

Der Einfluß von Bleiionen auf Enzyme der Chlorophyllbiosynthese

Influence of Lead-ions on Enzymes of the Chlorophyll Biosynthesis

Rüdiger Hampf und Hubert Ziegler

Botanisches Institut, Technische Universität, München

(Z. Naturforsch. **29** c, 552–558 [1974] ; eingegangen am 2. Mai 1974)

Lead Effects, Chlorophyll Biosynthesis, ALA-Dehydratase, Porphobilinogenase

The influence of different concentrations of PbCl_2 on the activity of several enzymes of the chlorophyll biosynthesis in isolated spinach chloroplasts was analyzed. The succinyl-CoA-synthetase was weakly inhibited; a concentration of 2 mM PbCl_2 reduced the enzyme activity for 30% only. The concentration of δ -aminoevulnic acid (ALA) after incubation of the chloroplast homogenate with the substrates for the succinyl-CoA-synthetase + ALA-synthetase (cf. Fig. 9) was increased by lower concentrations of PbCl_2 (0–50 μM) and decreased by higher (>50 μM). This can be explained by a correspondent influence of PbCl_2 on the activity of ALA-synthetase or (more probably) by a relative stronger inhibitory effect of PbCl_2 on the ALA-metabolizing than on ALA-producing enzymes. δ -Aminoevulnic acid dehydratase is strongly inhibited at low concentrations of PbCl_2 , as it is in animals. The same is true for porphobilinogenase.

Einleitung

Wie zahlreiche andere Schwermetalle beeinflusst Pb^{2+} die funktionellen Gruppen katalytisch aktiver Proteine^{1, 10, 34}. Die wirksamen Konzentrationen des Pb^{2+} liegen bei vielen Enzymen im Bereich 10^{-6} – 10^{-4} M.

Im tierischen Organismus scheint das Bleiion vor allem den Porphyrin-Stoffwechsel zu beeinflussen: Neben gesteigerten Porphyrin-Ausscheidungen über den Urin – hier vor allem Coproporphyrin und seine Vorläufer, δ -Aminolaevulinsäure (ALA) und manchmal Porphyrinogen (PBG)^{2–4} – kommt es zur Anreicherung freien Protoporphyrins in Erythrocyten und zu erhöhten ALA- und Coproporphyringehalten im Blut^{5, 6}.

Da die Chlorophyllbiosynthese grüner Pflanzen über weite Strecken ähnlich verläuft wie die Haem-Synthese tierischer Organismen, an Orten mit hohen Bleigehalten der Luft deutliche Anzeichen von Chlorose an Blattspreiten zu erkennen sind^{7, 8} und Bleiionen die Chlorophyllsynthese in Blättern hemmen⁹, war es von Interesse, den Einfluß von Pb^{2+} -Ionen auf Enzyme der Chlorophyll-Biosynthese zu untersuchen.

Material und Methoden

Alle Versuche wurden mit isolierten Spinatchloroplasten durchgeführt. Der Spinat (*Spinacia oleracea*) wurde im Gewächshaus herangezogen und stets

frisch verwendet. Die Chloroplasten wurden nach der von Jensen u. Bassham beschriebenen und nach¹⁰ modifizierten Methode isoliert. Für die einzelnen Testansätze wurden beschallte Chloroplastensuspensionen (Branson Sonifier, Stufe 5, 10 sec) verwendet. Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach¹¹.

Succinyl-CoA-Synthetase [Succinat : CoA-Ligase (ADP), E.C. 6.2.1.5]

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe der Hydroxylaminmethode¹² bestimmt. Zu 0,4 ml neutralisierter $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ -Lösung, 2,4 M, wurden je 0,1 ml der folgenden Substanzen gegeben: Tris-Puffer, pH 7,4, 1 M; Na-Succinat, 1 M; ATP, 0,1 M; CoA, 0,0013 M; GSH, 0,2 M; MgCl_2 , 0,1 M; Chloroplasten-Suspension mit einem Chlorophyllgehalt von etwa 200 μg ; verschiedene PbCl_2 -Konzentrationen (siehe Ergebnisse) und H_2O zu einem Endvolumen von 2,0 ml. Nach einer Inkubationsdauer von 60 min bei 34 °C wurde der Umsatz durch Zugabe von 0,5 ml einer frisch angesetzten Lösung, die gleiche Volumina von 5-prozentiger FeCl_3 -Lösung, 3,0 N HCl und 10% Trichloressigsäure enthielt, abgestoppt¹³. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und die Extinktion bei 540 nm gegen eine Probe gemessen, deren Umsatz zur Zeit 0 abgebrochen worden war.

