

DER EINFLUSS DES KINETINS AUF DEN RNS- UND PROTEIN-STOFFWECHSEL IN ABGESCHNITTENEN, MIT HEMMSTOFFEN BEHANDELten TABAKBLÄTTERN

R. WOLLGIEHN und B. PARTHIER

Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften und Institut für Allgemeine Botanik der Universität Halle (Saale), Deutschland (DDR)

(Received 22 August 1963)

Zusammenfassung — 1. Der Einfluß des Kinetins auf den RNS- und Protein-Stoffwechsel abgeschnittener Tabakblätter wurde im Zusammenhang mit der Wirkung der Hemmstoffe des RNS- und Protein-Stoffwechsels Chloramphenicol (CAP) und Thiouracil (TU) untersucht.

2. Kinetin verhindert das durch CAP und TU beschleunigte Vergilben abgeschnittener Blätter und den Abbau von RNS und Protein.

3. Die Hemmstoffe beeinflussen nicht die durch Kinetin verursachte Akkumulation löslicher Stickstoff-Verbindungen.

4. In Kinetin-behandelten Blatthälfte findet eine Netto-Synthese von RNS und Protein auf Kosten der kinetinfreien Hälfte statt. TU unterdrückt diese RNS- und Proteinzunahme, während CAP nur den Proteinanstieg hemmt.

5. Die Incorporation von Adenin- ^{14}C in die RNS und von Methionin- ^{35}S in die Proteine wird durch beide Hemmstoffe herabgesetzt. Kinetin kann die Hemmwirkung des CAP, nicht aber die des TU kompensieren.

6. Die gleichen Wirkungen wurden an allen untersuchten subzellulären Fraktionen beobachtet, die nach Homogenisation aus *in vivo* mit Adenin- ^{14}C und Methionin- ^{35}S markierten Geweben erhalten wurden.

7. Mit einigen anderen Hemmstoffen wurden unterschiedliche Wirkungen erzielt.

Abstract—The effect of kinetin on RNA and protein metabolism in detached tobacco leaves has been investigated in relation to the influence of protein and RNA inhibitors, chloramphenicol (CAP) and thiouracil (TU). CAP and TU accelerate the yellowing of detached leaves and the breakdown of RNA and protein, which can be prevented by kinetin, but these inhibitors do not influence the accumulation of soluble nitrogenous substances caused by kinetin. Kinetin treated tissues show a net synthesis of both RNA and protein which is totally suppressed by TU; CAP inhibits only the increase of the protein content. On the other hand, both CAP and TU inhibit the incorporation of adenine- ^{14}C into RNA, and methionine- ^{35}S into proteins. The inhibitory effect of CAP but not of TU was overcome by kinetin treatment.

After homogenization of the tissues labelled with adenine- ^{14}C and methionine- ^{35}S , similar effects have been observed in all of the investigated subcellular fractions. Other tested inhibitors show different effects in incorporation experiments after kinetin treatment.

EINLEITUNG

Seit der Entdeckung des Kinetins (6-Furfuryl-Aminopurin) sind vielfältige Wirkungen dieser Substanz auf Zellteilung, Entwicklung und Stoffwechsel beschrieben worden.¹⁻³ Über Ort und Mechanismus des primären Angriffs bestehen noch keine klaren Vorstellungen. Unser Laboratorium hat sich besonders mit physiologischen Wirkungen des Kinetins und deren Zusammenhang mit dem RNS- und Protein-Stoffwechsel beschäftigt.

¹ B. PARTHIER, *Pharmazie*, **15**, 696 (1960).

² C. O. MILLER, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12**, 395 (1961).

³ K. MÖTHES, in *Comprehensive Biochemistry* **11**, 195 (1963).

