

ÜBER STOFFWECHSELAKTIVITÄT IM LATEX VON *PAPAVER SOMNIFERUM* L.

7. MITTEILUNG ZUR BIOCHEMIE DES MILCHSAFTES¹

L. MEISSNER und K. MOTHES

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Biochemie der Pflanzen,
Halle/Saale, Deutschland

(Received 28 June 1963)

Abstract—Among the numerous latexes which have been examined (e.g. of the genera *Euphorbia*, *Asclepias* and *Papaver*) only a few show metabolic activity. Among these the latex of *Papaver somniferum* L., occupies an exceptional position, for it shows not only endogenous gas exchange, but *in-vitro* incorporation of labelled amino acids into the protein fraction, and, as previously reported, alkaloid synthesis.

ZAHLREICHE Untersuchungen der letzten Jahre, von denen hier der *in vitro*-Einbau markierter Vorstufen in *Hevea brasiliensis*-Kautschuk,²⁻⁶ in *Papaver somniferum*-Alkaloide,^{7,8} die Fraktionierung von *Hevea*-Latexproteinen,⁹⁻¹² der Nachweis der als Coenzyme wirksamen Thiole Glutathion und Cystein (*Hevea*),¹³ die Beschreibung von Zellorganellen und Partikelkomplexen¹⁴⁻¹⁶ bei *Hevea* sowie der Nachweis eines Oligopeptides im Latex von *Euphorbia characias* L.¹⁷ angeführt seien, haben berechtigte Zweifel an einer Zellsaftnatur der Milchsäfte¹⁸ aufkommen lassen.

Während die Milchsäfte einer ganzen Reihe von Asclepiadaceen-, Moraceen-, Papaveraceen-, Compositen- und Euphorbia-Arten neben latexspezifischen Aminosäuren vielfach

¹ 5. Mitteilg.: W. SCHENK, H. R. SCHÜTTE und K. MOTHES, *Flora*, **152**, 590 (1962).

6. Mitteilg.: W. SCHENK und H. R. SCHÜTTE *Flora*, **153**, 426 (1963).

2 R. S. BANDURSKI und H. J. TEAS, *Plant Physiol.* **32**, 643 (1957).

3 B. R. PARK und J. BONNER, *J. Biol. Chem.* **233**, 340 (1958).

4 J. A. GASCOIGNE und P. JONES, *Nature*, **183**, 819 (1959).

5 R. G. O. KEKICK, B. L. ARCHER et al., *Nature*, **184**, 268 (1959).

6 F. LYNN und U. HENNING, *Angew. Chem.* **72**, 820 (1960).

7 G. KLEINSCHMIDT und K. MOTHES, *Z. Naturforsch.* **14b**, 52 (1959).

8 G. KLEINSCHMIDT und K. MOTHES, *Arch. Pharmazie* **293**, 948 (1960).

9 B. L. ARCHER und E. G. COCKBAIN, *Biochem. J.* **61**, 508 (1955).

10 B. L. ARCHER und B. C. SEKHAR, *Biochem. J.* **61**, 503 (1955).

11 B. L. ARCHER, *Biochem. J.* **75**, 236 (1960).

12 C. F. J. MOIR und S. J. TATA, *J. Rubber Res. Inst. Malaya* **16**, 155 (1960).

13 A. J. McMULLEN, *Nature*, **185**, 103 (1960).

14 G. F. J. MOIR, *Nature*, **184**, 1626 (1959).

15 W. A. SOUTHORN, *Nature*, **188**, 165, 475 (1960).

16 W. A. SOUTHORN, *Nature*, **189**, 1000 (1961).

17 CH. MONTANT, *Compt. Rend. Soc. biol.* **150**, 440 (1956).

18 A. SPERLICH, Exkretionsgewebe, in: K. LINNSBAUER (Hrsg.), *Handbuch der Pflanzenanatomie*, Bd. 4, p. 128, Verlag Gebrüder Borntraeger, Berlin (1939).

eine stark voneinander abweichende Zusammensetzung in der Fraktion der freien Aminosäuren aufweisen,¹⁹⁻²⁴ findet man bei *Hevea*²⁵ und *Papaver somniferum*²⁶ komplettete Sätze der proteinogenen Aminosäuren. Diese grossen Unterschiede warnen vor Verallgemeinerungen an einzelnen Objekten erzielter Resultate.