Succinyl-CoA-Synthetase + ALA Synthetase

Zur Messung der Aktivitäten dieser beiden Enzymschritte wurde nach¹⁴ in leicht modifizierter Form verfahren (vgl. auch¹⁵). In 2 ml Endvolumen waren enthalten (in μmol): Glycin, 100; Na-Succinat, 100; MgCl_2 , 40; CoA, 0,25; Pyridoxal-5-phos-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Ziegler, Botanisches Institut, Technische Universität, D-8000 München 2, Arcisstr. 21.

phat, 2; ATP, 5; Tris-HCl (pH 7,0), 100; verschiedene PbCl_2 -Konzentrationen und eine Chloroplastensuspension mit einem Chlorophyllgehalt von ca. 70 μg . Inkubiert wurde im Wasserbad bei 37°C für 1 Stunde. Durch Zugabe von 0,5 ml einer Lösung mit 28% Trichloressigsäure und 1,9% HgCl_2 wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Abzentrifugieren des ausgefällten Proteins wurden zum gesamten Ansatz 0,75 ml 1 M Na-Acetat, pH 4,6, und 0,1 ml Acetylaceton zugegeben und die Mischung 15 min in siedendem Wasserbad gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde zu einem Aliquot des Ansatzes eine gleiche Menge mod. Ehrlich's Reagens (vgl. ¹⁶) gegeben und nach 15 min die Extinktion bei 555 nm gegen eine Probe ohne Enzyme gemessen.

δ -Aminolaevulinsäure-Dehydratase [E.C. 4.2.1.24]

Das Inkubationsmedium zur Bestimmung dieses Enzyms setzte sich zusammen aus HEPES, 0,05 M (pH 7,0); Sorbit, 0,33 M; NaNO_3 , 0,002 M; MnCl_2 , 0,001 M; MgCl_2 , 0,002 M. Zusätzlich waren in einem Endvolumen von 3,0 ml alternativ enthalten: a. 0,2 bis 8,0 μmol ALA bei konstantem Chlorophyllgehalt von 88 μg ; b. Chloroplastenextrakte mit Chlorophyllgehalten zwischen 26 und 208 μg bei einem konstanten ALA-Gehalt von 8 μmol . Dazu kamen jeweils wechselnde PbCl_2 -Konzentrationen (siehe Ergebnisse). Die Reaktion wurde durch Zugabe von ALA gestartet und der Ansatz jeweils 90 min bei 30°C in Zentrifugengläsern inkubiert. Die Umsatzrate der Kontrollen (ohne PbCl_2) war über den Versuchszeitraum konstant und proportional der zugegebenen Enzymmenge. Durch Zugabe von 0,5 ml 28-prozentiger TCA mit 1,9-prozentiger HgCl_2 wurde die Reaktion gestoppt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und die gebildete Menge an PBG im Überstand mit modifiziertem Ehrlich's Reagens bestimmt. Die Konzentration des PBG wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten nach ¹⁷ berechnet.

Porphobilinogenase (Uroporphyrinogen-I-Synthetase und -III-Cosynthetase)

Zur Bestimmung der Umsatzrate dieses Enzyms wurde ein Blattextrakt verwendet, der folgendermaßen bereitet wurde: Etwa 20 g 4 Wochen alte Spinatblätter, deren Mittelrippen entfernt worden waren, wurden im Potter-Homogenisator in folgendem Medium homogenisiert (vgl. ¹⁶): Tris-HCl (pH 7,8), 0,2 M; Cystein, 0,1 M; MgCl_2 , 0,1 M; Na-Ascorbat, 0,1 M; *o*-Phenanthrolin, 0,003 M. Das Homogenat wurde über 4 Lagen Miracloth (Calbiochem) filtriert.

Die Ansätze zur Enzymbestimmung enthielten in Anlehnung an ¹⁸: 0,1 ml PBG (1 mg/ml); 0,5 ml Tris-HCl (pH 8,2), 0,2 M; Extrakt mit einem mittleren Chlorophyllgehalt von 100 μg ; verschiedene PbCl_2 -Konzentrationen in einem Endvolumen von 1 ml. Der Ansatz wurde 45 min bei 32°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 3 M Trichloressigsäure gestoppt. Der klarzentrifugierte Überstand wurde 1 : 1 mit 5 M HCl versetzt. Nach 4 1/2-stündiger Autoxidation (keine Veränderung der Extinktion mehr) im Licht (11 000 Lx) wurde die Extinktion bei 406 nm gemessen. Zur Berechnung der Umsatzrate diente ein molarer Extinktionskoeffizient von $530 \cdot 10^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ ¹⁹.

