

## EINFLUSS MÖGLICHER PHOSPHODIESTERASE-INHIBITOREN UND cAMP AUF DIE BETACYAN-AKKUMULATION

RUDOLF ENDRESS

Lehrstuhl für Botanische Entwicklungsphysiologie, der Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart-Hohenheim, Emil-Wolffstr. 25, Deutschland

(Eingegangen 28 Februar 1977)

**Key Word Index**—*Portulaca grandiflora*; Portulacaceae; callus; betacyanin accumulation; papaverine; theophylline; cyclic AMP; tyrosinase.

**Abstract**—The influence of cyclic AMP, theophylline, papaverine and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  on the accumulation of betacyanin in callus of *Portulaca grandiflora*, var. JR, were studied in relation to amounts of dihydroxyphenylalanine (DOPA), dopamine, phenylalanine, tyrosine, protein, 'lipid' and the nucleotides CMP, AMP, GMP and UMP present. Inhibition of betacyanin formation is characterized by reduced amounts of DOPA and dopamine and a constant rise of GMP and CMP (GMP/CMP = 8). Protein accumulation is also inhibited. The increase in pigment accumulation due to theophylline and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  is characterized by a raised DOPA and protein concentration and a lower GMP/CMP ratio (= 3). The increase in betacyanin accumulation is due to *de novo* synthesis of enzymes. Inhibition is probably due to the regulation of the callus phosphodiesterase by papaverine and theophylline ( $\leq 10^{-5}$  M/l) which triggers a change in concentration of nucleotides, which eventually regulates tyrosinase biosynthesis.

### EINLEITUNG

In Kallus von *Portulaca grandiflora*, var. JR, kann durch unterschiedliche Faktoren die Betacyan-Akkumulation beeinflusst werden [1, 2]. Diese Beeinflussung könnte unter anderem in gleicher Weise wie die Biosynthese der Anthocyane [3] bzw. von Amaranthin in *Amaranthus caudatus* [4] über eine differentielle Genaktivierung ermöglicht werden. Eine Beteiligung von cAMP wird ebenfalls diskutiert [5–8]. Eine derartige Steuerung durch cAMP könnte sowohl über eine Änderung der Anlieferung von Phenylalanin und Tyrosin und damit der Betacyanvorstufe DOPA [9] auf Grund einer Beeinflussung des zellulären Transportes [10], als auch über eine Aktivitätsänderung von Enzymen [11], über eine direkte Genaktivierung wie bei Mikroorganismen [12] oder, wie in *Vigna sinensis*, [13] über eine Beeinflussung des Nukleotidgehaltes der Zelle erfolgen. Eine derartige Veränderung des Nukleotidgehaltes könnte durch eine Beeinflussung der cyclischen Phosphodiesterase aus Kallus von *Portulaca grandiflora*, var. JR [14] ermöglicht werden. Allerdings ist das Vorkommen von cAMP in höheren Pflanzen umstritten und seine mögliche physiologische Funktion ungeklärt [15–19]. Trotz des teilweise von tierischen Objekten abweichenden Verhaltens pflanzlicher Phosphodiesterasen [20] wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Betacyan-Akkumulation und aus Experimenten an tierischen und menschlichen Zellkulturen als mögliche Phosphodiesteraseinhibitoren bekannte Substanzen (Papaverin [21, 22]; Theophyllin [11, 20, 23];  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  [11]) untersucht. Eine direkte Verwendung von cAMP [5] zur Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels war naheliegend, zumal bereits Ergebnisse über den Einfluß von Adenin bzw. Adenosin [1, 2, 24, 25] vorliegen und Kallus im Gegensatz zu differenzierteren Organen die Möglichkeit physiologischen Arbeitens in unmittel-

barer Nähe des tatsächlichen Wirkungsortes ermöglicht [2].

Mit Hilfe der Antimetaboliten Actinomycin  $\text{C}_1$  und Actidion (Cycloheximid) sollte eine mögliche Wirkung von Theophyllin auf der Ebene der Transkription und Translation überprüft werden.

Da *Portulaca*-Arten für einen hohen Gehalt an Catecholaminen bekannt sind [26], die mit den Betalaminen um dieselbe Vorstufe Dihydroxyphenylalanin (DOPA) konkurrieren, wurde neben dem Betacyan-, Protein- und 'Lipid'- sowie der Konzentration der Nukleotide AMP, CMP, GMP, UMP auch der Gehalt an den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin sowie an DOPA und Dopamin unter dem Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen obiger Substanzen ermittelt.

