYNTHESE IN EINER UNTER LICHTWECHSEL WACHSENDEN KULTUR VON *R. rubrum*

Lichtintensität bis zur 5 Std 4000 Lux, dann 400 Lux.

Lichtintensität (Lux)	Zeit (Std)	Bacteriochlorophyll ($\mu\text{g/ml}$)	Protein (mg/ml)	Bacterio- chlorophyll/Protein ($\mu\text{g/mg}$)
4000	0	0.455	0.03	15.2
400	5	0.465	0.08	5.8
	9	1.0	0.08	12.0

Wachstum, aber eine Abnahme des spezifischen Bacteriochlorophyll-Gehaltes. In der Schwachlichtperiode steigt der Bacteriochlorophyll-Gehalt wieder an, das Wachstum wird aber unterbrochen.

Langzeitmarkierung

Wenn man unter den genannten Bedingungen die Kultur in R8ÄH plus 0.05 % Natriumazetat vor der Umschaltung auf Schwachlicht mit $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Azetat}$ versetzt (siehe MATERIAL UND METHODEN), so zeigt die zu Beginn der Schwachlichtinkubation entnommene Probe lediglich im Bereich der leichten pigmentierten Bande einen Radioaktivitäts-Gipfel (Fig. 3). Nach einer Stunde Bebrütung beginnt sich eine Gipfelbildung in der Thylakoidfraktion abzuzeichnen (Fig. 4), die in der dritten Probe nach 3 Std eindeutig ausgebildet ist (Fig. 5). Zu allen drei Zeiten war die Menge der

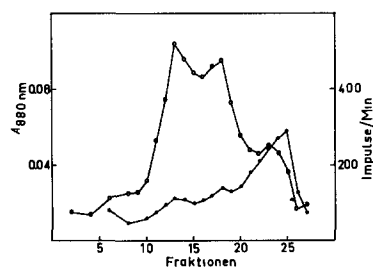


Fig. 3. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen des Ficoll-Gradienten aus einer 5 Min mit $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Azetat}$ inkubierten Starklichtkultur (4000 Lux) von *R. rubrum*. \circ — \circ , $A_{880\text{ nm}}$, \bullet — \bullet , Impulse/Min

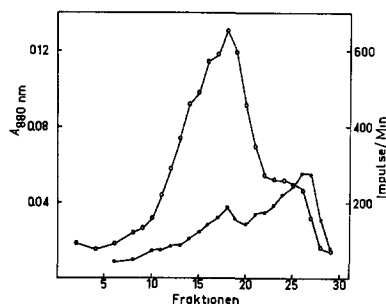


Fig. 4. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen des Ficoll-Gradienten aus einer 1 Std unter Schwachlicht (400 Lux) gewachsenen Kultur von *R. rubrum*. Der Kultursuspension war kurz vor Beginn der Schwachlichtbedingungen $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Azetat}$ beigefügt worden. Zeichenerklärung vergl. Fig. 3

in die leichtere Bande eingebauten Radioaktivität gleich hoch. Bemerkenswert erscheint, dass zunächst die leichte Bande markiert wird und dann entsprechend der Bacteriochlorophyll-Synthese Radioaktivität in die Thylakoid-Fraktion eingebaut wird.

Kurzzeitmarkierung

Diese Versuche wurden ebenfalls unter den bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt, jedoch betrug die Natriumazetat-Konzentration im Nährmedium 0.025 %. Nach der Zugabe des $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat wurden die Kulturen weitere 15 Min

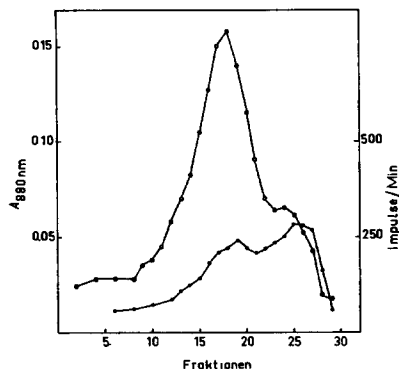


Fig. 5. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen des Ficoll-Gradienten aus einer 3 Std unter Schwachlicht (400 Lux) gewachsenen Kultur von *R. rubrum*. Der Kultursuspension war kurz vor Beginn der Schwachlichtbedingungen $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat zugefügt worden. Zeichenerklärung vergl. Fig. 3.

beleuchtet und mit Helium begast. Dann wurde die Natriumazetat-Konzentration im Medium auf 0.2 % erhöht und sofort die erste Probe entnommen. Die restliche Suspension wurde in Schraubdeckelflaschen gefüllt, 3 Std bei 400 Lux bebrütet und anschließend aufgearbeitet. Nach 15 minütiger Markierung der Zellen ist ein ausgeprägtes Maximum der Radioaktivität in der leichten Bande zu beobachten (Fig. 6). Nach 3 stündiger Bebrütung bei 400 Lux hat die Aktivität in dieser Bande deutlich abgenommen (Fig. 7). Die Aktivität in der Thylakoidbande nimmt dagegen während der Versuchszeit zu.