Ergebnisse

1. Wirkung von Pb^{2+} -Ionen auf die Succinyl-CoA-Synthetase (SCoAS)

Dieses Enzym, das neben der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase Succinyl-CoA für die Aminolaevulinsäure-Synthetase bereitstellt ²⁰, wird für Chloroplasten-Zentrifugate aus Weizenblättern als aktiv angegeben ²¹, während es andererseits in über Saccharosegradienten isolierten Chloroplasten von Weizen und Erbsen nicht gefunden wurde ²². In den Spinatchloroplasten konnte eine SCoAS-Aktivität nachgewiesen werden. Diese wird durch Pb^{2+} im untersuchten Konzentrationsbereich leicht gehemmt (Abb. 1); bei 2 mM liegt die Hemmung bei etwa 30%.

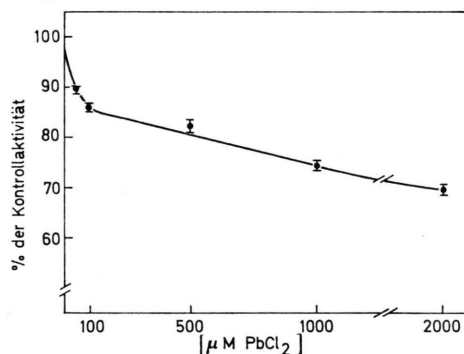


Abb. 1. Einfluß verschiedener Konzentrationen von PbCl_2 auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase. Standardabweichungen der 3 Parallelreihen angegeben. Kontrollaktivität (100%) $\hat{=}$ 97,7 nmol SCoA/h · mg chl; Extinktionskoeffizient siehe ¹⁸.

2. Wirkung von Pb^{2+} -Ionen auf die δ -Aminolaevulin-Synthetase

Dieses Enzym, das die Bildung von ALA aus Succinyl-CoA und Glycin katalysiert, ist in Etio-

plasten oder Chloroplasten grüner Pflanzen noch wenig studiert (vgl. ²³). Es konnte aber mit Etioplasten ein Einbau von [²⁻¹⁴C]Glycin und Succinat in Chlorophyll a nachgewiesen werden, wobei die Einbaurrate im Licht bis 20-fach gesteigert war ²⁴. In unseren Versuchen kam es bei niederen Pb²⁺-Konzentrationen zunächst zu einer verstärkten ALA-Anreicherung gegenüber der Kontrolle ohne Blei (Abb. 2, 0–50 μ M PbCl₂). Erst bei Konzentrationen

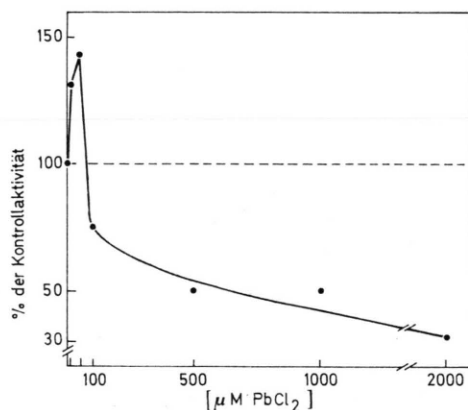


Abb. 2. Einfluß verschiedener Konzentrationen von PbCl₂ auf die Aktivität des Systems Succinyl-CoA-Synthetase + ALA-Synthetase. Kontrollaktivität (100%) $\triangleq$ 65 nmol ALA/h · mg Chl.

nen > 50 μ M verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle die nach 90 min Versuchsdauer nachweisbare ALA-Menge; sie sinkt bei 1 mM PbCl₂ auf etwa 50%.

3. Wirkung von Pb²⁺-Ionen auf die δ -Aminolaevulinsäure-Dehydratase (ALAD)

ALAD ist ein in tierischen Organismen, vor allem auch im Zusammenhang mit Bleiwirkungen, häufig untersuchtes Enzym. Bei *Euglena* soll sie membran-gebunden sein ²⁵, bei ergrünenden Etioplasten (der Gurke) entweder im Stroma oder sehr locker membran-gebunden vorliegen.