### ERGEBNISSE

#### Beeinflussung der Betacyan-, DOPA-, Dopamin-, Protein und 'Lipid'-Akkumulation

**Papaverin-Wirkung.** Bei der Beurteilung der Wirkung dieses Phosphodiesterase Hemmers [21, 22], einem 1 - (3,4 - dimethoxybenzyl) - 6,7 - dimethoxyisoquinolin, muß ein aus Experimenten an tierischen Objekten bekannter Abbau [27, 28] in Rechnung gestellt werden. Auf Grund der möglichen Synthese aus Dopamin und 3,4-dimethoxyphenylacetaldehyde [29] kann auch ein Abbau in diese Produkte angenommen werden, wobei weitere, anders geartete Abbauprodukte [27, 28] nicht ausgeschlossen werden können. Insbesondere die für höhere Konzentrationen (100  $\mu\text{g/ml}$ ) bekannte Letalwirkung in tierischen Objekten [21] und das schlechtere Wachstum unseres Kallus bei der Konzentration  $10^{-3}$  M/l. (374  $\mu\text{g/ml}$ ), spricht für die Bildung eines Zellgiftes, z.B.

Tabelle 1. Abhängigkeit von Biosyntheseprozessen in Kallus von *Portulaca grandiflora* var. JR vom Gehalt an Papaverin ( $10^{-8}$ – $10^{-3}$  M/l.), cAMP ( $10^{-5}$ – $10^{-2}$  M/l.), Theophyllin ( $2 \cdot 10^{-6}$ – $10^{-3}$  M/l.) und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  M/l.) im Medium nach Murashige und Skoog [43]

M/l.	'Lipide'	Protein	Betacyan	DOPA	Dopamin
		Gesamtextinktion/g Kallus			
ohne Zusatz	2,73	1,23	7,94	4,0	172,4
zusätzlich		Änderung des Gehalts in (%)			
(a) Papaverin					
$10^{-8}$	0	0	- 15	- 38	+ 1,5
$10^{-7}$	- 23	- 21	- 23	- 45	+ 0
$10^{-6}$	- 26	- 29	- 27	- 52	+ 0
$10^{-5}$	- 20	- 20	- 35	- 65	- 3,5
$10^{-4}$	- 16	- 17	- 41	- 75	- 5
$10^{-3}$	- 36	- 35	- 72	- 31	+ 2
(b) cAMP					
$10^{-5}$	- 44	- 23	- 10	- 20	+ 6
$10^{-4}$	- 29	- 11	- 13	- 42	- 5
$10^{-3}$	- 16	- 6	- 115	- 50	- 20
$10^{-2}$	0	+ 6	- 18	- 65	- 30
(c) Theophyllin					
$2 \cdot 10^{-6}$	+ 11	0	- 23	- 56	- 29
$5 \cdot 10^{-6}$	- 36	+ 1	- 35	- 70	- 65
$10^{-5}$	+ 183	+ 13	- 31	- 65	- 72
$2 \cdot 10^{-5}$	+ 146	+ 33	0	+ 65	- 65
$5 \cdot 10^{-5}$	+ 130	+ 44	+ 14	+ 72	- 29
$10^{-4}$	+ 78	+ 48	+ 32	+ 153	+ 11
$5 \cdot 10^{-4}$	+ 36	+ 52	+ 14	+ 126	- 8
$10^{-3}$	+ 31	+ 21	- 14	- 46	- 30
(d) $\text{NH}_4\text{NO}_3$					
$10^{-6}$	+ 37	+ 42	+ 27	+ 65	0
$10^{-5}$	- 18	+ 45	+ 49	+ 17,5	- 1
$10^{-4}$	- 52	- 3	- 3	+ 20	- 3
$10^{-3}$	- 26	- 11	- 32	- 37,5	- 1,5

Wiedergegeben wird der Gehalt an 'Lipiden', Protein, Betacyan, Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und Dopamin in Kallus, der auf dem Medium nach Murashige und Skoog [43] ohne Zusätze kultiviert wurde, angegeben in Gesamtextinktion/g Kallus, sowie die durch Papaverin, cAMP, Theophyllin und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ausgelösten Veränderungen in Prozent (%), des Gehalts im unbehandelten Kallus. Die Werte sind Mittelwerte zweier getrennter Versuche mit je 50 Schälchen pro Konzentration.