Falls isolierte Milchsäfte auch bezüglich des Eiweissmetabolismus selbständige und stoffwechselaktive Medien sind, könnten sie für Syntheseversuche wesentlich geeigneter Systeme darstellen als pflanzliche Homogenate, bei denen durch den Homogenisierungsprozess und die damit verbundene Vermischung von Protoplasma und Zellsaft trotz Pufferzusatzes viele Strukturen zerstört oder inaktiviert werden.¹⁹

Bei *in vitro*-Versuchen über den im Zusammenhang mit einer Bereitstellung energiereicher Verbindungen interessierenden Gasstoffwechsel und über die Inkorporation markierter Aminosäuren in Latex-Eiweisse erwiesen sich nach bisherigen Untersuchungen eine Anzahl von *Euphorbia*-Milchsäften als wenig aktiv. Demgegenüber zeigte der Latex von *Papaver somniferum* solche Aktivitäten, über die im folgenden berichtet werden soll.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei den hier erwähnten vergleichenden manometrischen Bestimmungen des endogenen Gasstoffwechsels diente vorerst das Latex-Volumen (1 ml) als Bezugsgröße. In dreistündigen Versuchen ergab sich z.B. für *Euphorbia villosa* Waldst. et Kit. ex Willd. eine Aufnahme von maximal 13,6 µl O₂ und eine Freisetzung von maximal 14,0 µl CO₂ pro Stunde und ml Milchsait. Die entsprechenden Werte für *Papaver somniferum*-Latex betrugen – 129 µl O₂ und +346 µl CO₂ pro Stunde (Abb. 1). Der Gasaustausch im *Papaver*-Latex verlief

TABELLE 1. ABHÄNGIGKEIT DER INKORPORATION VON GTP, ATP UND ATP-REGENERIERENDEN SYSTEM

Inkubations- system	Aktivität pro Eiweissfraktion (Imp/min)	Spez. Aktivität (Imp/min/mg Eiweiss)	Inkorporation von (2- ¹⁴ C)-Glycin (mµMole/mg Eiweiss)
Komplett	4634	840	2,71
Ohne GTP, ATP, PK und PEP	4848	869	2,81

Das komplette System enthielt: 0,4 ml KOH-Milchsait (mit 0,1 N KOH auf pH 7,5 eingestellt; 5,6 mg Latex-Eiweiss); 25 µMole Tris-HCl-Puffer, pH 7,5; 5,8 µMole (2-¹⁴C)-Glycin, 1,8 × 10⁶ Imp/min; 0,15 µMole GTP, neutralisiert; 0,5 µMole ATP, neutralisiert; 10 µg PK und 5 µMole PEP in einem Gesamtvolumen von 0,57 ml. Inkubation 180 min bei 37°.

¹⁹ I. LISS, *Flora*, **151**, 351 (1961).

²⁰ I. LISS, *Naturwiss.* **48**, 304 (1961).

²¹ I. LISS, *Phytochemistry*, **1**, 87 (1962).

²² I. LISS, *Biochemische Untersuchungen an Milchsäften*. Dissertation, Halle (1962).

²³ W. SCHENK, *Papierchromatographische Untersuchungen der löslichen Stickstoffverbindungen von Milchsäften verschiedener Pflanzen*. Diplomarbeit, Halle (1959).

²⁴ W. SCHENK und H. R. SCHÜTTE, *Naturwiss.* **48**, 223 (1961).

²⁵ NG TET SOEI, *Proc. Natural Rubb. Res. Conf.*, p. 809, Kuala Lumpur (1961).

²⁶ G. KLEINSCHMIDT, *Planta med.* **8**, 114 (1960).

während der ersten 20 min am intensivsten, nahm dann mit fortschreitendem Steifwerden des Milchsaftes ab. Gleichzeitig sanken die RQ-Werte von 3,1 auf 2,1. Die CO₂-Retention war so gering, dass sie vernachlässigt werden konnte. In wieweit neben möglichen einfachen Decarboxylierungen und Oxydationen eine echte Atmung am gesamten Gasstoffwechselgeschehen beteiligt ist, muss noch untersucht werden. Versuche unter Benutzung der Bezugsgrösse "mg Eiweiss" sowie Vergleiche mit dem Gasstoffwechsel von Blatthomogenaten und Blattscheiben sind im Gange. Wenn im isolierten Milchsaft eine echte Atmung abläuft, wäre durchaus die Möglichkeit der Bereitstellung von ATP für synthetische Prozesse gegeben. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass im *Hevea*-Latex kürzlich neben anderen Mononucleotid-Pyrophosphaten auch ATP nachgewiesen wurde.²⁷

Nach ersten Anhaltspunkten über eine *in vitro*-Aminosäureinkorporation in die Proteine von *Papaver*-Latex überprüften wir zunächst die Abhängigkeit des Systems von einigen Cofaktoren. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, tritt bei Zugabe von GTP, ATP und einem aus Pyruvatkinase (PK) und Phosphoenolpyruvat (PEP) bestehenden ATP-regenerierenden System keine Erhöhung der Inkorporationswerte ein. Dies steht in Übereinstimmung mit der komplexen Zusammensetzung des Milchsaftes und dem oben geschilderten Gasstoffwechsel.