Es darf als gesichert gelten, daß der für isolierte Blätter charakteristische "Altersstoffwechsel" (RNS- und Protein-Abbau) durch Kinetin aufgehalten oder sogar im Sinne einer Förderung von RNS- und Protein-Synthese umgeprägt werden kann.⁴⁻¹⁰

Andererseits bewirkt Kinetin an isolierten Blättern eine Akkumulation löslicher Bausteine von RNS und Protein. Wo Kinetin ist, bildet sich durch Förderung des aktiven Transportes und vielleicht durch Steigerung der Retention ein Attraktionszentrum aus, das auf Kosten benachteiligter Blattbezirke oder Organe wirksam ist.^{5, 7, 11-14} Es ist noch nicht genügend geklärt, ob diese Akkumulation Ursache der gesteigerten Syntheseprozesse ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, mit Hilfe von Inhibitoren des RNS- und Proteinstoffwechsels diese Frage zu verfolgen. Bekannt ist, daß der durch Chloramphenicol beschleunigte Eiweißschwund durch Kinetin aufgehoben wird,^{11, 12, 15} und daß Chloramphenicol auch in Aufnahme- und Akkumulations-Prozesse hemmend eingreifen kann.¹⁶

ERGEBNISSE

Wir isolierten mittlere Blätter von *Nicotiana rustica*-Pflanzen und führten ihnen über die Blattstiele Lösungen von Chloramphenicol (CAP) oder Thioracil (TU) und als Kontrolle Wasser (W) zu. Nach dem Aufsaugen der Lösungen (6-8 hr) wurde die eine Blatthälfte mit

TABELLE 1. EINFLÜSSE DES KINETINS AUF DIE PROZENTUALE VERTEILUNG DES GESAMT-N IN BLÄTTERN, DIE MIT WASSER ODER HEMMSTOFFEN BEHANDELT WURDEN. HEMMSTOFFE ÜBER DIE BLATTSTIELE GEgeben, HALBSEITIG MIT KINETIN BESPRÜHT. ANALYSE NACH 4 TAGEN

	% des Gesamt-N des ganzen Blattes
Fr Ko	45
Fr Ko	45
Stiele	10
W-W	36
W-K	55
Stiele	9
CAP-W	29
CAP-K	61
Stiele	10
TU-W	22
TU-K	65
Stiele	13

⁴ A. E. RICHMOND and A. LANG, *Science* 125, 650 (1957).

⁵ K. MOTHES, L. ENGELBRECHT und O. KULAEVA, *Flora* 147, 445 (1959).

⁶ K. V. THIMANN and M. M. LALORAYA, *Plant Physiol.* 13, 165 (1960).

⁷ B. PARTHIER, *Flora* 151, 518 (1961).

⁸ R. WOLLGIEHN, *Flora* 151, 411 (1961).

⁹ D. OSBORNE, *Plant Physiol.* 37, 595 (1962).

¹⁰ M. SUGIURA, K. UMEMURA and Y. OOTA, *Physiol. Plantarum* 15, 457 (1962).

¹¹ K. MOTHES, *Naturwiss.* 47, 337 (1960).

¹² K. MOTHES, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 74, 24 (1961).

¹³ K. MOTHES, L. ENGELBRECHT und H. R. SCHÜTTE, *Physiol. Plantarum* 14, 72 (1960).

¹⁴ L. ENGELBRECHT, *Flora* 150, 73 (1961).

¹⁵ O. N. KULAEVA und I. P. WOROBIEVA, *Fisiol. Rast.* 9, 106 (1962).

¹⁶ B. JACOBY and J. F. SUTCLIFFE, *J. Exp. Bot.* 13, 335 (1962).

Kinetin (K), die andere mit Wasser (W) besprüht. Das ergibt 6 Versuchsvarianten (W-W, W-K, CAP-W, CAP-K, TU-W und TU-K) und die Frischkontrolle (Fr Ko).

Nach 4 Tagen Exposition in feuchten Kammern bei diffusem Tageslicht waren bereits äußerlich Unterschiede zwischen den verschieden behandelten Blatthälften zu erkennen. Die nur mit Hemmstoffen behandelten Hälften waren stärker vergilbt als die W-W-Hälften, während alle mit Kinetin besprühten Gewebe grün geblieben waren. Doch tritt auch in den Kinetin-Hälften keine Chlorophyllzunahme ein (Tab. 2). Das hat in erster Linie seine Ursache in den Mangelbedingungen, unter denen das isolierte Blatt lebt.

In allen Fällen wird der Gesamt-N der Kinetinhälften auf Kosten der kinetinfreien Hälften bedeutend vermehrt (Tab. 1). Diesem Vorgang liegt ein Stofftransport zu den mit Kinetin besprühten Hälften zugrunde.^{11,13,14} Es ist deutlich zu erkennen, daß in Gegenwart von Kinetin dieser Transport weder durch Chloramphenicol noch durch Thiouracil gehemmt wird. Der Transport in die Kinetinhälften ist wesentlich bestimmt durch die Höhe des Eiweißabbaues in den Wasserhälften oder in den mit Hemmstoffen behandelten Hälften (Tab. 2, Protein).