Bei den isolierten, beschallten Spinachchloroplasten zeigte sich die ALAD – wie in tierischen Organismen – als sehr empfindlich gegenüber Pb²⁺-Ionen. Bereits bei 10 μ M PbCl₂ tritt eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität gegenüber der Kontrolle ohne Blei ein ($P < 1$); bei 100 μ M PbCl₂ liegt die Hemmung bei fast 93% (Abb. 3). Während bei der Kontrolle die Umsatzrate linear mit der Zeit ansteigt, tritt unter Pb²⁺-Einfluß eine deutliche Abnahme der Aktivität mit der Zeit auf (Abb. 4).

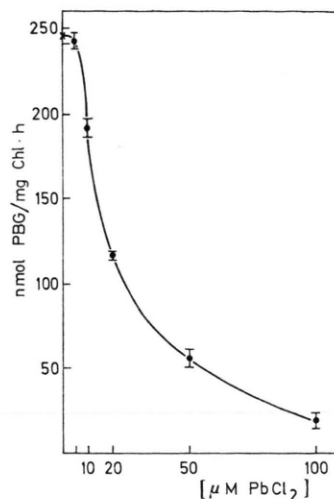


Abb. 3. Einfluß verschiedener Konzentrationen von PbCl₂ auf die Aktivität der δ -Aminolaevulinsäure-Dehydratase (ALAD). Standardabweichungen der 3 Parallelreihen angegeben.

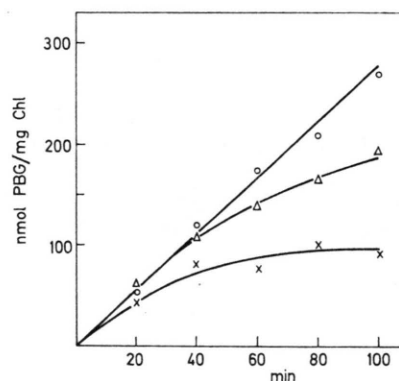


Abb. 4. Zeitabhängigkeit der Porphobilinogen-(PBG-)Bildung durch die ALAD ohne und mit Zusatz von PbCl₂. O Kontrolle; Δ 20 μ M PbCl₂; X 50 μ M PbCl₂.

Untersuchungen mit verschiedenen Enzymkonzentrationen ($\triangleq$ Chlorophyllkonz.) zeigen, daß die Hemmwirkung besonders im Bereich geringer Enzymkonzentrationen sehr ausgeprägt ist und mit steigender Enzymkonzentration – bei konstantem Bleigehalt – abnimmt (Abb. 5).

Aus kinetischen Untersuchungen (Abb. 6) kann folgendes geschlossen werden:

a. Es tritt bei dem Enzym (ohne Bleieinfluß) eine Substrataktivierung auf: Mit steigender ALA-Konzentration kommt es beim Überschreiten einer Schwellenkonzentration zu einer starken Zunahme der Umsatzrate (sigmoidaler Kurvenverlauf).

b. Niedere Pb²⁺-Konzentrationen (bis 10 μ M) rufen eine Hemmung nach kompetitivem Muster her-

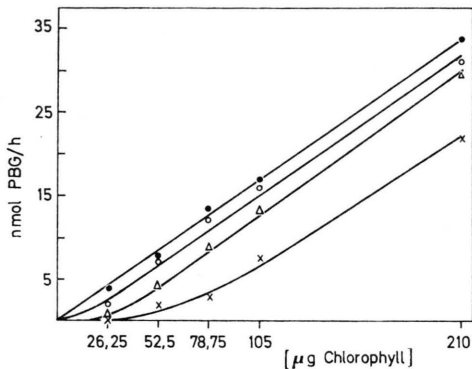


Abb. 5. Abhängigkeit der ALAD-Aktivität bei fehlendem oder konstantem Bleigehalt des Mediums von der Menge des zugesetzten Enzyms (ausgedrückt in der Chlorophyllkonzentration). Repräsentative Kurve aus 5 verschiedenen Ansätzen. ● Kontrolle; ○ 10 μM PbCl_2 ; △ 20 μM PbCl_2 ; × 50 μM PbCl_2 .

