

Substratspiegel, Enzymaktivitäten und genetische Regulation nach Derepression in pflanzlichen Speichergeweben

Substrate levels, enzymatic activities and genetic regulation after derepression in plant storage tissues

G. KAHL *, H. LANGE und G. ROSENSTOCK

Botanisches Institut der Universität Frankfurt a. M.

(Z. Naturforschg. 24 b, 911—918 [1969]; eingegangen am 14. Februar 1969)

Differential derepression of the genome of potato tuber cells can be initiated by slicing the tissue into disks. The consequence of this procedure on the cells of the wound surface is dedifferentiation and cell division followed by redifferentiation to a suberized phellem cell. The drift of glucose-, glucose-1-phosphate-, glucose-6-phosphate-, fructose-6-phosphate- and 6-phospho-gluconate-levels has been determined in the derepressed tissue. With the exception of 6-phospho-gluconate all intermediates so far investigated showed a rise in concentration after derepression.

This is interpreted as a consequence of altered enzymic activities which were estimated for phosphoglucomutase, hexokinase, phosphoglucoisomerase, gluco-6-phosphate- and 6-phosphogluconate-dehydrogenase. The two dehydrogenases were activated after derepression, the activation represented a de-novo-synthesis, as was demonstrated with the inhibitors Actidione (translation) and *p*-Fluorophenyl-alanine (protein synthesis in general). Hexokinase and phosphoglucoisomerase were not severely affected by cutting the tissue. Phosphoglucomutase was degraded rapidly, the degradation being dependent on protein synthesis. The importance of an enhanced activity of the pentose phosphate shunt for the stressed cell is emphasized and the possibility of an alteration in the osmotic pressure within the cell and especially in the nucleus — a primary consequence of wounding — as a cause of derepression in potato tuber cells is discussed.

Mit zunehmender Kenntnis pflanzlichen Stoffwechsels konzentriert sich das wissenschaftliche Interesse mehr und mehr auf die Regelmechanismen, die letztlich für das Zusammenwirken zwischen Genom und Cytoplasma mit allen daran beteiligten Zellkompartimenten verantwortlich sind. Die molekularbiologischen Grundlagen dieser Wechselbeziehungen wurden von JACOB und MONOD¹ für Bakterien aufgezeigt und lassen sich — wenn auch mit Einschränkungen — auf die Zellen höherer Organismen übertragen, obwohl sich diese Systeme durch Höherentwicklung und korrelative Beziehungen nicht unwesentlich komplizieren.

Man darf die Realisierung vieler Möglichkeiten der Genaktivitäts- und Stoffwechselregulation in einer *mitotisch aktiven Zelle* vermuten. Daher sind Objekte, deren Zellen zur Mitose induziert werden können, für Untersuchungen zu diesem Fragenkreis geeignet. Tatsächlich rechtfertigen die in dieser Arbeit zur Diskussion gestellten Ergebnisse die Wahl des Knollenparenchyms der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* L.) zur Bearbeitung dieser Probleme. Während nämlich in der unbeschädigten

Knolle von den ausdifferenzierten Speicherzellen keinerlei Zellteilungen mehr durchgeführt werden — was auf der Blockierung von Genen beruht, deren Aktivierung die Mitose erst möglich macht — *teilen sich die Zellen nach einer Verwundung des Organs nach vorheriger intensiver Stoffwechselaktivierung mehrmals*. Stoffwechselaktivierung und Zellteilung setzen dabei partielle Derepression bzw. differentielle Genaktivität voraus^{2, 3}.

Man hat somit ein Versuchsobjekt in der Hand, dessen Zellen sich nach dem Eingriff im Zuge der Wundkompensation dedifferenzieren, teilen und anschließend redifferenzieren. Die mit diesen Prozessen zusammenhängenden Stoffwechseländerungen müssen systematisch aufgedeckt werden, ehe man eine tiefere Einsicht in die zugrundeliegenden Regelmechanismen erwarten kann. Daher wurden die nach einer Derepression des Kartoffesparenchyms erfolgenden Intermediat-Konzentrations- und Enzymaktivitäts-Änderungen im Bereich der ersten Schritte des Glucosekatabolismus sowie deren Abhängigkeit von der Proteinsynthese ermittelt.

* Diese Arbeit enthält einen Auszug aus der Dissertation von G. KAHL, Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Frankfurt (Main), 1966.

¹ F. JACOB u. J. MONOD, J. molecular Biol. 3, [1961].

² D. TUAN u. J. BONNER, Plant Physiol. 39, 768 [1964].

³ R. E. CLICK u. D. P. HACKETT, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 243 [1963].

I. Material und Methoden

Untersuchungsmaterial: Sproßknollen von *Solanum tuberosum* L. der Sorten „Desirée“ und „Hansa“, die in belüfteten, wasserdampfgesättigten Exsikkatoren bei 20 °C im Dunkeln gelagert wurden.

Verwundung: Sie erfolgte durch Zerschneiden der Organe in 1 mm dünne Querschnitte, aus deren Markanteil wiederum Scheibchen von 15 mm Durchmesser herausgestanzt wurden. Nach kurzem Abspülen mit fließendem Leitungswasser (Entfernung von Zelltrümmern) wurden diese Scheibchen in verdunkelten, wasserdampfgesättigten und belüfteten Exsikkatoren bei 20 °C gelagert.

Für jeden einzelnen Versuch wurden ca. 15 g Gewebe in flüssigem Stickstoff abgetötet, sofort in eisumfrorene Kolben überführt und in einer vorgekühlten Gefriertrocknungsanlage bei ausreichendem Vakuum (ca. $4 \cdot 10^{-2}$ Torr) innerhalb von 48 Stdn. vollständig getrocknet. Nach diesem Zeitraum wurden die gefriertrockneten Scheiben pulverisiert. Etwa 25–100 mg des Pulvers wurden zur Ermittlung der verschiedenen Intermediat-Konzentrationen und Enzymaktivitäten verwendet.