TABELLE 2. EINFLUß DES KINETINS AUF DEN RNS-, PROTEIN-, CHLOROPHYLL-UND LÖSLICHEN N-GEHALT ABGESCHNITTENER, MIT WASSER ODER HEMMSTOFFEN BEHANDELTER BLÄTTER

	RNS	Protein (% zur FrKo)	Chlorophyll	Löslicher N (% des Protein-Ns der FrKo)
FrKo	100	100	100	80
W-W	67	64	80	75
W-K	130	122	95	112
CAP-W	42	44	47	73
CAP-K	123	92	87	139
TU-W	28	36	54	60
TU-K	95	96	90	156

Der Zufluss an Stickstoff entspricht in keiner Weise die Synthese am Kinetinort. Kinetin verhindert wohl den Schwund an Protein auch in Gegenwart von Chloramphenicol oder Thiouracil (Tab. 2), es steigert aber unter den gewählten Bedingungen den Proteingehalt nicht. Der zuströmende Stickstoff führt also in Gegenwart von Hemmstoffen in erster Linie zur Akkumulation von löslichen Stickstoffverbindungen. Diese Akkumulation wird nicht von einer entsprechenden Proteinzunahme begleitet.

Die Veränderungen des RNS-Gehaltes in den kinetinfreien Hälften entsprechen etwa denen des Protein-Gehaltes. In den Kinetin-Hälften ergeben sich aber Unterschiede. Kinetin hebt die Chloramphenicol-Hemmung weitgehend auf und führt sogar zu einer RNS-Vermehrung.

Da diese Bilanzmessungen noch keinen Einblick in das Verhältnis von Synthese zu Abbau vermittelten, versuchten wir, durch Experimente zur Incorporation von radioaktiv markierten Vorstufen der RNS und des Proteins einen Maßstab für die Synthesegeschwindigkeit zu erhalten. In diesem Versuchen wurden die Blätter nach Hemmstoffgabe über die Stiele entlang der Mittelrippe auseinandergeschnitten, die Hälften mit Kinetin oder Wasser besprüht und wie oben beschrieben in feuchten Kammern exponiert. Nach 4 Tagen wurden Blattscheiben entnommen und mit den radioaktiven Lösungen infiltriert (vergl.^{7,8}).

In Tab. 3 sind die Ergebnisse von Versuchen über die Incorporation von Adenin- ^{14}C in die Gesamt-RNS und Methionin- ^{35}S in die Gesamt-Proteine dargestellt. Der Einbau in die mit Hemmstoffen behandelten Blattgewebe ist in allen Fällen gegenüber den Kontrollen gehemmt, im Vergleich zur FrKo um etwa 50%. Die durch CAP verursachte Hemmung wird durch Besprühen mit Kinetin nicht nur aufgehoben, sondern der Einbau ist gegenüber der FrKo gefördert und liegt in der gleichen Größenordnung wie der Einbau in W-K behandeltem Gewebe. Daraus kann auf einen Antagonismus zwischen Chloramphenicol- und Kinetinwirkung in abgeschnittenen Tabakblättern geschlossen werden.

TABELLE 3. EINFLUß DES KINETINS AUF DIE INCORPORATION VON ADENIN- ^{14}C IN DIE RNS UND METHIONIN- ^{35}S IN DIE PROTEINE VON BLATTSCHREIBEN AUS ABGESCHNITTENEN, MIT WASSER ODER HEMMSTOFFEN BEHANDELTEN BLÄTTERN

	RNS Spez. Akt.	Protein (% zur FrKo)
FrKo	100	100
W-W	80	86
W-K	123	126
CAP-W	58	53
CAP-K	115	111
TU-W	55	40
TU-K	51	44

TABELLE 4. EINFLUß DES KINETINS AUF DIE INCORPORATION VON ADENIN- ^{14}C IN DIE RNS VERSCHIEDENER SUBZELLULÄRER FRAKTIONEN AUS ISOLIERTEN BLÄTTERN, DIE MIT WASSER ODER HEMMSTOFFEN BEHANDELT WURDEN