Acetaldehyd. Der bei dieser Konzentration auftretende erhöhte Dopamingehalt könnte auf Grund einer Verschiebung des Gleichgewichts der DOPA Decarboxylierungsreaktion auch die Ursache für die verminderte Hemmung der DOPA-Akkumulation sein.

Bei den Konzentrationen  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M/l. erfolgt dagegen eine Reduzierung der Dopamin-Akkumulation. ( $10^{-4}$  M/l.: 5%). Sowohl die ausgeprägte Hemmung der DOPA- als auch der Betacyan-Akkumulation ( $10^{-4}$  M/l.: – 75% bzw. – 41%) ist konzentrationsabhängig. Die Protein- und 'Lipid'-Akkumulation wird über den ganzen Konzentrationsbereich hinweg deutlich gehemmt (Tabelle 1a).

cAMP-Wirkung. Das in den Konzentrationen  $10^{-5}$  bis  $10^{-2}$  M/l. gefütterte cAMP löst bei allen untersuchten Substanzen einen deutlichen Effekt aus (Tabelle 1b). Während die DOPA-, Betacyan- und Dopamin-Akkumulation—letztere erst ab  $10^{-4}$  M/l.—konzentrationsabhängig gehemmt werden, nimmt diese Hemmung bei der Protein- und 'Lipid'-Akkumulation mit steigender Konzentration ab. Obwohl diese konzentrationsabhängige Wirkung für einen direkten Einfluß des cAMP's spricht, muß mit einem möglichen Abbau [30] in Adenosin bei der Aufnahme gerechnet werden. Allerdings

konnte für Protoplasten eine direkte Aufnahme wahrscheinlich gemacht werden [31, 32].

Theophyllin-Wirkung. Der Einfluß des Theophyllins kann in zwei Konzentrationsbereiche unterteilt werden (Tabelle 1c). Im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-5}$  M/l. wird bei schwach ansteigendem Proteingehalt (0–13%) und ansteigende Tendenz zeigende 'Lipid'-Konzentration, sowohl der Betacyan- ( $5 \cdot 10^{-6}$  M/l.: – 35%) als auch der DOPA- ( $5 \cdot 10^{-6}$  M/l.: – 70%) und Dopamin gehalt ( $10^{-5}$  M/l.: – 72%) deutlich reduziert. Dagegen wird im Bereich von  $2 \cdot 10^{-5}$  bis  $10^{-3}$  M/l. in Verbindung mit einer gesteigerten Protein-Akkumulation ( $5 \cdot 10^{-4}$  M/l.: + 52%) eine erhöhte Konzentration an DOPA ( $10^{-4}$  M/l.: + 153%) und Betacyan ( $10^{-4}$  M/l.: 32%) ausgelöst. Dopamin wird lediglich bei  $10^{-4}$  M/l. leicht gefördert (+ 11%), während es bei allen anderen Konzentration deutlich gehemmt wird.

Antimetaboliten-Versuche. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, kann die durch Theophyllin der Konzentration  $10^{-4}$  M/l. (Tabelle 1c) ausgelöste Steigerung der Proteinakkumulation durch  $10^{-3}$  und  $10^{-2}$   $\gamma$ /ml Actinomycin  $\text{C}_1$  sowie  $10^{-2}$  und  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml Actidion unterbunden werden. Es kann daher von einer de novo Synthese von Proteinen unter dem Einfluß des Theophyllins aus-

Tabelle 2. Beeinflussung der durch Theophyllin ( $10^{-4}$  M/l., Tabelle 1c) ausgelösten Proteinakkumulation durch Actinomycin C<sub>1</sub> ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$   $\gamma$ /ml) und Actidion (Cycloheximid) ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$   $\gamma$ /ml)

M/l.	'Lipide'	Protein	Betacyan Gesamtextinktion/g Kallus	DOPA	Dopamin
ohne Zusatz	2,73	1,23	7,94	4,0	172,4
Theophyllin $10^{-4}$ zusätzlich (a) Actinomycin C <sub>1</sub> $\gamma$ /ml	+ 78	+ 48	Änderung des Gehalts in (%) + 32	+ 153	+ 11
$10^{-2}$	0	- 12	- 21	+ 64	+ 1,5
$10^{-3}$	- 6	0	+ 24	+ 29	+ 8
(b) Actidion $10^{-1}$	- 75	- 8	- 51	- 55	- 2,5
$10^{-2}$	- 71	0	- 75	- 80	- 3