Intermediat: Trockenpulver wurde bei 0 °C mehrfach mit 0,6-*m.* HClO₄ extrahiert, das Unlösliche bei 5000 g abzentrifugiert⁴ und der mit 1-*n.* KOH neutralisierte und mit Triäthanolamin-HCl-EDTA abgepufferte und vom ausgefallenen KClO₄ befreite Überstand auf Intermediat mit enzymatischen Methoden getestet. Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat und Fructose-6-Phosphat: 100 µMol Tris-Puffer (pH 7,47), 40 mg Trockengewicht (entspricht 320 mg Frischgewicht); 0,3 mMol NAD; 2,95 mMol MgCl₂; 25 mg PVP (Polyvinylpyrrolidon); 20 µg Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in 2,3-ml-Küvettenvolumen → G-6-P. Nach Umsatz des G-6-P Zusatz von 1,24 mMol EDTA und 20 µg Phosphoglucomutase → G-1-P. Nach Abreaktion Zusatz von 40 µg Phosphoglucoisomerase → F-6-P.

Glucose: 100 µMol Tris-Puffer (pH 7,47) 1,6 mg Trockengewicht; 0,3 mMol NADP; 25 mg PVP; 2,95 mMol MgCl₂; 20 µg Glucose-6-Phosphatdehydrogenase; 0,1 µMol Rinderserumalbumin; 0,47 mMol ATP und 60 µg Hexokinase in 2,5-ml-Küvettenvolumen.

6-Phosphogluconat: 100 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 40 mg Trockengewicht; 25 mg PVP; 0,21 mMol NADP; 2,95 mMol MgCl₂ und 40 µg 6-Phosphogluconatdehydrogenase in 2,5 ml Küvettenvolumen.

Die Extinktionsänderung bei 340 nm nach Enzymzusatz wurde mit einem Schreiber registriert. Extinktionssprünge, die auf Verdünnungseffekte bei Enzymzugabe zurückgehen, wurden berücksichtigt.

Enzyme: Enzyme wurden aus Vergleichsgründen stets mehrfach mit standardisiertem Puffer extrahiert (Tris, 100 µMol/ml, pH 7,47; $2,7 \cdot 10^{-4}$ -*m.* EDTA; 0,5% PVP; $8,25 \cdot 10^{-4}$ -*m.* Cystein), vom Unlöslichen abzentrifugiert und ihre Aktivitäten sofort im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei $+25 \pm 0,5$ °C und bei

340 nm bestimmt. Der Zusatz von PVP war nötig, um jegliche Enzymstörung durch Polyphenole zu verhindern, die vor allem ab dem 3. Tag nach der Derepression in höheren Konzentrationen vorliegen. Cystein zeigte zumindest in einigen Fällen eine Schutzwirkung.

Ausgewertet wurde der lineare Teil des Substratumsatzes. Alle Werte repräsentieren im Durchschnitt drei relativ gut übereinstimmende Reproduktionen. Alle Extraktionen wurden in der Kälte (+1 °C) ausgeführt.

Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconatdehydrogenase: Zunächst wurde die Gesamtaktivität beider Enzyme bestimmt, davon die gesondert erfaßte 6-PGDH abgezogen und damit die G-6-PDH-Aktivität festgestellt. Die 6-PGDH-Aktivität wurde mit der NADPH-Oxydase-Aktivität korrigiert.

Gesamtaktivität: 190 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 12,5 mg Trockengewicht entspr. 100 mg Frischgewicht; 0,26 mMol NADP; 3,92 mMol MgCl₂; 1,58 mMol G-6-P und 0,75 mMol 6-PG im Gesamtvolumen von 2,5 ml.

6-PGDH: 190 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 12,5 mg Trockengewicht; 0,26 mMol NADP⁺; 3,92 mMol MgCl₂; 0,75 mMol 6-PG im Gesamtvolumen von 2,5 ml.

NADPH-Oxydase: 190 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 12,5 mg Trockengewicht; 3,92 mMol MgCl₂; 0,12 mMol NADPH in 2,5 ml.

Hexokinase: 166 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 6,8 mg Trockengewicht entspr. 54,4 mg Frischgewicht; 0,39 mMol NADP⁺; 15,68 mMol MgCl₂; 10 µg Glucose-6-Phosphatdehydrogenase; 11,92 mMol Glucose; 5,48 mMol ATP in 2,5 ml.

Phosphoglucomutase: 178 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 6,8 mg Trockengewicht; 0,39 mMol NADP⁺; 3,92 mMol MgCl₂; 0,43 mMol EDTA; 10 µg Glucose-6-Phosphatdehydrogenase; 12,41 µMol Glucose-1,6-diphosphat; 3 mMol Glucose-1-Phosphat in 2,5 ml Küvettenvolumen.

Phosphoglucoisomerase: 182 µMol Tris-Puffer (pH 7,47); 6,8 mg Trockengewicht; 0,39 mMol NADP⁺; 3,92 mMol MgCl₂; 10 µg Glucose-6-Phosphatdehydrogenase; 3,1 mMol Fructose-6-Phosphat in 2,5 ml Küvettenvolumen.

Proteinbestimmung nach Mikrobiuret⁴.

Osmotische Potentiale wurden nach der kryoskopischen Methode ermittelt⁵.

Ergebnisse

1. Metabolite des Glucosekatabolismus

Glucose, Glucose-1-Phosphat, Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat und 6-Phosphogluconat.