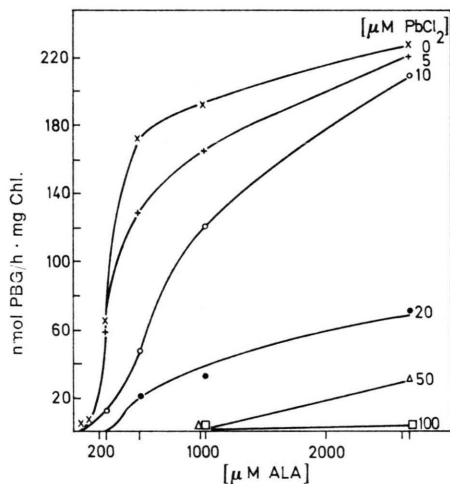


Abb. 6. Abhängigkeit der Hemmung der ALAD-Aktivität durch verschiedene PbCl_2 -Konzentrationen von der Substrat-(ALA-)Konzentration. Die Zahlen an den Kurven geben die Konzentration des PbCl_2 in μM an. (Versuchsdauer 90 min.)

vor: Mit steigender Substratkonzentration kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Hemmwirkung.

c. PbCl_2 -Konzentrationen $> 20 \mu\text{M}$ hemmen nichtkompetitiv, vermutlich durch irreversible Konformationsänderung des Enzyms.

4. Wirkung von Pb^{2+} -Ionen auf die Porphobilinogenase

Dieses Enzymsystem, das die Bildung von Uroporphyrinogen III katalysiert, ist in pflanzlichen und tierischen Organismen weit verbreitet²⁶ und besteht aus a. Uroporphyrinogen-I-synthetase und b. Uroporphyrinogen-III-Cosynthetase; das ge-

samte System wird als Porphobilinogenase bezeichnet²⁷.

Auch dieses Enzymsystem erwies sich in Homogenaten aus Spinatchloroplasten als extrem empfindlich gegenüber Pb^{2+} -Ionen; bereits $5 \mu\text{M}$ PbCl_2 hemmen die Aktivität signifikant ($P < 1$; Abb. 7).

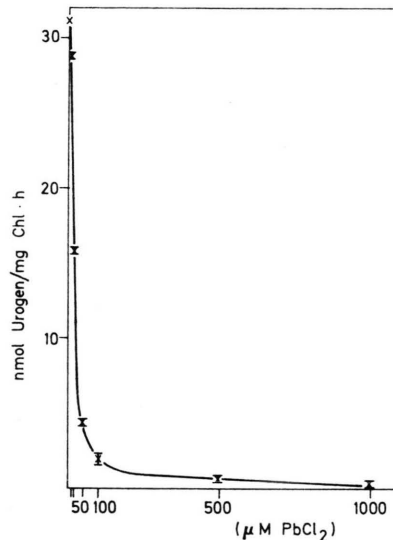


Abb. 7. Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von PbCl_2 auf die Aktivität der Porphobilinogenase. Standardabweichungen der 6 Meßreihen angegeben (für $10 \mu\text{M}$ PbCl_2 : $P < 1$).

Bei Konzentrationen $> 100 \mu\text{M}$ verbleibt eine geringe Restaktivität, die erst bei $1000 \mu\text{M}$ nicht mehr meßbar ist.

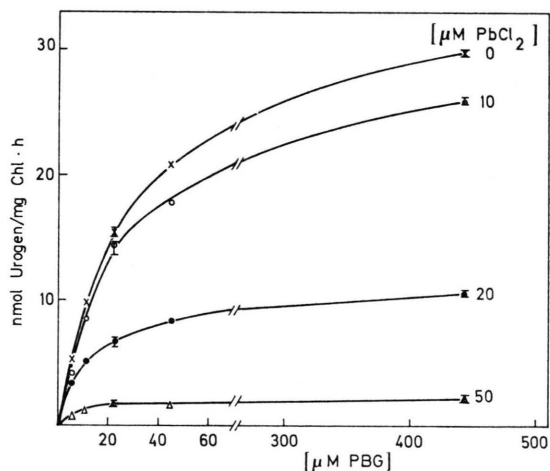


Abb. 8a. Abhängigkeit der Aktivität der Porphobilinogenase bei verschiedenen Bleikonzentrationen von der Substrat-(PBG-)Konzentration. Die Zahlen an den Kurven geben die Konzentration des PbCl_2 in μM an. (Versuchsdauer 45 min.)