Wiedergegeben wird der Gehalt an 'Lipiden', Protein, Betacyan, Dihydroxyphenylalanin(DOPA) und Dopamin, angegeben in Gesamtextinktion/g Kallus, sowie die Unterschiede in Prozent(%) zwischen Kallus, der auf dem Medium nach Murashige und Skoog [43] und Kallus, der auf dem gleichen Medium unter Zusatz von Theophyllin der Konzentration  $10^{-4}$  M/l. und der jeweiligen Konzentration ( $\gamma$ /ml) des betreffenden Antimetaboliten (Actinomycin C<sub>1</sub>, Actidion) kultiviert wurde.

gegangen werden. Die durch Actidion erzielte allgemeine Hemmung ließe auf eine unspezifische Letalwirkung schließen. Allerdings zeigte der Kallus innerhalb des Versuchszeitraums im Erscheinungsbild (braun Färbung, aufweichen) und im Wachstum keinerlei dafür sprechenden Anzeichen.

**NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Wirkung.** Bei gehemmter 'Lipid'-Akkumulation kommt es unter dem Einfluß von Ammoniumnitrat der Konzentration  $10^{-6}$  bis  $10^{-5}$  M/l. zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Förderung

der Betacyan- und Protein-Akkumulation. Die anfänglich auftretende Steigerung der DOPA-Akkumulation geht bei  $10^{-3}$  M/l. in eine Hemmung über. Bei der Konzentration  $10^{-4}$  M/l. bleibt Protein- und Betacyan-Akkumulation (- 3%) weitgehend unbeeinflusst, während die 'Lipid'-Akkumulation deutlich gehemmt (- 52%), die DOPA-Akkumulation um 20% gefördert wird. Die Dopamin-Akkumulation wird über den ganzen Konzentrationsbereich hin schwach gehemmt (Tabelle 1d).

Tabelle 3. Einfluß von Papaverin, cAMP, Theophyllin und NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> auf die Akkumulation der Nukleotide CMP, AMP, GMP, UMP

M/l.	CMP	AMP	GMP	UMP	AMP/CMP	GMP/CMP	UMP/CMP
	Gesamtextinktion/g Kallus						
ohne Zusatz	32,85	35,46	12,53	4,5			
zusätzlich	Änderung des Gehalts in (%)						
(a) Papaverin							
$10^{-3}$	+ 189	+ 346	+ 1504	+ 331	1,8	8	1,75
$10^{-4}$	+ 136	+ 136	+ 1088	+ 691	1,0	8	5,08
$10^{-5}$	+ 62	+ 15	+ 485	+ 575	0,24	8	9,27
(b) cAMP							
$10^{-2}$	+ 44	+ 86	+ 350	+ 613	1,95	8	13,93
$10^{-3}$	+ 42	+ 58	+ 340	+ 740	1,4	8	17,62
$10^{-4}$	+ 40	+ 39	+ 313	+ 1985	0,98	8	49,63
$10^{-5}$	+ 17	+ 4	+ 141	+ 1675	0,24	8	98,53
(c) Theophyllin							
$10^{-4}$	+ 152	+ 129	+ 456	+ 288	0,85	3	1,89
$10^{-5}$	+ 90	+ 11	+ 750	+ 695	0,12	8	7,7
(d) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>							
$10^{-5}$	+ 151	+ 17	+ 461	+ 574	0,11	3	3,8
$10^{-6}$	+ 69	+ 20	+ 210	+ 434	0,29	3	6,3

Wiedergegeben ist der Gehalt an CMP, AMP, GMP, UMP im Kallus der auf dem Medium nach Murashige und Skoog [43] ohne Zusatz kultiviert wurde, angegeben in Gesamtextinktionen/g Kallus, sowie die durch Papaverin ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), cAMP ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), Theophyllin ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) und NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M/l.) ausgelösten Veränderungen, angegeben in % des im unbehandelten Kallus, und die auf-bzw. abgerundeten Werte der Veränderungen bezogen auf die Veränderung des CMP-Gehaltes. Die Angaben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 50 Schälchen pro Konzentration.