Die durch Verletzung der Speicherorgane bewirkte Derepression des Genoms der Parenchymzellen hat bereits nach 4 Stdn. meßbare Veränderungen im

⁴ R. F. ITZHAKI u. D. M. GILL, *Analytic. Biochem.* **9**, 401 [1964].

⁵ K. KREB, *Planta* **65**, 269 [1965].

Intermediatspiegel zur Folge. Durch den aktivierten Stärkeabbau (der auch mikroskopisch sichtbar ist) werden zunächst die Konzentrationen von Metaboliten der Glykolyse erhöht. Das trifft für G-1-P, G-6-P und F-6-P zu (Abb. 1). In der Folge unter-

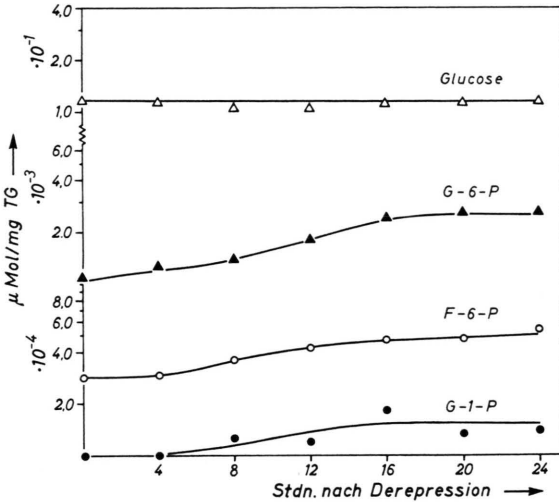


Abb. 1. Konzentrations-Veränderungen von Glucose, Glucose-6-Phosphat (G-6-P), Fructose-6-Phosphat (F-6-P) und Glucose-1-Phosphat (G-1-P) während der ersten 24 Std. nach Derepression.

scheiden sich die Konzentrations-Veränderungen dieser Intermediate nur insofern, als G-6-P und F-6-P 24 Std., G-1-P dagegen erst am 2. Tag nach Derepression ein Maximum erreichen. Danach kommt

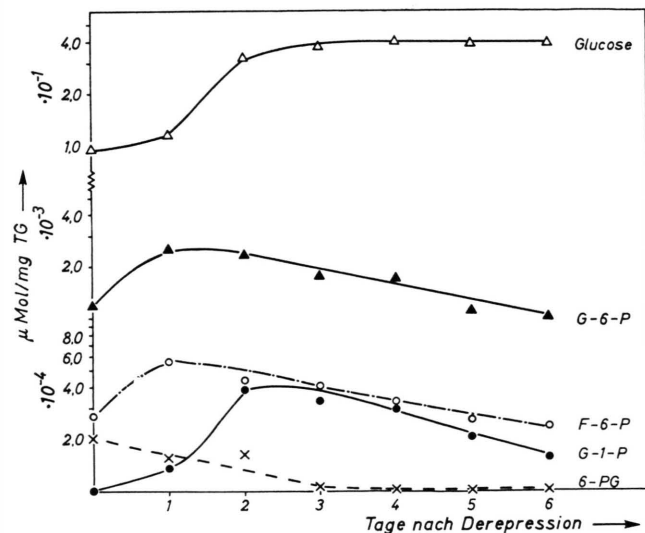


Abb. 2. Konzentrations-Veränderungen von Intermediaten des Glucosekatabolismus im Laufe von 6 Tagen nach Derepression.

es in jedem Falle zu einer kontinuierlichen Konzentrationsabnahme (Abb. 2). Während der gesamten Zeit bleibt das Intermediatmuster in diesem Bereich des Glucosestoffwechsels erhalten, d. h. die Konzentrations-Veränderungen der drei glykolytischen Zuckerphosphate vollziehen sich in gleichartiger Proportionalität.

Der Glucosegehalt bleibt während der gleichen Zeit entweder konstant oder steigt im Vergleich zur Menge der phosphorylierten Metaboliten bis zum ersten Tag nach Derepression nur leicht, später jedoch beträchtlich an. Die a priori in den Zellen in außergewöhnlicher Konzentration vorliegende Glucose ($1 \cdot 10^{-1} \mu\text{Mol/mg TG}$) erreicht dabei nach drei Tagen einen um das Vielfache gesteigerten Wert (etwa $4 \cdot 10^{-1} \mu\text{Mol/mg TG}$), der sich auch im weiteren Verlauf nur unwesentlich ändert.

Bemerkenswert ist gegenüber allen vorgenannten Intermediaten der sofortige Konzentrationsabfall der 6-Phosphogluconsäure, eine Tatsache, die im Zusammenhang mit den Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconatdehydrogenase im folgenden Kapitel diskutiert wird.

Diese bereits nach 4–8 Std. meßbaren Intermediatkonzentrations-Veränderungen sind von der Proteinsynthese abhängig, denn Actidion (greift in noch ungeklärter Weise auf der Translationsstufe der Proteinsynthese ein) und *p*-Fluor-Phenylalanin (wird an Stelle von Phenylalanin unverändert in Proteine eingebaut und führt zu inaktiven Enzymen) unterbinden jegliche Konzentrationsänderung von G-6-P, G-1-P oder F-6-P nach Derepression (eigene Ergebnisse; im Druck).

2. Enzymaktivitäten

a) Aktivitäten von Hexokinase und Phosphoglucomutase

Ein vermehrter Abbau der Stärke via G-1-P und G-6-P, wie er aus den vorher dargelegten Veränderungen des Intermediatspiegels zu folgern war, ließ eine Aktivitätserhöhung der beteiligten Enzyme erwarten. Das ist aber nicht der Fall (Abb. 3). Während HK in den für den Stoffwechsel der Wundzelle entscheidenden ersten 24 Std. nach Derepression ihre Aktivität kaum verändert, verliert die PGM sogar ihre Aktivität bereits nach 4 Std. merklich. Nach 24 Std. ist ihre Umsatzgeschwindigkeit auf ca. 70% des Anfangswertes abgesunken. Diesem

Trend folgt im weiteren Verlauf der Wundheilung auch die HK (Abb. 4).