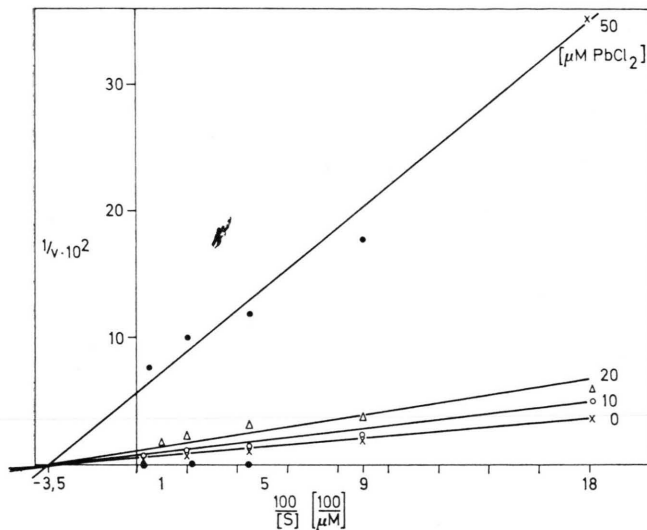


Abb. 8b. Lineweaver-Burk-Auftragung der Werte von 8a. Typus einer nichtkompetitiven Hemmung.

Kinetik-Messungen zeigen, daß die Hemmung nichtkompetitiv ist (Abb. 8 a, b). Der K_i -Wert liegt für Pb^{2+} bei $18,6 \mu M$.

Diskussion

Bei der Haem-Synthese von Hühner-Erythrocyten hemmt Pb^{2+} einen Schritt, der vor der Kondensation von Glycin und Succinyl-CoA liegt (vgl. Abb. 9). Mögliche Angriffspunkte könnten hier die Bildung von Succinyl-CoA oder die Einschleusung von Glycin in die ALA-Synthetase-Reaktion mit Hilfe von Pyridoxalphosphat sein³⁴.

Bei den Spinachchloroplasten ist nach unseren Befunden die Succinyl-CoA-Synthetase im Vergleich zu anderen Enzymen der Chlorophyllbiosynthese relativ unempfindlich gegen Pb^{2+} -Ionen.

Dies gilt offenbar auch für die ALA-Synthetase (ALAS). Es handelt sich um ein sehr labiles Enzym, dem Halbwertszeiten zwischen 1,5 Stunden²⁸ und 10 min²⁹ zugesprochen werden. Der Einfluß von Pb^{2+} -Ionen auf die ALAS der Spinachchloroplasten kann in unseren Messungen nur indirekt vor dem Hintergrund der SCoAS abgeschätzt werden, da ja die zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritte untersucht wurden (vgl. Abb. 9). Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, wird die SCoAS über den gesamten

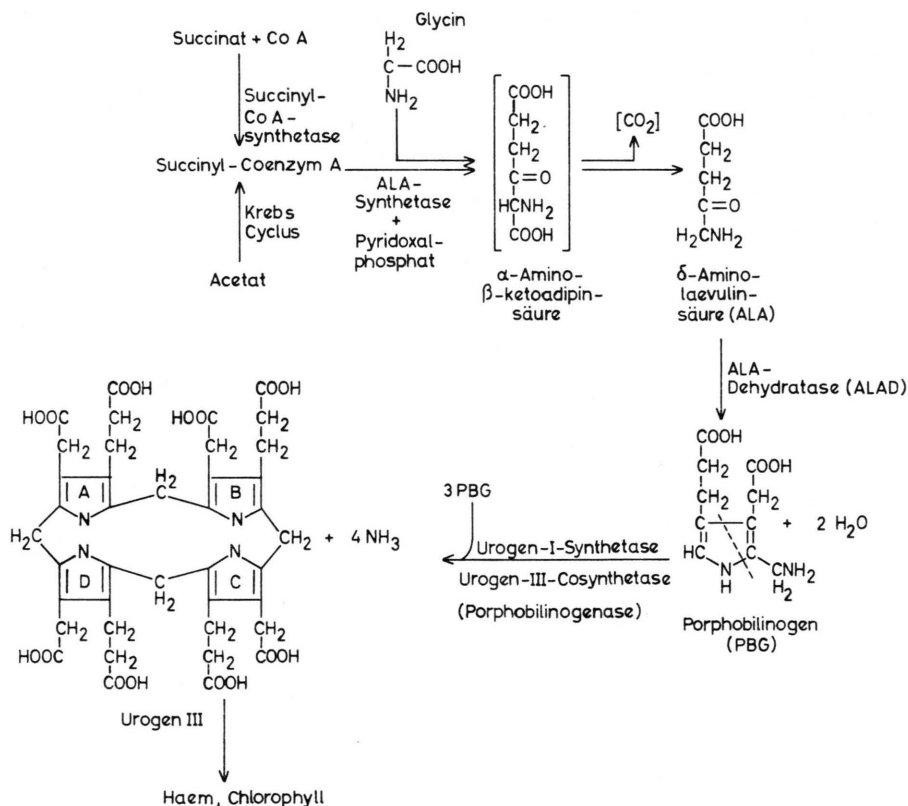


Abb. 9. Übersicht über Einzelschritte der Chlorophyllbiosynthese, deren Enzyme in dieser Arbeit untersucht wurden.