### Beeinflussung der Nukleotid-Akkumulation

Sowohl unter dem Einfluß von Papaverin als auch cAMP (Tabelle 3a, b) tritt parallel zur konzentrationsabhängigen Hemmung der Betacyan-Akkumulation eine deutliche Steigerung der CMP, AMP, GMP Konzentration auf. Die Akkumulation von UMP zeigt keine derartige Konzentrationsabhängigkeit. Während die Steigerung des GMP und CMP Gehaltes hierbei in einem konstanten Verhältnis erfolgt, ist die Akkumulation von AMP und UMP durch ein mit sinkender Konzentration an Papaverin und cAMP abnehmendes AMP/CMP und ansteigendes UMP/CMP-Verhältnis gekennzeichnet. Bei der eine Hemmung der Betacyan-Akkumulation auslösenden Konzentration an Theophyllin ( $10^{-5}$  M/l, Tabelle 1c) ergibt sich für das GMP/CMP-Verhältnis der selbe Wert (8). Eine Steigerung der Betacyan-Akkumulation auslösende Konzentrationen an Theophyllin ( $10^{-4}$  M/l, Tabelle 1c) und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M/l, Tabelle 1d) sind durch ein GMP/CMP-Verhältnis von 3 gekennzeichnet (Tabelle 3c, d). Vor dem Hintergrund dieses niederen GMP/CMP-Verhältnisses nimmt beim  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mit sinkender Konzentration und abnehmender Förderung der Farbstoffakkumulation sowohl das AMP/CMP als auch das UMP/CMP Verhältnis zu.

### Beeinflussung der Phenylalanin und Tyrosin-Akkumulation

Sowohl cAMP als auch Papaverin hemmt die Akkumulation der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Allerdings nimmt die Hemmung mit steigender Konzentration ab (Tabelle 4a, b) im Gegensatz zur ständigen Zunahme der DOPA-Akkumulationshemmung. Während die Veränderung der Konzentration an Phenylalanin auf ein hohes, jedoch relativ konstantes Ausmaß (Papaverin: -53, -57, -53%; cAMP: -68, -71, -73%) beschränkt ist, sinkt die Hemmung der Tyrosin-Akkumulation konzentrationsabhängig von -63 bzw. -68% auf -11 bzw. -21% ab. Das abweichende Verhalten unter dem Einfluß von Papaverin der Konzentration  $10^{-3}$  M/l. dürfte auf den bereits erwähnten Abbau von Papaverin und den dadurch möglicher Weise erhöhten Gehalt an DOPA zurückzuführen sein.

Dieses reziproke Verhalten der Tyrosin- und DOPA-Akkumulation kann auf einer Hemmung der Überführung von Tyrosin in DOPA beruhen. Geht die Hemmung der DOPA-Akkumulation zurück, so daß mehr Tyrosin in DOPA überführt werden, nimmt der Gehalt an Tyrosin ab. Da sich am Kallus keinerlei Wachstumsstörungen erkennen ließen, dürfte der reduzierte Gehalt an Phenylalanin auf einer verstärkten Synthese anderer, ebenfalls Phenylalanin verbrauchender Produkte beruhen.

### DISKUSSION

Das exogen gefütterte cAMP und die als mögliche Inhibitoren tierischer Phosphoseresterasen bekannten Verbindungen Papaverin, Theophyllin und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  üben einen deutlichen, konzentrationsabhängigen Einfluß auf die Akkumulation von DOPA, Dopamin, Phenylalanin, Tyrosin und Betacyan im Kallus von *Portulaca grandiflora*, var. JR aus. Die hierbei bei Theophyllin ( $\leq 10^{-5}$  M/l.) sowie Papaverin und cAMP auftretende konzentrationsabhängige Hemmung der DOPA-, Dopamin- und Betacyan-Akkumulation wird bei cAMP ( $10^{-5}$  bis  $10^{-3}$  M/l.) und Papaverin ( $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M/l.) von einer Zunahme (Verringerung der Hemmung) der Tyrosin-Akkumulation begleitet. Die Akkumulation von Protein wird dabei durch Papaverin und cAMP ( $10^{-5}$  bis  $10^{-3}$  M/l.) gehemmt, durch Theophyllin leicht gefördert. Papaverin und cAMP beeinträchtigen offensichtlich die Betacyan-Akkumulation über eine Hemmung der Anlieferung der Vorstufe Dihydroxyphenylalanin (DOPA) über eine Hemmung der Synthese von Enzymen, die auf dem Biosyntheseweg von DOPA aktiv sind. Da mit abnehmender Hemmung der DOPA-Akkumulation die Konzentration an Tyrosin sinkt, kann auf eine Regulation auf der Ebene der Tyrosinase (EC1.10.3.1) geschlossen werden. Mit abnehmender Hemmung der DOPA-Akkumulation wird vermehrt Tyrosin verbraucht, so daß dessen zelluläre Konzentration abnimmt.