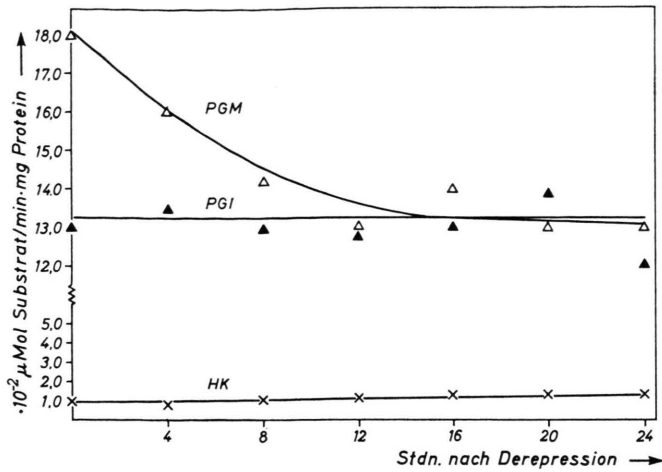


Abb. 3. Aktivitätsveränderungen von Hexokinase (HK), Phosphoglucomutase (PGM) und Phosphoglucoisomerase (PGI) während der ersten 24 Stdn. nach Derepression.

Derepression praktisch nicht verändert werden (Abbn. 3, 4), sind bei den Dehydrogenasen des Pentosephosphatzyklus Aktivitätsveränderungen bereits 4 – 8 Stdn. nach Derepression nachzuweisen (Abb. 5). Ihre Aktivitäten und damit der Umsatz via Pentose-

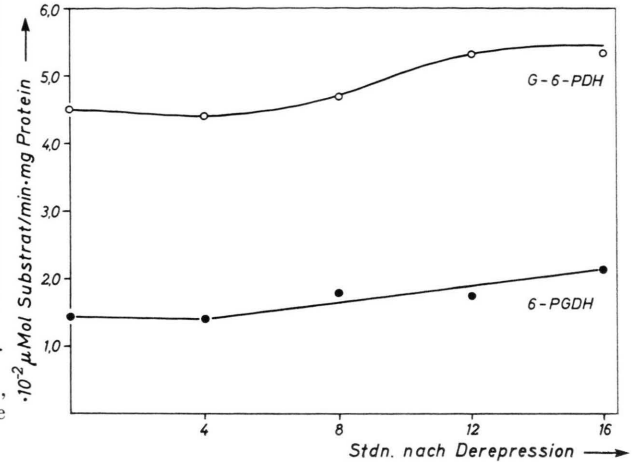


Abb. 5. Aktivitätsveränderungen der Glucose-6-Phosphat-(G-6-PDH) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH) während der ersten 16 Stdn. nach Derepression.

zyklus steigern sich fortlaufend und erreichen nach 1 – 2 Tagen ein Maximum. Danach folgt bei beiden Enzymen ein allmähliches Nachlassen der Aktivitäten (Abb. 6).

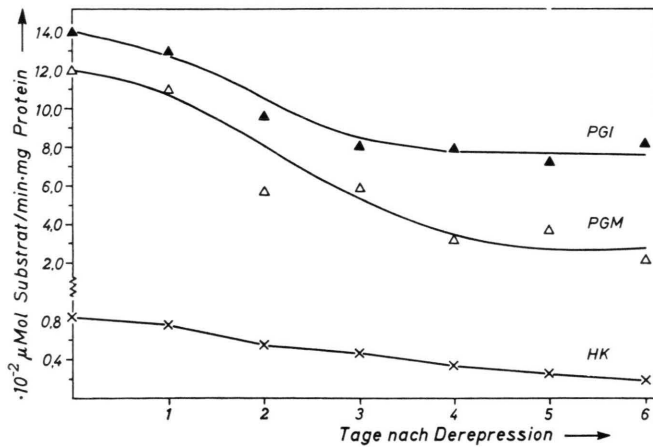


Abb. 4. Aktivitätsveränderung von Hexokinase, Phosphoglucoisomerase und Phosphoglucomutase im Laufe von 6 Tagen nach Derepression.

b) Aktivitäten von Phosphoglucoisomerase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und 6-Phosphogluconatdehydrogenase

Beim weiteren Glucoseabbau nimmt nun G-6-P insofern eine besondere Stellung ein, als diesem Intermediat zwei Abbauwege, Glykolyse und Pentosephosphatzyklus, offenstehen. Es interessieren daher die Aktivitäten der PGI einerseits sowie der G-6-PDH und 6-PGDH andererseits.

Während die Aktivität der PGI – und damit der Umsatz via Glykolyse – in den ersten 24 Stdn. nach

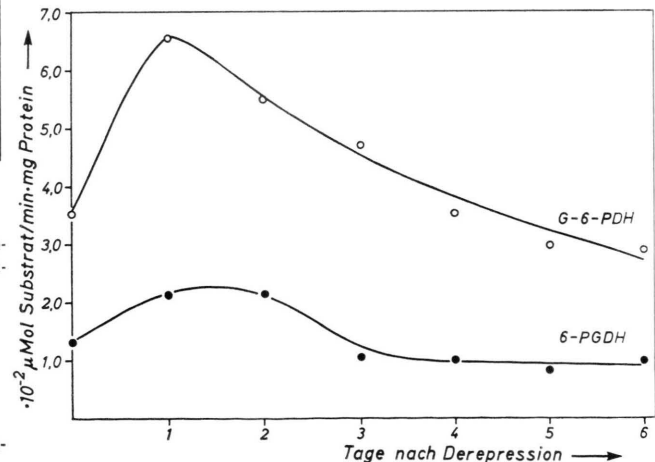


Abb. 6. Aktivitätsveränderungen der Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase im Laufe von 6 Tagen nach Derepression.