	Chloroplasten- Fraktion	Mitochondrien- Fraktion	Ribosomen- Fraktion	Lösliche Fraktion
	Spez. Akt. der RNS (Imp./min $\times 10^2/\text{mg}$ RNS)			
FrKo	69	83	35	48
W-W	62	71	31	44
W-K	90	95	45	61
CAP-W	44	63	18	32
CAP-K	81	84	42	56
TU-W	28	36	17	31
TU-K	29	40	19	33

Ein völlig anderes Bild erhalten wir nach Thiomuracilbehandlung. Hier vermag Kinetin die starke Hemmung des Adenin- und Methionin-Einbaues nicht aufzuheben, obwohl sich die Blätter äußerlich nicht von den CAP-behandelten unterscheiden.

In weiteren Versuchen war zu prüfen, ob Kinetin auf bestimmte RNS- und Proteinfraktionen der Zelle bevorzugt wirkt,¹⁰ oder ob die Synthesen in allen subzellulären Strukturen gleichartig beeinflußt werden. Wir fraktionierten deshalb Blatthomogenate durch Zentrifugation, nachdem die intakten Blattgewebe mit Adenin- ^{14}C und Methionin- ^{35}S gefüllt worden waren und bestimmten die spez. Aktivitäten der RNS und Proteine in den einzelnen subzellulären Fraktionen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt.

Die spez. Aktivitäten der untersuchten RNS- und Protein-Fraktionen unterschieden sich zwar deutlich voneinander, ihre Beeinflussung durch Kinetin und Hemmstoffe ist jedoch in allen Fraktionen sehr ähnlich, so daß sich innerhalb der einzelnen Fraktionen aus kinetin- und hemmstoffbehandelten Blattgeweben die gleichen Wirkbilder ergeben, wie wir sie für Gesamt-RNS und Gesamt-Protein schon beschrieben haben (Tab. 3): Förderung der Incorporation durch Kinetin, Aufhebung der CAP-Hemmung in kinetinbehandelten Geweben, keine Wirkung des Kinetins auf die durch TU verursachte Hemmung der Incorporation.

TABELLE 5. EINFLUß DES KINETINS AUF DIE INCORPORATION VON METHIONIN-³⁵S IN DIE PROTEINE VERSCHIEDENER SUBZELLULÄRER FRAKTIONEN AUS ISOLIERTEN BLÄTTERN, DIE MIT WASSER ODER HEMMSTOFFEN BEHANDELT WURDEN

	Chloroplasten-Fraktion Spez. Akt. der Proteine (Imp./min × 10 ² /mg Protein)	Mitochondrien-Fraktion Spez. Akt. der Proteine (Imp./min × 10 ² /mg Protein)	Ribosomen-Fraktion Spez. Akt. der Proteine (Imp./min × 10 ² /mg Protein)	Lösliche Fraktion Spez. Akt. der Proteine (Imp./min × 10 ² /mg Protein)
FrKo	27	62	16	18
W-W	22	35	11	16
W-K	33	72	21	26
CAP-W	8	18	8	9
CAP-K	25	61	16	21
TU-W	7	18	9	11
TU-K	7	15	8	11

TABELLE 6. EINFLUß DES KINETINS AUF DIE INCORPORATION VON METHIONIN-³⁵S IN DIE PROTEINE DER MITOCHONDRIEN-FRAKTION AUS BLÄTTERN, DIE MIT VERSCHIEDENEN HEMMSTOFFEN BEHANDELT WURDEN. Zahlenangaben: Spez. Akt. der Proteine in % der W-W-Kontrolle.

	1. Mit Wasser besprüht	2. Mit Kinetin besprüht
Kontrolle (Wasser)	100	170
Chloramphenicol	43	142
Thiouracil	49	45
8-Azaadenin	43	73
8-Azaguanin	55	86
Isobarbitursäure	100	165
5-Methyltryptophan	100	168
Streptomycin	100	168
2,4-Dinitrophenol	68	109

Die Stärke der Hemmung der Incorporation ist von der Konzentration der Hemmstoffe abhängig. Der Wirkungsgrad der Hemmstoffe wird in hohem Maße durch die "Vitalität" des Blattes bestimmt. Darunter ist ein Komplex von Faktoren zu verstehen, in dem der Ernährungszustand und das Organalter eine besondere Rolle spielen. Wir verwendeten in den vorliegenden Versuchen im allgemeinen 0,4 mg Hemmstoff in 2 ml pro Blatt. Aber entscheidend ist natürlich, wieviel vom Hemmstoff tatsächlich an den Wirkungsort in der Blattzelle gelangt. Wir benutzten deshalb empirisch solche Konzentrationen, die nach 4 Tagen deutliche Vergilbungerscheinungen in den kinetinfreien Blatthälften hervorriefen,

sonst aber keine anderen Schädigungen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen auftraten.