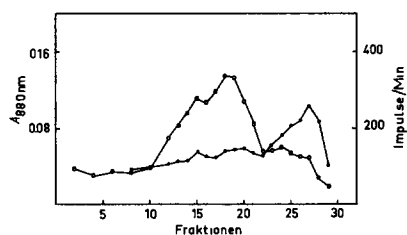


Fig. 6. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen des Ficoll-Gradienten aus einer 15 Min mit $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat markierten Starklichtkultur von *R. rubrum*. Zeichenerklärung vergl. Fig. 3

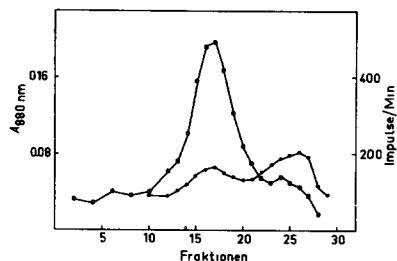


Fig. 7. Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen des Ficoll-Gradienten aus einer Kultur von *R. rubrum*, die 15 Min mit $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat bei Starklicht (4000 Lux) markiert wurde und nach dem Zusatz von Trägerazetat weitere 3 Std bei Schwachlicht (400 Lux) gewachsen ist. Zeichenerklärung vergl. Fig. 3.

DISKUSSION

Nach GLOVER, KAMEN UND VAN GENDEREN¹³ bauen phototroph wachsende Zellen von *R. rubrum* Azetat bevorzugt in Phosphatester ein. Die vorliegenden Daten

ergeben, dass $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat in die Phospholipidfraktion aufgenommen wird (Tabelle I, Fig. 1). Phospholipide sind wesentliche Bestandteile der Membranen¹⁴ und damit auch der Membran-Systeme phototropher Bakterien^{15,16}.

Die im Ficoll-Gradienten isolierbare, leichte pigmentierte Bande aus Homogenaten von *R. rubrum* enthält neben anderen Partikeln Teile der cytoplasmatischen Membran. Bei einer Markierung der Zellen von *R. rubrum* mit $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat wird die Hauptmenge an Radioaktivität in die Membrankomponente der leichten Bande eingebaut (Fig. 2). Eine Markierung der leichten Bande im Gradienten kann deshalb der cytoplasmatischen Membran zugeordnet werden.

Dient die cytoplasmatische Membran der Thylakoid-Synthese, so sollte sie früher mit $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat markiert sein, als die aus ihr hervorgehenden Thylakoide. Die Experimente zeigen, dass die leichte Bande sehr rasch eine hohe Radioaktivität erhält (Fig. 3), während die Thylakoide erst viel später markiert werden (Fig. 4, 5). Obwohl während der Versuchsdauer von 3 Std unter Schwachlicht (Tabelle II) keine Nettozunahme an Protein zu messen ist, werden während dieser Zeit Membranen gebildet. GRAY¹⁷ hatte unter vergleichbaren Bedingungen ebenfalls eine Membransynthese bei *Rps. spheroides* beobachtet. Parallel zur Membransynthese erfolgt die Synthese von Bacteriochlorophyll. Das Verhältnis der Bacteriochlorophyll-Menge zum eingebauten $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat bleibt während der Versuchszeit unverändert (Fig. 4, 5).

Die während der "pulse-chase" Experimente zunächst in die cytoplasmatische Membran (leichte Bande) eingebaute Radioaktivität wird in die Thylakoid-Bande verschoben (Fig. 6, 7). Das deutet darauf hin, dass Teile der cytoplasmatischen Membran zur Thylakoid-Bildung verbraucht werden. Jedoch ist zu bedenken, dass die Hauptmarkierung in der Phospholipidfraktion enthalten ist und nicht unbedingt die gesamte Membran repräsentieren muss. In der vorangegangenen Mitteilung wurde aber gezeigt, dass sich die Thylakoide in fünf Hauptprotein-komponenten zerlegen lassen, von denen eine auch in der cytoplasmatischen Membran enthalten ist. Demnach deuten auch die identischen Proteinbausteine strukturelle und morphogenetische Beziehungen zwischen den beiden Membransystemen an.