Auffallend ist die Aktivitätsdiskrepanz zwischen der G-6-PDH und der weniger aktiven 6-PGDH. Dieser unterschiedliche Umsatz der beiden Enzyme –

ein schon mehrfach beschriebenes Phänomen⁶ – sollte einen Anstau von 6-PG erwarten lassen. Tatsächlich erfolgt aber eine Konzentrations-Minderung dieses Intermediaten (vgl. Kapitel 1). Man muß daher annehmen, daß das durch den hohen Umsatz der G-6-PDH anfallende 6-PG in andere Stoffwechselwege eingeschleust wird. Es ist wahrscheinlich, daß es – über die bei reifenden Erdbeeren und Kresse-sämlingen nachgewiesene Reaktionskette⁷ – in Ascorbinsäure überführt wird, die sich im Wundgewebe in beträchtlichem Umfang anhäuft⁸.

3. Der Einfluß von Inhibitoren der Proteinsynthese (Actidion, *p*-Fluorphenylalanin) auf die Aktivitäten von G-6-PDH und 6-PGDH sowie von PGM, HK und PGI

Die Dehydrogenasen des Pentosephosphatzyklus darf man als lösliche Enzyme in enger räumlicher Nachbarschaft mit den anderen untersuchten Enzymen HK, PGM und PGI im C-Raum der Zelle vermuten⁹. Da – wie die vorher beschriebenen Versuche zeigen – die Aktivitäten dieser Enzyme nach einer Derepression jedoch unterschiedlich geregelt werden (Aktivierung: G-6-PDH, 6-PGDH; Aktivitätsabfall: PGM), stellt sich die Frage nach der Existenz spezifischer Synthese-Abbau-Mechanismen. Folgende Versuche werden zur Klärung durchgeführt.

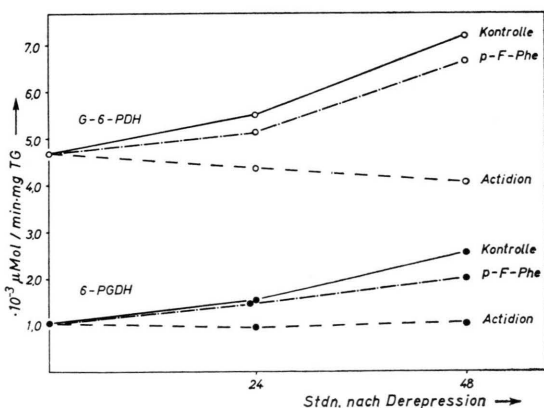


Abb. 7. Die Wirkung von Actidion ($25 \mu\text{g/ml}$) und *p*-Fluorphenylalanin ($100 \mu\text{g/ml}$) auf den Aktivitätsverlauf der Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase.

Wird Actidion in Konzentrationen von $25 \mu\text{g/ml}$ zum Zeitpunkt der Derepression appliziert und damit die bereits nach 60 Min. anlaufende Proteinsynthese³ geblockt, so unterbleibt jegliche Aktivitätssteigerung der beiden Dehydrogenasen (Abb. 7). Das Aminosäureanaloge *p*-Fluorphenylalanin ($100 \mu\text{g/ml}$) – der Gebrauch höherer Konzentrationen impliziert die Möglichkeit unspezifischer Hemmeffekte – vermag allerdings die Synthese der Enzyme nach 48 Std. nur um etwa 20–40% zu unterbinden. Diese unvollständige Hemmung könnte dadurch erklärt werden, daß die verwendete Konzentration des Aminosäureanalogens zu niedrig ist, um einen vollständigen Syntheseblock der Dehydrogenasen zu bewirken. Darüber hinaus könnte auch daran gedacht werden, daß die in Frage stehenden Enzyme nur wenig Phenylalanin enthalten oder aber das Fluoratom die Struktur der Molekel nicht so verändert, daß das aktive Zentrum betroffen wird.

Die Applikation von Actidion genannter Konzentration verändert demgegenüber die Aktivitäten von Hexokinase und PGI nicht, verhindert aber weitgehend den starken Aktivitätsabfall der PGM (Abb. 8). *p*-Fluorphenylalanin unterbindet ebenfalls völlig den PGM-Abbau (Abb. 9).

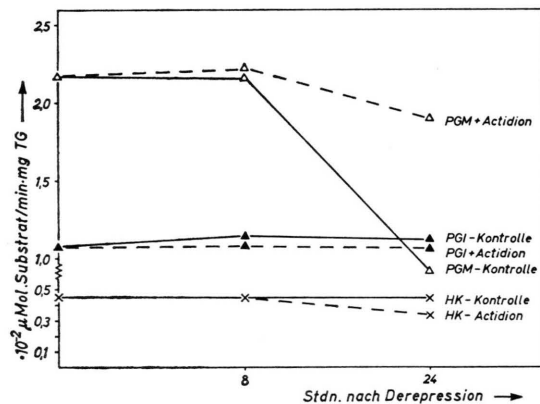


Abb. 8. Die Wirkung von Actidion ($25 \mu\text{g/ml}$) auf den Aktivitätsverlauf von Phosphoglucomutase, Phosphoglucoisomerase und Hexokinase.