Für das Verhältnis des Kinetins zum Thiouracil ist übrigens bemerkenswert, daß die Thiouracil-Hemmung auch dann nicht beeinflußt wird, wenn Kinetin 24 Std. vor der Thiouracil-Gabe appliziert wird.

Vorläufige Ergebnisse über die Wirkung des Kinetins auf den durch eine Reihe anderer Hemmstoffe beeinflußten Methionin-Einbau sind in Tab. 6 dargestellt; als Beispiel wurde die spez. Aktivität der Proteine der Mitochondrienfraktion gewählt. Die übrigen subzellulären Fraktionen zeigen ein analoges Bild. Der ausgeprägte Antagonismus ist nur bei CAP-Blättern zu beobachten. Die Hemmung der Incorporation durch die Purin-Antagonisten 8-Azaadenin und 8-Azaguanin kann durch Kinetin etwas gemildert werden, jedoch wesentlich weniger als im Falle des CAP. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 2,4-Dinitrophenol erzielt. In diesem Zusammenhang sind Befunde von Moewus¹⁷ von Interesse, wonach bei Polytoma uvella die durch Kinetin induzierte erhöhte Mitosezahl mit 8-Azaguanin wieder herabgesetzt werden kann. Eine dritte Gruppe von Hemmstoffen—Streptomycin, 5-Methyltryptophan und der Pyrimidin-Antagonist Isobarbitursäure—zeigten keine Hemmwirkung auf die RNS- und Eiweiß-Synthese in Tabakblättern.

DISKUSSION

Kinetinwirkung bei Abwesenheit von Hemmstoffen

Alle hier mitgeteilten Ergebnisse ordnen sich in frühere Feststellungen unseres Laboratoriums wie auch anderer Autoren ein: Wenn wir unter "Altern" eines isolierten Blattes oder eines isolierten Blatteiles den steten Abfall von Chlorophyll-, RNS- und Proteingehalt verstehen, dann vermag Kinetin diesen Vorgang aufzuhalten, auch ohne daß von außen N-haltige Baustoffe zugeführt werden. Darüber hinaus bewirkt Kinetin eine Akkumulation von Bausteinen für den gesamten Protein-Stoffwechsel, sofern eine Quelle für solche Bausteine zur Verfügung steht. Diese ist am einfachsten gegeben, wenn die beiden Hälften eines Blattes verschieden behandelt werden: die eine wird nur mit Wasser besprüht, sie altert, baut ab und gibt Spaltprodukte an die andere mit Kinetinlösung besprühte ab. Jedoch zeigen auch solche Blatteile, denen durch Isolation die Zufuhr von löslichen Bausteinen versperrt ist, eine verstärkte Incorporation radioaktiv markierter Bausteine. Man könnte geneigt sein zu sagen, daß Kinetin nicht nur den Abbau von RNS und Protein hemmt, sondern den Metabolismus der RNS und der Proteine sogar allgemein erhöht.

Die Incorporation ist von der Akkumulation unabhängig. Die Verbesserung der Bilanz, die Steigerung der Nettozunahme bedarf jedoch der Bausteinzufluhr, der Akkumulation.

Hemmstoffwirkung allgemein

Die geprüften Hemmstoffe des RNS- und Protein-Stoffwechsels sind in grünen Tabakblättern verschieden effektiv (Tab. 6, mit Wasser besprüht). Die einen senken die Incorporation bedeutend im Vergleich zur Wasserkontrolle, die anderen jedoch nicht. Vielleicht kommen solche Stoffe wie Isobarbitursäure, 5-Methyltryptophan und Streptomycin deshalb nicht zu wesentlicher Wirkung, weil sie im Blatt selbst verändert werden. Die Kinetinwirkung ist gegenüber solchen Hemmstoffeffekten unterschiedlich. In einzelnen Fällen (8-Azaguanin, 8-Azaadenin) kann die Hemmstoffwirkung nur zum Teil aufgehoben werden, in anderen aber vollständig (Chloramphenicol).