In Untersuchungen über Aminosäure-Inkorporation in die Eiweisse isolierter Tabakchloroplasten²⁸ bzw. isolierter Mitochondrien aus Rattenleber²⁹ wurde festgestellt, dass beim Einsatz grösserer Eiweissmengen im Inkubationssystem ein Absinken der spezifischen

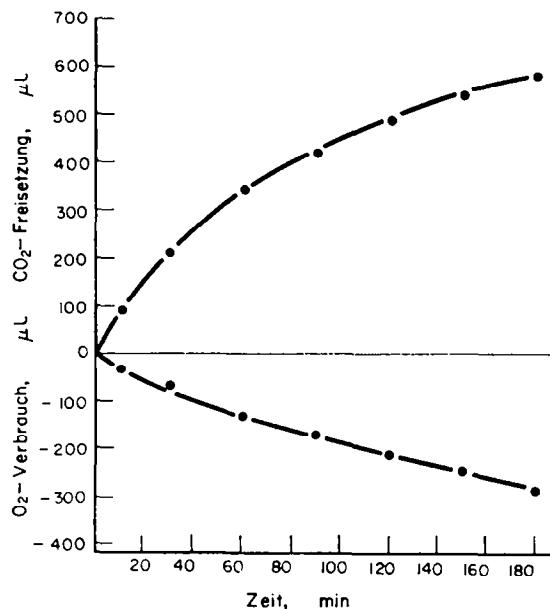


ABB. 1. ENDOGENER GASSTOFFWECHSEL DES ISOLIERTEN *Papaver somniferum* L.-MILCHSAFTES
(IN $\mu\text{l}/\text{ml}$ UNGEPUFFERTEN LATEX, pH 6,0–6,2) BEI 30°.

²⁷ A. J. McMULLEN, *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 341 (1960).

²⁸ M. L. STEPHENSON, K. V. THIMANN und P. C. ZAMECNIK, *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 194 (1956).

²⁹ D. B. RODYN, P. J. REIS und T. S. WORK, *Biochem. J.* **80**, 9 (1961).

Aktivität in den aufgearbeiteten Eiweissfraktionen zu verzeichnen ist. Wie weiterhin aus der Literatur ersichtlich ist, werden bei Mais^{30,31} und bei Erbsen^{32,33} im allgemeinen Mengen zwischen 1 und 3 mg Eiweiss pro 0,5 ml-Ansatz verwendet. Wir haben bei Versuchen zur näheren Charakterisierung unseres Systems geprüft, welche Kombinationen zwischen der zur pH-Einstellung verwendeten Kaliumhydroxyd-Konzentration und der dazu direkt proportionalen Eiweissmenge pro Volumeneinheit KOH-Milchsaft günstige Ergebnisse liefert. Die in Tabelle 2 zusammengestellten Resultate zeigen Übereinstimmung mit den Befunden obengenannter Autoren. Die Verwendung von 0,033 N KOH zur pH-Ein-

TABELLE 2. ABHÄNGIGKEIT DER INKORPORATION VON DER ZUR pH-EINSTELLUNG DES LATEX VERWENDETOEN KOH-KONZENTRATION UND DER DARAUS RESULTIERENDEN EIWEISSMENGE PRO ANSATZ

KOH-Konz. (N)	Eiweissmenge im Ansatz (mg)	Aktivität in der Eiweiss- fraktion (Imp/min)	Spez. Akt. (Imp/min/ mg Eiweiss)	Inkorporation (mμMole/mg Eiweiss)
0,10	4,73	2128	434	1,41
0,05	2,88	2009	697	2,27
0,02	0,86	758	821	2,68

Das System enthielt: 0,4 ml KOH-Milchsaft (mit 0,02 N bis 0,1 N KOH auf pH 7,5 eingestellt; 0,86–4,73 mg Latex-Eiweiss); 25 μMole Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 und 5,8 μMole (2-¹⁴C)-Glycin (= 1,78 × 10⁶ Imp/min) in einem Gesamtvolume von 0,5 ml. Inkubation 120 min bei 37°.