untersuchten Pb^{2+} -Konzentrationsbereich gehemmt. Die erhöhte ALA-Anreicherung im System SCoAS – ALAS unter dem Einfluß niedriger Pb^{2+} -Konzentrationen kann daher folgende Gründe haben: a. Eine Förderung der Umsatzrate von ALAS in Gegenwart von $PbCl_2 < 50 \mu M$; b. eine starke Beeinträchtigung der ALAD (vgl. Abb. 3), die eine Weiterverarbeitung der ALA stärker blockiert als ihre Nachlieferung. Erst bei hohen Pb^{2+} -Konzentrationen ($> 50 \mu M$) werden dann auch die Enzyme SCoAS/ALAS verstärkt gehemmt und damit die ALA-Konzentration unter den Wert der Kontrolle gesenkt. Damit hätten Pb^{2+} -Ionen im Bereich bis $50 \mu M$ eine ähnliche Wirkung wie Laevulinsäure, die als kompetitiver Inhibitor der ALAD zu einer ALA-Anhäufung *in vivo* führt^{15, 30}. Es ist zu vermuten, daß diese zweite Möglichkeit (Hemmung der ALA-Weiterverarbeitung) für unsere Befunde entscheidend ist.

Obwohl die aus Spinatchloroplasten stammende ALAD auch sehr empfindlich gegenüber Pb^{2+} ist, scheint sie doch etwas resistenter zu sein als das Enzym aus menschlichen Erythrozyten, das *in vitro* bereits durch $10 \mu M PbCl_2$ nahezu vollständig gehemmt wird⁶. Das pflanzliche Enzym unterscheidet sich von dem aus Tieren auch dadurch, daß es bivalente Kationen (Mg^{2+} , Mn^{2+}) zur maximalen Aktivierung benötigt¹⁷. Eine Verdrängung dieser Aktivatoren könnte einer der Angriffspunkte des Pb^{2+} sein.

Zu denken ist ferner vor allem auch an eine Reaktion des Pb^{2+} mit –SH-Gruppen, die bei der ALAD-Reaktion eine wesentliche Rolle spielen³¹. Weiterhin könnten die Bleiionen PO_4^{3-} -Ionen abfangen, die zur Aktivierung der ALAD benötigt

werden³². Schließlich könnte durch Pb^{2+} auch die Carboxylgruppe der ALA blockiert werden, die freiliegen muß, wenn das Substrat an die aktive Stelle des Enzyms gebunden werden soll³³.

Ein Zustand maximaler ALAD-Aktivität soll durch Zusammenlagerung von drei Proteineinheiten zustande kommen³³. Die erhöhte Sensibilität gegenüber Pb^{2+} bei geringen Enzymkonzentrationen (Abb. 5) ließe sich daher über eine bessere Zutrittsmöglichkeit für Pb^{2+} -Ionen zum dissoziierten Enzymkomplex erklären, da es sich bei der Aggregation um einen konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsprozeß handeln dürfte.

Die beiden Enzyme des Porphobilinogenase-Systems werden durch zahlreiche Ionen gehemmt, wobei die Urogen-III-Cosynthetase empfindlicher zu sein scheint²⁶. Die Urogen-I-Synthetase wird durch *p*-Chloromercuribenzoat, Hg^{2+} - und Ag^+ -Ionen, also Blocker funktioneller Thiolgruppen, stark gehemmt¹⁹. Die Pb^{2+} -Ionen dürften auf ähnliche Weise wirksam werden, u. zw. schon in sehr niedrigen Konzentrationen.