¹⁷ F. MOEWUS, *Science* 130, 921 (1959).

Kinetin und Chloramphenicol

Obwohl eine umfangreiche Literatur über Chloramphenicolwirkungen vorliegt, gibt es noch keine einheitliche Erklärung für den Wirkungsmechanismus. Einige Arbeiten¹⁸⁻²⁰ sprechen dafür, daß Chloramphenicol die Aminosäureübertragung mit Hilfe der sRNS an die Ribosomen blockiert. Die RNS-Synthese läuft weiter, wobei die Möglichkeit besteht, daß durch Einfluß von Chloramphenicol eine andere, von der normalen zu unterscheidende RNS entsteht.¹⁸ Es ist jedoch die Frage, ob dieser Hemmstoff an Blattgeweben die gleiche Wirkung ausübt. Vielleicht greift er in ganz verschiedene Bereiche des Stoffwechsels ein.

Chloramphenicol hemmt in abgeschnittenen Blättern in gleicher Weise die Incorporation von Adenin in RNS und Methionin in die Proteine (Tab. 3). Im Bereich des RNS-Metabolismus kann Kinetin als ein ziemlich vollkommener Antagonist des Chloramphenicols gelten. Die Hemmung der Akkumulation, der Nettozunahme und der Incorporation kann durch Kinetin weitgehend aufgehoben werden (Tabn. 1, 2 und 3).

Im Bereiche des Protein-Stoffwechsels jedoch sind unsere Befunde nicht einheitlich. Hier hebt Kinetin die Hemmung der Akkumulation und der Incorporation, nicht aber der Netto-Synthese auf. Dieses Ergebnis ist durch Wiederholungsversuche auch mit anderen Aminosäuren bestätigt, aber zunächst nicht befriedigend zu erklären. Es ist fraglich, ob unsere langfristigen Bilanzversuche zur Messung der Nettosynthese mit den kurzfristigen Incorporations-Versuchen direkt vergleichbar sind.

Mit der Untersuchung der RNS- und Proteinsynthese in verschiedenen subzellulären Strukturen hofften wir, einen Hinweis auf den Angriffspunkt von Chloramphenicol und Kinetin in den Blattzellen zu erhalten. Sowohl Chloramphenicol als auch Thiouracil zeigten jedoch keine prinzipiell unterschiedliche Wirkung auf die Incorporation von Adenin in die RNS und Methionin in die Proteine verschiedener subzellulärer Strukturen (Tabn. 4 und 5). In diesen Versuchen ist charakteristisch, daß bei grünen Blattgeweben die höchste Incorporation in RNS und Protein nicht bei der Ribosomen-Fraktion erzielt wird, sondern bei den Mitochondrien- und Chloroplasten-Faktionen. Darüber haben wir vor kurzem in anderem Zusammenhang berichtet.^{21, 22}

Kinetin und Thiouracil

Thiouracil als Antagonist des Uracils hemmt die RNS-Synthese. In isolierten Blättern mindert es den Gehalt an Chlorophyll, RNS und Protein. Dieser Abbau kann durch Kinetin praktisch vollständig verhindert werden (Tab. 2). Äußerlich unterscheiden sich die TU-K-Blatthälften nicht von den CAP-K- und den W-K-Hälften. Kinetin vermag jedoch in keiner Weise die starke, durch Thiouracil verursachte Hemmung der Incorporation zu beeinflussen (Tabn. 3, 4 und 5). Trotzdem findet in TU-K-Blatteilen eine bedeutende Akkumulation statt: Der lösliche Stickstoff steigt auf Kosten der TU-W-Blatthälften stark an. Das spricht dafür, daß die Akkumulation selbst nicht an eine RNS- oder Proteinsynthese gebunden ist. Die Trennung von Akkumulation und RNS- sowie Proteinsynthese durch Thiouracil-Kinetin scheint uns neue Möglichkeiten zur Beurteilung der Kinetinwirkung zu geben. Wir neigen zur Vermutung, daß eine der Akkumulation entsprechende Erhöhung der Retention bei allen Kinetinwirkungen an isolierten Blättern im Spiele sein kann.