TABELLE 3. INKORPORATION VON MARKIERTEN AMINOSÄUREN IN PAPAVER-LATEXEIWEISS. DARSTELLUNG DES (2-¹⁴C)-GLYCIN-EINBAUES IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT

Aminosäure	Inkubations- zeit (min)	Aktivität i.d. Eiweissfraktion (Imp/min)	Spez. Akt. (Imp/min/ mg Eiweiss)	Inkorporation (mμMole markierte Aminosäure pro mg Eiweiss)
(2- ¹⁴ C)-Glycin	15	105.	64	0,21
	30	203	121	0,39
	60	361	267	0,86
	120	800	483	1,56
(2- ¹⁴ C)-D,L-Valin	120	324	205	0,23
³⁵ S-Methionin	120	2484	1560	0,11

Das System enthielt: 0,4 ml KOH-Milchsaft (mit 0,033 N KOH auf pH 7,5 eingestellt; 1,6–1,7 mg Latex-Eiweiss); 25 μMole Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 und 5,8 μMole (2-¹⁴C)-Glycin (= 1,80 × 10⁶ Imp/min) oder 2,0 μMole (2-¹⁴C)-D,L-Valin (= 1,84 × 10⁶ Imp/min) oder 0,1 μMol ³⁵S-Methionin (= 1,41 × 10⁶ Imp/min). Inkubation 15 bis 120 min bei 37°. Gesamtvolumen: 0,5 ml.

³⁰ R. RABSON und G. D. NOVELLI, *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **46**, 484 (1960).

³¹ R. J. MANS und G. D. NOVELLI, *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 287 (1961).

³² G. C. WEBSTER, *J. Biol. Chem.* **229**, 535 (1957).

³³ J. D. RAACKE, *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 1 (1959).

stellung sowie daraus resultierende Eiweissmengen zwischen 1,5 und 2 mg pro Ansatz dürften auch aus Gründen der Aufarbeitung günstig sein.

Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde in einer weiteren Versuchsserie der Einbau verschiedener Aminosäuren vergleichsweise geprüft und für (2^{-14}C)-Glycin eine Zeitkurve aufgenommen. Aus den Angaben in Tabelle 3 (letzte Spalte) ist ersichtlich, dass (2^{-14}C)-Glycin wesentlich stärker eingebaut wird als (2^{-14}C)-D,L-Valin und ^{35}S -Methionin. Die Inkorporation von (2^{-14}C)-Glycin verläuft über 120 min nahezu geradlinig.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse berechtigen zu der Hoffnung, im *Papaver somniferum*-Milchsaft ein auch für speziellere *in vitro*-Untersuchungen der Aminosäure-Inkorporation geeignetes System verfügbar zu haben. Gleichzeitig lassen die Resultate, zusammen mit dem Nachweis von Nucleinsäuren im *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch.-Milchsaft (unveröffentlichte Versuche), mit der Isolierung und Charakterisierung einer löslichen Ribonucleoprotein-Komponente sowie ribosomalen Partikeln^{34, 35} und einer sowohl hydrolytische als auch synthetische Reaktionen katalysierenden Phosphatase im *Hevea*-Latex,³⁶ eine Eiweissynthese in diesen Latices zumindest prinzipiell möglich erscheinen.

Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse kann unserer Meinung nach der Milchsaft weder mit den sogenannten "vollen Vakuolensaften" noch mit dem Protoplasma einer normalen Zelle unmittelbar verglichen werden. Da in den Milchröhren ein schmaler wandständiger Plasmabelag ohne Zwischenschaltung eines Tonoplasten allmählich in den vorrangig ausfliessenden zentralen Teil übergeht, dürfte Latex im natürlichen und erst recht im isolierten Zustand ein kompliziertes, aus beiden Anteilen zusammengesetztes, System sein. Diesem System dürfte ein je nach Pflanzenart, Entwicklungsgrad und -zustand variierender Teil normaler protoplasmatischer Stoffwechselaktivität verlorengehen.

Die Versuche werden fortgesetzt.