Beide Hemmstoffe sind dabei ohne jeden Einfluß auf das Enzymprotein selbst. Beispielsweise setzt die PGM $1,8 \cdot 10^{-1} \mu\text{Mol G-1-P/min}$ und mg Protein

⁷ F. A. LOEWUS, B. J. FINKLE u. R. JANG, Biochem. biophysica Acta [Amsterdam] **30**, 629 [1958].

⁸ W. FRANKE, Planta **44**, 437 [1954].

⁹ TH. BÜCHER u. M. KLINGENBERG, Angew. Chem. **70**, 552 [1958].

⁶ S. HOLLMANN, Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glucose. Biochemie und Klinik. Thieme Verlag, Stuttgart 1961.

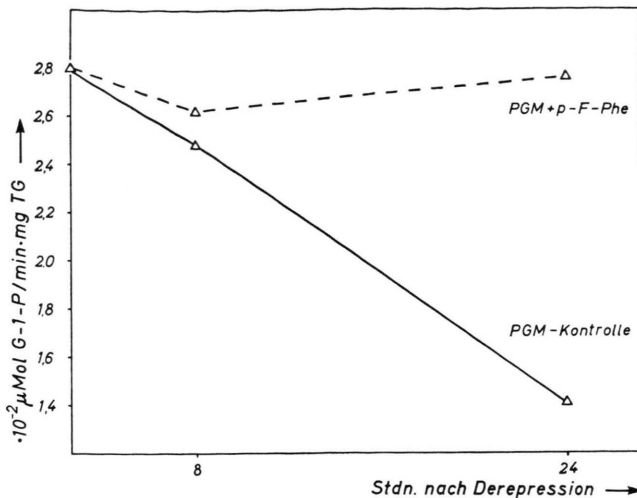


Abb. 9. Die Wirkung von *p*-Fluorphenylalanin (100 $\mu\text{g/ml}$) auf den Aktivitätsverlauf der Phosphoglucomutase.

sowohl bei Abwesenheit als auch in Gegenwart von 25 μg , 50 μg und 150 μg Actidion im Küvettenvolumen um.

Nach diesen Versuchen ist Proteinsynthese notwendige Voraussetzung für die Aktivitätszunahme der Dehydrogenasen des Pentosephosphatzyklus, die somit als Enzymabbau verstanden werden kann. Gleiches gilt auch für die PGM-Aktivitätshemmung, die als Enzymabbau aufgefaßt werden kann. Daraus wird die Spezifität des abbauenden Prinzips deutlich, denn eine unspezifische Proteindestruktion etwa vermittelt Proteasen sollte alle Enzyme des C-Raumes gleichermaßen beeinflussen. Weitere Versuche müssen klären, ob es sich hierbei um spezifische Proteine (in Form der schon von anderen Enzymen her bekannten Inhibitoren¹⁰), um eine Stoffwechselprodukt-Hemmung oder um die Wirkung anderer Systeme handelt.

Was die Regulation der Hexokinase-Aktivität betrifft, die nach den vorher besprochenen Versuchen gleichbleibt bzw. geringfügig nachläßt, obwohl im dereprimierten Gewebe sowohl Glucose (Abbn. 1, 2) als auch ATP¹¹ für eine Aktivierung in ausreichender Menge vorhanden sind, stehen hierfür mehrere Erklärungsmöglichkeiten zur Diskussion: Einmal die räumliche Trennung von Substrat (in der Vakuole) und Enzym; weiterhin die Auswirkungen des im dereprimierten Kartoffelgewebe nachgewiesenen PASTEUR-Effektes (Mangel an cytoplasmatisch ver-

fügbarem ATP). Die hohe Konzentration an G-6-P (Abb. 1) im Wundgewebe könnte auch für eine Regulation auf der Grundlage einer negativen Rückkoppelung (Endprodukt-Hemmung) sprechen. Diese Regelung, die ohne Inanspruchnahme aufwendiger Genomaktionen erfolgt, ist für eine Reihe von Hexokinasen verschiedensten Ursprungs bereits nachgewiesen worden¹².

Dem gleichen Problem begegnet man beim Versuch einer Deutung der PGI-Reaktion nach Derepression, obwohl auch für dieses Enzym eine allosterische Hemmung durch 6-PG nachgewiesen wurde¹³.

Diskussion

1. Derepression und Proteinsynthese

Das Ergebnis einer durch Verwundung bewirkten Reembryonalisation von Speicherparenchymzellen der Kartoffelknolle sind die an der Wundfläche durchgeführten Zellteilungen. Zusammen mit einer gleichzeitig ablaufenden Suberinisierung der der Wundfläche benachbarten Zellwände haben diese die Ausbildung eines die Wunde verschließenden Periderms zur Folge.

Alle zur Reembryonalisation führenden molekularbiologischen Prozesse beginnen nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse bereits unmittelbar nach dem Eingriff und zwar genetisch gelenkt. So sind alle Enzymaktivitäts-Änderungen bereits Konsequenzen einer viel früher einsetzenden Genaktivität, die die Synthese bzw. den Abbau der Enzyme regelt (Synthese: G-6-PDH und 6-PGDH; Abbau: PGM). Es ist dazu differentielle Derepression des vorher reprimierten Genoms² unerlässlich.

Den Beweis einer solchen Derepression nach einer Verletzung des Kartoffelknollen-Parenchyms führten CLICK et al.³. Sie postulieren auf Grund ihrer Ergebnisse sowie unter Berücksichtigung der Befunde anderer Autoren eine zeitliche Reihenfolge der Ereignisse in verwundetem Kartoffelgewebe auf molekularem Niveau: m-RNS-Bildung \rightarrow Bildung ribosomaler RNS \rightarrow Aggregation der Monosomen zu Polysomen \rightarrow Bildung spezifischer Proteine \rightarrow verschiedenste Synthesen und schließlich Zellteilung.