Tabelle 4. Einfluß von Papaverin der Konzentration  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  M/l. und cAMP der Konzentration  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  M/l. auf die Akkumulation von Phenylalanin, Tyrosin und Dihydroxyphenylalanin (DOPA)

	Gehalt an			Änderung des Gehalts an		
	Phenylalanin	Tyrosin (E/g Kallus)	DOPA	Phenylalanin	Tyrosin (%)	DOPA
ohne Zusatz	0,38	0,19	4,0	—	—	—
zusätzlich						
(a) Papaverin						
(M/l.)						
$10^{-3}$	0,19	0,10	2,77	- 50	- 47	- 31
$10^{-4}$	0,18	0,17	1,03	- 53	- 11	- 75
$10^{-5}$	0,16	0,12	1,4	- 57	- 37	- 65
$10^{-6}$	0,18	0,07	1,9	- 53	- 63	- 52
(b) cAMP						
(M/l.)						
$10^{-3}$	0,12	0,15	2,0	- 68	- 21	- 50
$10^{-4}$	0,11	0,10	2,34	- 71	- 47	- 42
$10^{-5}$	0,10	0,06	3,2	- 73	- 68	- 20

Wiedergegeben wird der Gehalt an Phenylalanin, Tyrosin und Dihydroxyphenylalanin(DOPA) in Extinktionen/g Kallus sowie die ausgelöste Konzentrationsänderung in % des Gehalts im unbehandelten Kallus. Die Werte sind statistisch abgesicherte Mittelwerte zweier getrennter Versuche mit jeweils 20 Einzelwerten pro Konzentration.

Der die durch Papaverin, cAMP und Theophyllin ausgelöste Hemmung der Farbstoffakkumulation begleitende Anstieg der GMP, CMP und AMP-Konzentration, die durch ein konstantes GMP/CMP = 8 Verhältnis gekennzeichnet ist, spricht für eine Beeinflussung des Nukleotidhaushaltes durch die gefütterten Substanzen, möglicher Weise über eine Veränderung des zellulären cGMP und cAMP-Gehalts.

Neben dieser hemmenden kann Theophyllin auch eine fördernde Wirkung ausüben. So wird bei der Konzentration  $10^{-4}$  M eine Förderung der Farbstoffakkumulation induziert, die von einer durch Antimetaboliten der Transkription und Translation egalisierten Steigerung der Proteinsynthese begleitet wird. Es kann daher wie in *Amaranthus caudatus* [4] von einer de novo Synthese von Enzymen ausgegangen werden, die im Biosyntheseweg der Betacyane aktiv sind. In Übereinstimmung mit  $\text{KNO}_3$  im Keimlingen von *A. caudatus* [39, 40] fördert auch  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  die Farbstoffakkumulation bei gleichzeitig gesteigerter Protein-Akkumulation. Diese Förderung ist in beiden Fällen durch ein GMP/CMP-Verhältnis von 3 gekennzeichnet.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse muß davon ausgegangen werden, daß neben einer direkten genetischen Steuerung der Betacyan-Akkumulation [4] auch eine Steuerung über eine Anlieferung der Vorstufe DOPA erfolgt. Möglicher Weise wird unter dem Einfluß von Papaverin und Theophyllin ( $\leq 10^{-5}$  M/l.) die Aktivität der Phosphodiesterase unseres Kallus beeinflußt, wodurch auf Grund eines veränderten Gehalts an cyclischen Nukleotiden, wie in *Vigna sinensis* [14] und Weizenkeimlingen [34], die Aktivität von Ribonucleasen beeinflußt wird [13]. Auf Grund der ungeklärten physiologischen Funktion der Phosphodiesterase in höheren Pflanzen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß durch dieses Enzym der Abbau von RNS auch direkt gesteuert wird [33, 41]. Ein verminderter RNS-Gehalt kann sowohl über eine erhöhte Konzentration an Nukleotiden als auch über eine reduzierte Protein-Akkumulation zum Ausdruck kommen. Wechselwirkungen zwischen Catecholaminen und Nukleotiden, wie sie aus Experimenten an tierischen und menschlichen Geweben bekannt sind [35–38], können allerdings die durch cAMP und Papaverin ausgelösten Effekte überdecken.