Die kürzlich von GORCHEIN, NEUBERGER UND TAIT¹⁸ veröffentlichten Befunde, wonach strukturgebundene Lipide aus pigmentfreien, aeroben Dunkelkulturen von *Rps. spheroides* nach Induktion des Photosynthese-Apparates in den Thylakoiden nachgewiesen werden können, lassen sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen und erweitern. Offenbar dienen nämlich neben Lipiden auch Proteine—und damit wahrscheinlich komplette Teile der cytoplasmatischen Membran—dem Aufbau der Thylakoide. Zusätzlich deutet die Tatsache, dass bereits in der cytoplasmatischen Membran Pigmente gefunden werden können¹, auf Gleichartigkeit der isolierten Membrantypen hin. Der Schluss liegt nahe, Thylakoide und cytoplasmatische Membran bei *R. rubrum* als ein kontinuierliches Membransystem zu betrachten, wobei die Thylakoide eine Modifikation der cytoplasmatischen Membran darstellen.

DANK

Diese Mitteilung enthält Teile der Dissertation von J. O., vorgelegt in Freiburg i. Br. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe radioaktiver Markierung wird untersucht, ob die cytoplasmatische Membran am Aufbau der Thylakoide bei *Rhodospirillum rubrum* beteiligt ist.

2. Die Membran-Fractionen werden durch den bevorzugten Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ -Azetat in die Phospholipide markiert.

3. Unter mittlerer Lichtintensität (4000 Lux) gewachsene anaerobe Zellen werden bei 400 Lux bebrütet. Nach Erniedrigung der Lichtintensität auf 400 Lux stagniert die messbare Proteinzunahme für 3–4 Std., während der spezifische Bacteriochlorophyllgehalt der Zellen sofort ansteigt.

4. Vor der Erniedrigung der Lichtintensität wird die Cytoplasma-Membran schneller mit $[2-^{14}\text{C}]$ Azetat markiert, als die Thylakoide.

5. Nach Erniedrigung der Lichtintensität bauen die Thylakoide trotz einer fehlenden Nettozunahme an Protein parallel zur Bacteriochlorophyll-Synthese Radioaktivität ein.

6. Bei niedriger Lichtintensität (400 Lux) verschwindet die rasch in die cytoplasmatische Membran aufgenommene Radioaktivität im "pulse-chase"-Experiment, während die Radioaktivität in der Thylakoid-Fraktion unter denselben Bedingungen zunimmt.

7. Es wird diskutiert, dass die Thylakoide und die Cytoplasma-Membran ein kontinuierliches Membransystem bilden, in dem die Thylakoide Modifikationen der Cytoplasma-Membran darstellen.

LITERATUR

- 1 J. OELZE, M. BIEDERMANN UND G. DREWS, *Biochim. Biophys. Acta*, 173 (1969) 436.
- 2 M. BIEDERMANN, G. DREWS, R. MARX UND J. SCHRÖDER, *Arch. Mikrobiol.*, 56 (1967) 133.
- 3 G. COHEN-BAZIRE UND R. KUNISAWA, *J. Cell Biol.*, 16 (1963) 401.
- 4 G. DREWS UND P. GIESBRECHT, *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. I. Orig.*, 190 (1963) 508.
- 5 S. C. HOLT UND A. G. MARR, *J. Bacteriol.*, 89 (1965) 1421.
- 6 J. H. C. SMITH UND A. BENITEZ, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Band 4, Springer, Berlin, 1955, p. 179.
- 7 O. H. LOWRY, M. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR UND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 8 E. G. BLIGH UND W. J. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (1959) 911.
- 9 H. K. MANGOLD, in E. STAHL *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962, p. 141.
- 10 H. WAGNER, L. HORHAMMER UND P. WOLFF, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 175.
- 11 H. P. KAUFMANN UND Z. MARKUS, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 62 (1960) 1014.
- 12 T. C. HALL UND E. C. COCKING, *Biochem. J.*, 96 (1965) 626.
- 13 J. GLOVER, M. D. KAMEN UND H. VAN GENDEREN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 35 (1952) 384.
- 14 E. D. KORN, *Science*, 153 (1966) 1491.
- 15 J. LASCELLES UND J. F. SZILAGYI, *J. Gen. Microbiol.*, 38 (1965) 55.
- 16 G. COHEN-BAZIRE UND W. R. SISTROM, in L. P. VERNON UND G. R. SEELY, *The Chlorophylls*, Academic Press, New York, 1st Ed., 1966, p. 313.
- 17 E. D. GRAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 138 (1967) 550.
- 18 A. GORCHEIN, A. NEUBERGER UND G. H. TAIT, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, 170 (1968) 311.