Bisher blieb die Frage nach der Ursache dieser Veränderungen im Genom der betroffenen Zelle unberücksichtigt. Mangels genauerer Kenntnisse über

¹⁰ R. PRESSEY, Arch. Biochem. Biophys. **113**, 667 [1964].

¹¹ R. L. BIELESKI u. G. G. LATIES, Plant. Physiol. **38**, 586 [1963].

¹² C. WALTER u. E. FRIEDEN, Advances in Enzymol. **25**, 167 [1963].

¹³ C. W. PARR, Nature [London] **178**, 1401 [1956].

diesen Bereich pflanzlichen Stoffwechsels bleibt eine Diskussion dieser Frage zunächst zwar spekulativ, trotzdem soll in aller Kürze versucht werden, Befunde verschiedener Autoren so zu integrieren, daß daraus neue Denkmöglichkeiten zum Vorgang der Derepression in Wundzellen abgeleitet werden können.

Als Repressoren vermutet man vorwiegend basische Proteine (Histone) in Pflanzenzellen¹⁴. Für eine verstärkte Transkription wäre also die temporäre Dissoziation von DNS-Histon zu fordern, die bei gereinigten Nucleohistonkomplexen *in vitro* durch hohe Salzkonzentrationen erreicht wird. Dieser Mechanismus scheidet als Ursache der Derepression *in vivo* weitgehend aus, da die zur Trennung der Komplexpartner nötige Salzkonzentration am Genort letale Folgen für die Zelle hätte.

Nun können aber an verschiedensten Geweben durch einfache Veränderungen des osmotischen Potentials der Zellen Teilungen induziert oder die Teilungsintensität beträchtlich verstärkt werden¹⁵. So hat man es also in der Hand, den Übergang von einer „ausdifferenzierten“ zu einer mitotisch aktiven Zelle — das ist aber gleichbedeutend mit einer zumindest teilweisen Derepression des Genoms — zu steuern.

Bei der Unzulänglichkeit aller Methoden zur Bestimmung osmotischer Potentiale ist ein Nachweis der wundbedingten Veränderung des osmotischen Potentials im Laufe von Minuten derzeit nicht möglich, ebensowenig wie die Messung von Potentialveränderung in der Umgebung der Kernstrukturen. Immerhin sind aber deutliche Veränderungen des osmotischen Potentials bereits nach 24-stdg. Wund-

heilung mit der kryoskopischen Methode meßbar (Tab. 1).

Es erscheint daher denkbar, daß eine Dissoziation von Histon-DNS zumindest im vorliegenden Fall direkt oder indirekt durch geeignete Veränderung der Hydratur der Zelle resp. ihres osmotischen Potentials möglich wird. Es müssen methodische Wege zur experimentellen Bearbeitung dieses grundlegenden Problems gesucht werden.

2. Pentosephosphat-Zyklus und Zellteilungen nach Derepression

Der durch Phosphorylasesynthese¹⁶ bedingte Stärkeabbau führt in der Zelle — wie die beschriebenen Versuche erkennen lassen — zu einer Anhäufung von G-1-P und G-6-P. Der weitere Abbau wird so geregelt, daß ein großer Teil des anfallenden G-6-P über den aktivierten Pentose-Shunt geleitet wird (vgl. auch l. c.^{17, 18}).

Eine der notwendigen Voraussetzungen dafür ist erfolgreiche Competition der G-6-PDH mit anderen Enzymen am G-6-P. Vergleicht man alle verfügbaren Michaelis-Konstanten der G-6-PDH-Konkurrenten PGI, G-6-Pase und PGM, so weist — unabhängig von der Enzymquelle — der stets niedrigste *K_m*-Wert der G-6-PDH ($1,7 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) auf erfolgreiche Competition am gemeinsamen Substrat hin (PGI ca. $1 \cdot 10^{-3}$ bis $7 \cdot 10^{-4}$; G-6-Pase $1 \cdot 10^{-3}$ bis $3 \cdot 10^{-4}$; PGM etwa $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l).

Weiterhin muß die in der intakten Knolle sehr geringe G-6-PDH-Menge gesteigert werden, was mit Sicherheit durch Synthese geschieht (Abb. 9) (vgl. auch l. c.^{20, 21}). Da zugleich die PGI-Reaktion im verletzten gegenüber dem ungestörten Gewebe zumindest nur gleichgehalten, auf keinen Fall aber gesteigert wird, prägen die stark erhöhten Aktivitäten der Enzyme des oxydativen Pentosezyklus das Bild der ersten Schritte des Stärkekatabolismus.

Der Pentosezyklus selbst stellt einen universellen Mechanismus zur Transformierung der Glucose in verschiedene, für Biosynthesen wichtige Intermediärprodukte dar. Der Bedarf der Wundzellen an Pentosen zur Nucleotid-¹⁹ und Nucleinsäureproduk-

Tage nach Depression	Osmotisches Potential [atm]
0	8,1
1	10,62
2	14,84
3	16,24
4	14,90

Tab. 1. Veränderungen des osmotischen Potentials beim Kartoffelknollen-Parenchym im Zeitraum von 4 Tagen nach Derepression.

¹⁴ J. BONNER u. J. E. VARNER, *Plant Biochemistry*, Academic Press, New York 1965.

¹⁵ H. LANGE u. G. ROSENSTOCK, *Beitr. Biol. Pflanzen* **39**, 383 [1963].

¹⁶ G. KAHL, Dissertation, Univ. Frankfurt/Main 1966.

¹⁷ F. ALBERGHINA u. E. MARRÉ, *Atti Accad. naz. LINGEI* **30**, 261 [1961].

¹⁸ T. APREES u. H. BEEVERS, *Plant Physiol.* **35**, 839 [1960].