Während bei der Haem-Biosynthese bisher die Enzyme ALAD und Ferrochelatase (Einbau von Fe in Protoporphyrinogen, vgl.³⁴) als besonders empfindlich gegenüber Pb^{2+} erkannt wurden, erwiesen sich von den Enzymen der Chlorophyllbiosynthese in unseren Versuchen die ALAD und die Porphobilinogenase als außerordentlich sensibel. Es ist noch offen, ob im tierischen Organismus die Porphobilinogenase und im pflanzlichen die Ferrochelatase (bei der Haembiosynthese) bzw. die Magnesium-Chelatase (über die man noch kaum etwas weiß) ähnlich empfindlich sind.

- ¹ R. Hampf, H. Ziegler u. I. Ziegler, Biochem. Phys. Pflanzen **164**, 126 [1973].
- ² S. Milić, M. Stanković, V. Delić u. V. Djordjević, Tagungsberichte Int. Symp.: Die gesundheitlichen Aspekte d. Umweltverschmutzung durch Blei (Komm. d. Europ. Gemeinschaft.), p. 561, Luxemburg 1973.
- ³ M. Soliman, Y. EL-Sadik u. A. EL-Waseef, *ibid.*, p. 531.
- ⁴ G. C. Secci, L. Alessio, G. Cambiaghi u. F. Andreoletti, *ibid.*, p. 595.
- ⁵ G. Rausa, L. Diana u. G. Perin, Rivista Italiana D'Igiene **28**, 319 [1968].
- ⁶ C. Vergano, C. Cartasegna u. D. Bonsignore, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **44**, 692 [1968].
- ⁷ A. Suchodoller, Ber. Schweiz. Bot. Ges. **77**, 266 [1967].
- ⁸ R. Hampf, Ber. Bayer. Bot. Ges. **44**, 211 [1973].
- ⁹ R. Hampf u. K. Lendzian, Naturwissenschaften, im Druck.
- ¹⁰ R. Hampf, H. Ziegler u. I. Ziegler, Biochem. Phys. Pflanzen **164**, 126 [1973].
- ¹¹ D. I. Arnon, Plant. Physiol. **24**, 1 [1949].

- ¹² S. Kaufman, Methods in Enzymology, Vol. I, p. 719 (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan), Acad. Press, New York 1955.
- ¹³ F. Lipmann u. L. C. Tuttle, J. Biol. Chem. **158**, 505 [1945].
- ¹⁴ S. Granick, J. Biol. Chem. **241**, 1359 [1966].
- ¹⁵ E. A. Irving u. W. H. Elliott, J. Biol. Chem. **244**, 60 [1969].
- ¹⁶ C. M. Th. Sluiters-Scholten, F. M. van den Berg u. D. Stegwee, Z. Pflanzenphysiologie **69**, 217 [1973].
- ¹⁷ D. Mauzerall u. S. Granick, J. Biol. Chem. **219**, 435 [1956].
- ¹⁸ H. A. W. Schneider, Z. Naturforsch. **28 c**, 45 [1973].
- ¹⁹ L. Bogorad, Methods in Enzymology, Vol. V, p. 885 (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan), Acad. Press, New York 1962.
- ²⁰ S. Granick, Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II (T. W. Goodwin), Acad. Press, London u. New York 1967.
- ²¹ D. L. Nandi u. E. R. Waygood, Can. J. Biochem. **43**, 327 [1965].
- ²² I. T. O. Kirk u. N. A. Pyliotis, Z. Pflanzenphysiologie **66**, 325 [1972].

- ²³ C. A. Rebeiz u. P. A. Castelfranco, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**, 129 [1973].
- ²⁴ A. R. Wellburn u. F. A. M. Wellburn, *J. Exp. Bot.* **22**, 972 [1971].
- ²⁵ E. F. Carell u. I. S. Kahn, *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 1 [1964].
- ²⁶ E. Stevens u. B. Frydman, *Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam)* **151**, 429 [1968].
- ²⁷ W. Lockwood u. C. Rimington, *Biochem. J.* **67**, 8 p [1957].
- ²⁸ K. Nadler u. S. Granick, *Plant Physiol.* **46**, 240 [1970].
- ²⁹ S. Süzer u. K. Sauer, *Plant Physiol.* **48**, 60 [1971].
- ³⁰ E. Harel u. S. Klein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**, 364 [1972].
- ³¹ H. A. Tigier, A. M. Del C. Batlle u. G. Locasico, *Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam)* **151**, 300 [1968].
- ³² A. S. Shetty u. G. W. Miller, *Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam)* **185**, 458 [1969].
- ³³ D. L. Nandi, K. F. Baker-Cohen u. D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **243**, 1224 [1968].
- ³⁴ B. L. Vallee u. D. D. Ulmer, *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91 [1972].