Auch könnte die Tatsache, daß Kinetin die Hemmung z.B. der Methionin-Incorporation

¹⁸ J. D. BROCK, *Bacteriol. Review*, **25**, 32 (1961).

¹⁹ R. RENDI and S. OCHOA, *J. Biol. Chem.* **237**, 3711 (1962).

²⁰ D. NATHANS, G. NOTAMU, J. H. SCHWARTZ and N.D. ZINDER, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **49**, 1428 (1962).

²¹ B. PARTHIER, *Biochem. Biophys. Acta* **72**, 503 (1963).

²² B. Parthier und R. WOLLGIEHN, *Naturwiss.* **50**, 598 (1963).

in die Proteine durch 2,4-Dinitrophenol teilweise aufhebt (Tab. 6), auf einen allgemeineren Angriffspunkt des Wirkstoffes hinweisen.

METHODIK

Material und Versuchsdurchführung

Nicotiana rustica-Pflanzen wurden im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen herangezogen. Blätter aus der mittleren Region wurden abgetrennt und mit den Stielen in Lösungen von Hemmstoffen (0,4 mg in 2 ml pro Blatt) gestellt, die mit dem Transpirationsstrom in die Blätter gelangten. Zur besseren Verteilung der Hemmstoffe im Gewebe wurden in den nächsten Stunden noch etwa 3 ml Wasser gegeben. Anschließend wurden die Blätter halbseitig mit einer wässrigen Kinetin-Lösung ($1,5 \times 10^{-4}$ m) oder mit aque dest. besprüht und in feuchten Kammern gelagert. Davon abweichende Einzelheiten sind bei den betreffenden Versuchen beschrieben. Für die Incorporationsversuche wurden nach 4 Tagen aus jeder Blatthälftengruppe etwa 40 Scheiben von 1,4 cm Durchmesser isoliert, abgewaschen, abgetrocknet, mit Lösungen von Adenin-8-¹⁴C (2 μ c/ml), Methionin-³⁵S (12 μ c/ml) oder Glycin-1-¹⁴C (5 μ c/ml) vakuumfiltriert und 2–4 hr in Dunkelheit bei hoher Luftfeuchtigkeit exponiert.

Zellfraktionierung

Die Blattscheiben wurden mehrfach gewaschen, mit einem eiskalten 0,8 M NaCl- oder Saccharose-Phosphatpuffer pH 7,5 (1:1) im Bühler-Homogenisator zerkleinert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Mull filtriert und der üblichen differenzierten Zentrifugation unterworfen. Dabei erhielten wir Fraktionen, die nach dem Grad der Anreicherung folgendermaßen bezeichnet werden: (a) 1000 g, 8 min: Chloroplastenfraktion. (b) 20 000 g, 20 min: Mitochondrienfraktion. (c) 120 000 g, 60 min: Ribosomen-Fraktion. (d) Überstand: Lösliche Fraktion. Die Aufarbeitung erfolgte bei 4°.

Analysen

RNS wurde nach Aethanol-Fällung und Entfernung der Alkohol-Äther-löslichen und der säurelöslichen Substanzen mit 0,5 N KOH 1 Std. bei 37° extrahiert und spektrophotometrisch bei 260 m μ bestimmt. Die Proteine wurden in der Kälte mit Säure gefällt und nach Extraktion der säurelöslichen, der Alkohol-Äther-löslichen Bestandteile und der Nucleinsäuren nach Lowry *et al.*²³ bestimmt. In aliquoten Teilen wurde die Radioaktivität am Methanzählrohr gemessen. Daraus wurden die spezifischen Aktivitäten berechnet (Imp./min/mg RNS bzw. Protein). Die Chlorophyllbestimmung erfolgte im Acetonextrakt nach Arnon.²⁴ Eine ausführliche Darstellung der Methodik erfolgt an anderer Stelle.²⁵

Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen.

Anerkennung—Wir danken Herrn Prof. Dr. K. Mothes für die Förderung und vielseitige Unterstützung dieser Arbeit.

²³ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. I. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

²⁴ D. I. ARNON, *Plant Physiology* **24**, 1 (1949).

²⁵ R. Wollgiehn und B. Parthier, *Flora* (im Druck).