MATERIAL UND METHODEN

Durch Abtrennen unreifer *Papaver somniferum*-Kapseln isolierter Milchsaft wurde im eisgekühlten Gefäß gesammelt und unverzüglich für die Versuche verwendet. Vorbehandelnde Schritte wurden bei +3° ausgeführt. Die Messungen des endogenen Gasstoffwechsels erfolgten auf manometrischem Wege in 1 ml ungepuffertem Latex (pH 6,0–6,2) im Warburg-Apparat nach der "direkten Methode" bei +30° und einer Schüttelfrequenz von 120 Hin- und Hergängen pro Minute.

Für Untersuchungen über die Inkorporation markierter Aminosäuren in die Milchsaft-Eiweissfraktion wurde der Latex in der Kälte unter Rühren mit kalter 0,02 N bis 0,1 N KOH auf pH 7,5 eingestellt ("KOH-Milchsaft"). Die Zusammensetzung der Inkubations-Systeme ist den einzelnen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Als markierte Aminosäuren wurden Handelspräparate mit folgenden spezifischen Aktivitäten verwendet: (2^{-14}C)-Glycin 345 $\mu\text{c}/\text{mMol}$; (2^{-14}C)-D,L-Valin 985 $\mu\text{c}/\text{mMol}$; ^{35}S -Methionin 20 mc/mMol. Weiterhin wurden eingesetzt GTP, Natriumsalz (Uhlein-Chemie, Berlin-Wilmersdorf); ATP, Dinatriumsalz und ein aus Pyruvatkinase (PK) und Phosphoenolpyruvat, Natriumsalz (PEP; Boehringer u. Söhne, Mannheim) bestehendes ATP-regenerierendes System.

³⁴ A. J. McMULLEN, *Biochem. J.* **72**, 545 (1959).

³⁵ A. J. McMULLEN, *Biochem. J.* **85**, 491 (1962).

³⁶ S. L. CHEAH, *J. Rubber Res. Inst. Malaya* **13**, 200 (1951).

Wir inkubierten die Ansätze 0 bis 180 min bei 37° unter mehrfachem Umschütteln. Alle Proben wurden in Parallelen angesetzt. Die Werte sofort in der Kälte abgestoppter Nullproben wurden nach entsprechender Aufarbeitung von den jeweiligen Versuchsproben abgezogen.

Zum Abstoppen verwendeten wir kalte Trichloressigsäure (TES, Endkonzentration 5%). Die Proben blieben dann zur Eiweissfällung über Nacht bei 0° stehen. Die Isolierung der Eiweisse erfolgte nach einem von uns speziell für Milchsäfte modifizierten Aufarbeitungsgang, der nicht nur saubere Eiweissfraktionen liefert, sondern auch signifikante Eiweissverluste ausschliesst. Durch diese nachfolgend geschilderte Extraktions- und Waschprozedur werden u.a. nichtinkorporierte Aktivitäten, säurelösliche Substanzen, Lipide, Kautschuk, Phytosterole, Alkalioide, Nucleinsäuren und Stärke entfernt.

Die TES-Fällungen wurden nacheinander fünfmal mit 5%iger TES, einmal mit Alkohol-Äther (1:2) 20 min bei Zimmertemperatur, je einmal mit Chloroform-Äther (1:1) 20 min bei Zimmertemperatur bzw. 10 min bei 50°, einmal mit Aceton, einmal mit Alkohol-Äther (1:2) 5 min bei 50°, einmal mit 1,67 N Perchlorsäure 20 min bei 70°, dreimal mit 0,2 N und einmal mit 0,02 N Perchlorsäure extrahiert bzw. gewaschen.

Von den anschliessend in 1 N Natronlauge gelösten Eiweissfraktionen wurden jeweils aliquote Teile zur Proteinbestimmung nach Lowry *et al.*³⁷ benutzt bzw. nach Verdünnung mit 1 Volumen aqua dest. zur Aktivitätsbestimmung im Methandurchfluss-Zähler auf Messingschälchen aufgetragen. Da das Auftragen in 0,5 N NaOH gegenüber 85%iger Ameisensäure nur eine geringe Erniedrigung der Zählausbeute zur Folge hatte und die Messungen unter Wahrung des Geometriefaktors³⁸ bei Auszählung gleicher Eiweissmengen in vergleichbaren Serien (0,1 oder 0,3 mg) vorgenommen wurden, erübrigte sich eine Korrektur der Selbstabsorption.

Bei Versuchen mit ³⁵S-Methionin wurden sämtliche Daten unter Berücksichtigung der Halbwertszeit auf den Versuchstag umgerechnet.

³⁷ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH *et al.*, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

³⁸ B. PARTHIER, *Flora*, **151**, 368 (1961).