¹⁹ J. S. HAWKER u. G. G. LATIES, *Plant Physiol.* **38**, 498 [1963].

²⁰ N. CALO u. J. E. VARNER, *Plant Physiol.* **32**, XLVI [1957].

²¹ E. MARRÉ u. F. ALBERGHINA, *Boll. Soc. ital. Biol. sperim.* **36**, 1771 [1961].

tion^{3, 11, 22} wird durch diesen Stoffwechselweg gedeckt. Die sog. Shikimisäure-Prephensäure-Sequenz – ohne den Pentosephosphatzyklus-Vorspann nicht denkbar – ist Voraussetzung zur Bildung vieler aromatischer Verbindungen, die im Wundgewebe intensiv hergestellt werden²³. Auch werden Pentose-derivate in die Histidin-²⁴ und Tryptophan-Synthese²⁵ einbezogen, was u. a. für die wundbedingte IES-Synthese von Bedeutung sein könnte.

Das im Pentosezyklus gebildete NADPH ist für die im Wundgewebe nachgewiesene Fettsäuresynthese erforderlich. Darüber hinaus setzt die Proteinsynthese des Kartoffelwundgewebes eine ausreichende Menge an Aminosäuren voraus, deren Konzentration während der anfänglichen Phase der Wundheilung stark verringert wird²⁶. Für die Nachlieferung

ist die NADPH-spezifische reduktive Aminierung von α -Ketosäuren zu Glutamat von Bedeutung, zumal sich die Aktivität der Glutamatdehydrogenase nach Derepression des Parenchyms erhöht (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse).

Der notwendige Ausschluß jeglicher Betrachtung struktureller Gegebenheiten der Zelle, wichtiger Stoffwechselbereiche wie Nucleinsäurestoffwechsel, Protein-, Fettsäure- und Steroidalkaloidsynthese, Säureumsatz und alle Änderungen in der Atmungskette der Wundzelle erfordert dringlich weitere Untersuchungen zur Frage der Derepression in pflanzlichen Geweben.

Frau MARGOT KRAUSE und Fräulein RENATE BERKNER danken wir für ausgezeichnete technische Assistenz.

²² M. J. SAMPSON u. G. G. LATIES, *Plant Physiol.* **43**, 1011 [1968].

²³ K. R. HANSON u. M. ZUCKER, *J. biol. Chemistry* **238**, 1105 [1963].

²⁴ B. L. HORECKER, 8. Coll. Ges. Physiol. Chem. 1958.

²⁵ C. YANOFKY, *Biochem. biophysica Acta* [Amsterdam] **20**, 438 [1956].

²⁶ J. RATHS, Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin 1958.

Negative Staining of Plant Slime Cellulose: An Examination of the Elementary Fibril Concept

WERNER W. FRANKE and BÄRBEL ERMEN

Lehrstuhl für Zellbiologie, Institut für Biologie II, Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforschg. **24 b**, 918–922 [1969]; eingegangen am 13. März 1969)

Die Cellulose pflanzlicher Schleime (von Quittenkernen und Senfsamen) wurde direkt, nach Aceton-Fällung und nach Alkali-Extraktion im Negativkontrastverfahren (Phosphorwolframsäure und Uranylacetat) auf hydrophilisierten Trägerfolien elektronenmikroskopisch untersucht. Die einzeln liegenden Fibrillen besitzen Breiten von 100 Å bis hinunter zu 10–12 Å. Derartig dünne Fibrillen stellen die kleinsten bisher im Elektronenmikroskop nachgewiesenen Polysaccharidstrukturen dar. Darüber hinaus läßt sich feststellen, daß die für Cellulosefibrillen charakteristische bandförmige Struktur auch für Fibrillen mit Abmaßen im Bereich der „Elementarfibrillen“ von FREY-WYSSLING und MÜHLETHALER zutrifft. Die kleinsten noch gut meßbaren Fibrillenbänder haben Querschnitte von etwa 12–15·30–40 Å. Die Messungen widerlegen bisher weithin akzeptierte Vorstellungen von einer Elementarfibrille mit einem Querschnitt von ca. 35·35 Å als kleinster Struktureinheit nativer Cellulose. Aus den gefundenen Fibrillendimensionen ergeben sich Folgerungen für die gegenwärtig zur Diskussion stehenden Cellulose-Modelle.

According to a hypothesis of FREY-WYSSLING and MÜHLETHALER^{1–5} the ultimate structural unit of native cellulose is the so-called *elementary fibril* with a cross-section of about 35 × 35 Å. The larger cellulose *microfibrils* showing widths in the 100 to 300 Å range are thought of as being composed

of these elementary fibrils by lateral fasciation in the direction of the 101 plane^{2, 6}. This concept of a unit elementary fibril has been accepted by many authors (e.g. l. c.^{7, 8}) and served as a basis for constructing models of the arrangement of the cellulose molecules within the native fibril (e.g.

¹ K. MÜHLETHALER, *Beih. Z. Schweiz. Forstverw.* **30**, 55 [1960].

² A. FREY-WYSSLING u. K. MÜHLETHALER, *Makromolekulare Chem.* **62**, 25 [1963].

³ A. FREY-WYSSLING, K. MÜHLETHALER u. R. MUGGLI, *Holz-Roh- u. Werkstoff* **24**, 443 [1963].

⁴ K. MÜHLETHALER, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **18**, 1 [1967].

⁵ K. MÜHLETHALER u. R. MUGGLI, *Papier* **23**, 15 [1969].

⁶ A. FREY-WYSSLING, *Science* [Washington] **119**, 80 [1954].

⁷ E. SCHNEPF, *Planta* **67**, 213 [1965].

⁸ A. N. J. HEYN, *J. Cell Biol.* **29**, 181 [1966].