Ausgelöst durch cAMP, Papaverin und Theophyllin ( $\leq 10^{-5}$  M/l.) kommt es offensichtlich in unserem Kallus über eine reduzierte Synthese von Enzymen die im Biosyntheseweg der Betacyane aktiv sind, etwa Tyrosinase (EC1.10.3.1), zu einer Hemmung der Anlieferung von DOPA. Dies hat eine reduzierte Betacyan-Akkumulation zur Folge. Eine geringfügige Förderung der Protein-Akkumulation durch cAMP der Konzentration  $10^{-2}$  M/l. und Theophyllin der Konzentration  $10^{-5}$  und  $5 \cdot 10^{-6}$  M/l. trotz gehemmter Farbstoffakkumulation könnte auf einer direkten Induktion der Tyrosinase-Synthese wie in *Neurospora crassa* [42] beruhen.

Untersuchungen hinsichtlich des Verhaltens der Phosphodiesterase [14], des Gehalts an cAMP und cGMP sowie des Umsatzes von RNS in unserem Kallus, sind im Gange.

#### EXPERIMENTELLES

Für die Versuche wurde Kallus von *Portulaca grandiflora*, var. JR [1, 2] auf dem Medium nach Murashige und Skoog [43]

kultiviert, dem jeweils unterschiedliche Konzentrationen an cAMP, Papaverin und Theophyllin zugesetzt wurden.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wurde einem variierten Medium nach Murashige und Skoog [43] zugesetzt, das kein  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  enthielt. Als Vergleich diente auf dem Grundmedium gewachsener Kallus. Bei den Antimetaboliten-Versuchen wurde dem Theophyllin- ( $10^{-4}$  M/l.) haltigen Medium Actinomycin ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$   $\gamma$ /ml) bzw. Actidion- (Cycloheximid) ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$   $\gamma$ /ml) nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Nach 14-tägiger Versuchsdauer [1] wurde das Material lyophilisiert, in *n*-Hexan homogenisiert, das Betacyan wie beschrieben [1], DOPA und Dopamin in Anlehnung an Griffith [44], extrahiert. Die Suspension wurde am Rückflußkühler erhitzt und der lösliche Extrakt mittels einer 3d3 Fritte vom unlöslichen Rückstand abgetrennt. Die Elution von DOPA und Dopamin von der KG-Platte nach der chromatographischen Trennung erfolgte mit 0,1 N HCl. Auf Grund des Absorptionsmaximums des Betacyan-Extraktes bei 532 nm, des *n*-Hexan Extraktes bei 404 nm, des Biuret-Testes bei 546 nm sowie dem Absorptionsmaximum der DOPA-Farbreaktion nach Arnow [45] bei 510 nm unter Verwendung des in 0,1 N HCl gelösten Eluats [46] unter Zugabe von 0,5 N HCl, und dem des Dopamin Testes [36] unter Verwendung von 1 ml Iodid-Lösung und 1 ml der  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung bei 320 nm, jeweils ermittelt im Beckmann DB, erfolgte die Konzentrationsbestimmung bei diesen Wellenlängen im Zeiß-Spektralphotometer PMQ II. Mit Sudan III wurde der *n*-Hexan-Extrakt als lipidhaltig identifiziert. Die Extraktion, Auftrennung und Bestimmung des Gehalts an säurelöslichen Nukleotiden erfolgte nach Markham [47] sowie Ewing und Cherry [48] mittels eines diskontinuierlichen Gradienten an Dowex  $1 \times 8$ , Formiatform, 200–400 mesh, am Ultrarac-Fraktionssammler (LKB) mit angeschlossener absorbance monitor (ISCO UA-5). Die einzelnen Fraktionen wurden bei 260 nm vermessen. Der Gehalt an Phenylalanin und Tyrosin wurde nach der Extraktion [49] kolorimetrisch bestimmt [50]. Die spektralphotometrisch Extinktionsbestimmung erfolgte für Phenylalanin bei 540 nm, für Tyrosin bei 450 nm.

Anmerkung—Herrn Prof. Dr. D. Hess danke ich für die ausführliche Diskussion und die gewährte Unterstützung sowie Frl. E. Katz für ihre sorgfältige technische Assistenz.

#### LITERATUR

- Endress, R. (1976) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **169**, 87.
- Endress, R. (1976) *Assemblée Annuelle 1975 Du Groupe Polyphenole*.
- Hess, D. (1963) *Planta* **59**, 567.
- Köhler, K. H. (1975) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **168**, 113.
- Rast, D., Skrivanova, R. und Bachofen, R. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2669.
- Elliott, D. C. (1974) *Proc. Australian Biochem. Soc.* **7**, 83.
- Elliott, D. C. und Murray, A. W. (1975) *Biochem. J.* **146**, 33.
- Guidici de Nicola, M., Amico, V. und Piattelli, M. (1975) *Phytochemistry* **14**, 989.
- Hörhammer, L., Wagner, H. und Fritzsche, W. (1964) *Biochem. Z.* **339**.
- Foury, F. und Goffeau, A. (1974) *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* **82**, 800.
- Robison, G. A., Butcher, R. W. und Sutherland, E. W. (1971) *Cyclic AMP*. Academic Press, New York.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Kapoor, H. C. und Sachar, R. C. (1976) *Experientia* **32**, 558.
- Endress, R. in Vorbereitung.
- Niles, R. M. und Mount, M. S. (1974) *Plant Physiol.* **54**, 372.
- Giannattasio, M., Mandato, E. und Macchia, V. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 365.
- Lin, P. C. (1974) *Advances in Nucleotide Research*, Vol. 4 (Greengard, P. and Robison, G. A., eds.). Raven Press, New York.
- Amrhein, N. (1974) *Planta* **118**, 241.

19. Sachar, R. C., Taneja, S. R. und Sachar, K. (1975) *J. Sci. Ind. Res.* **34**, 54.
20. Ashton, R. A. und Polya, G. M. (1975) *Biochem. J.* **149**, 329.
21. Prasad, K. N. und Sheppard, J. R. (1972) *Exp. Cell. Res.* **73**, 436.
22. Miyamoto, M., Takayanagi, I., Ohkubo, H. und Takagi, K. (1976) *Japan. J. Pharmacol.* **26**, 114.
23. Wood, H. N. und Braun, A. C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 447.
24. Bigot, Cl. (1968) *Compt. Rend. (D)* **266**, 349.
25. Conrad, K. (1974) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **165**, 531.
26. Feng, P. C., Haynes, L. J. und Magnus, K. E. (1961) *Nature* **191**, 1108.
27. Belpaire, F. M., Bogaert, M. G., Rosseel, M. T. und Anteunis, M. (1975) *Xenobiotica* **5**, 413.
28. Belpaire, F. M. und Bogaert, M. G. (1975) *Xenobiotica* **5**, 421.
29. Nagatsu, T. (1973) *Biochemistry of Catecholamines*. University Park Press, Baltimore.
30. Pollard, C. J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **252**, 553.
31. Tarantowicz-Marek, E. und Kloczkowski, K. (1975) *Plant Sci.* **5**, 417.
32. Wiedmaier, J. und Kull, U. (1976) *Naturwissenschaften* **63**, 147.
33. Philipps, G. R. und Chiemprasert, T. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1097.
34. Polya, G. M. und Ashton, A. R. (1973) *Plant Sci. Letters* **1**, 349.
35. Sutherland, E. W. und Rall, T. W. (1960) *Pharmacol. Rev.* **12**, 265.
36. Sutherland, E. W. und Rall, T. W. (1960) Ciba Found. Symp. Adrenergic Mechanism.
37. Sutherland, E. W. und Robison, G. A. (1966) *Pharmacol. Rev.* **18**, 145.
38. Mueller, R. A., Otten, U. und Thoen, H. (1974) *Mol. Pharm.* **10**, 855.
39. Birnbaum, D. (1969) *Flora (A)* **160**, 361.
40. Köhler, K. H. und Birnbaum, D. (1970) *Biol. Zbl.* **89**, 201.
40. Köhler, K. H. und Birnbaum, D. (1970) *Biol. Zbl.* **89**, 201.
41. Lin, P. P.-C. und Varner, J. E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **276**, 454.
42. Feldman, J. F. und Thayer, J. P. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 977.
43. Murashige, T. und Skoog, F. (1962) *Physiol. Plantarum* **15**, 473.
44. Griffith, T. und Conn, E. E. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1651.
45. Arnow, L. E. (1973) *J. Biol. Chem.* **118**, 531.
46. Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Langemann, H., Waser, P. G. und Hefti, F. (1974) *Biochem. Pharm.* **23**, 2437.
47. Markham, R. (1955) *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 4 (Paech, K. und Tracey, M. V., eds.). Springer Verlag, Berlin.
48. Ewing, E. E. und Cherry, J. H. (1967) *Phytochemistry* **6**, 1319.
49. Cherry, J. H. (1975) *Experimente zur Molekularbiologie der Pflanzen*. Paul Parey.
50. Kakac, B. und Vejdelek, Z. J. (1966) *Handbuch der Kolometrie*, Band III. VEB Gustav Fischer, Jena.