

Regulation der Chlorophyllbiosynthese

Licht- und entwicklungsbedingte Aktivitätsänderungen von vier aufeinander folgenden Enzymen der Porphyrin- und Chlorophyllbiosynthesekette

Regulation of Chlorophyll Biosynthesis

Changes in Activity of Four Consecutive Enzymes in the Porphyrin and Chlorophyll Biosynthesis Chain during Development and Illumination

HANSJÖRG A. W. SCHNEIDER

Botanisches Institut der Universität zu Köln

(Z. Naturforsch. 28 c, 45–58 [1973]; eingegangen am 21. August/2. Oktober 1972)

Chlorophyllsynthese, δ -aminolevulinate synthetase, δ -aminolevulinate dehydratase, porphobilinogenase, succinyl-CoA-synthetase

The activities of enzymes related with chlorophyll and porphyrin synthesis have been examined during development and greening of young corn leaves. The enzymes succinyl-CoA-synthetase (SCoAS), δ -amino-levulinate synthetase (ALAS), δ -amino-levulinate dehydratase (ALAD) and the enzymes involved in porphobilinogenase (PBGA) were under investigation.

When leaves are illuminated and chlorophyll synthesis begins the activity of ALAD is not influenced. The activity of PBGA and SCoAS are slightly higher than in darkness, but the changes are below the range affecting chlorophyll biosynthesis. ALA, however, is only synthesized in the light. Synthesis ceases immediately when illumination is stopped, indicating that in darkness ALAS is not active. On the other hand ALAS is active in dark grown roots, tubers and other non-leaf tissues.

Feeding the plant with succinate, glycine or α -keto-glutarate has no effect on chlorophyll synthesis, but the amount of ALA is reduced, whereas sucrose promotes its accumulation. The results are discussed with completely antithetical results obtained with tissue cultures of tobacco and are integrated into a scheme which excludes the contrariety of hypotheses deduced from experiments with inhibitors of protein and nucleic acid synthesis. It is suggested that the varying results are caused by the action of light on different stages in differentiation of plastids and cells.

In contrast to the enzymes SCoAS, ALAD and PBGA whose activities were determined *in vitro*, ALAS was assayed *in vivo* by means of the accumulation of δ -amino-levulinate (ALA) after blocking the enzyme ALAD by levulinate (LA). Optimum accumulation is observed when the concentration is about $2 \cdot 10^{-2}$ M. LA is not converted to ALA in appreciable amounts. This could be proved by feeding the plants with ^{14}C -LA which was prepared from uniformly labeled ^{14}C -fructose.

Einleitung

Im Laufe der Evolution sind in der Chlorophyllbiosynthesekette Blockierungen aufgetreten, die nur noch durch die Mitwirkung von Licht überwunden werden können¹. Abgesehen von der Photoreduktion des Protochlorophyllids^{2,3} am Ende der Synthesekette werden die übrigen Blockierungen durch einen Mechanismus überwunden, der die Neusynthese von Nukleinsäuren und Proteinen einschließt¹. Bei der Frage, wel-

che Proteine nur unter dem Einfluß des Lichtes gebildet werden, gehen die Meinungen auseinander. In der Literatur werden vor allem zwei Hypothesen diskutiert. Daneben existieren Regulationsmechanismen, die weniger direkt vom Licht beeinflußt werden.

Eine der Hypothesen postuliert, daß die Chlorophyllbiosynthese mit der Synthese des ersten spezifischen Enzyms dieser Biosynthesekette, ALAS, gestartet wird, das im Gegensatz zu allen übrigen Enzymen dieser Kette im Dunkeln nicht vorhanden ist. Diese Hypothese geht auf Versuche von GRANICK^{4,5} zurück, der ALA fütterte und feststellte, daß so behandelte Pflanzen weit mehr Protochlorophyllid anreicherten

Sonderdruckanforderungen an HANSJÖRG A. W. SCHNEIDER, Botanisches Institut der Universität zu Köln, D-5000 Köln 41, Gyrhofstr. 15, Deutschland.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

als nicht behandelte Kontrollen. Diese Versuche wurden durch GASSMANN und BOGORAD^{6, 7} und andere Autoren⁸⁻¹⁰ durch die Anwendung von Hemmstoffen der Protein- und Nukleinsäure-Synthese erweitert. In Pflanzen, die mit diesen Stoffen behandelt waren, ist die Chlorophyllsynthese auch im Licht gehemmt. Inkubation mit ALA vermag wiederum die Hemmung zu überwinden.

KIRK u. ALLEN¹¹ und KIRK¹², die ebenfalls mit Hemmstoffen der Protein- und Nukleinsäuresynthese arbeiteten und ihre Versuche mit *Euglena* durchführten, kommen zu einem völlig anderen Schluß. Nicht ALAS ist der limitierende Faktor, oder wenigstens nicht ausschließlich, sondern ein Protein, das sich am Ende der Biosynthesekette in stöchiometrischen Mengen mit Chlorophyll verbindet. Es soll sich dabei um Thylakoidprotein oder den Proteinanteil von Protochlorophyllidholochrom handeln. Selbst schon ergrünte, mit Actidion gehemmte Euglenen vermögen bei ALA-Fütterung kein Chlorophyll mehr zu bilden.

Den Arbeiten einer Reihe weiterer Autoren ist zu entnehmen, daß Chlorophyllsynthese nur bei gleichzeitiger allgemeiner Proteinneusynthese^{8, 13-16} möglich ist und daß Phytochrom bei der Induktion der Chlorophyllsynthese eine große Rolle spielt¹⁷⁻²².

Nach eigenen, direkten Aktivitätsmessungen von Enzymen der Chlorophyllbiosynthese in ergrünenden Zellkulturen von Tabak²³⁻²⁵ könnte diesen Hypothesen eine weitere hinzugefügt werden, die besagt, daß weder einem Protein am Anfang noch am Ende der Chlorophyllbiosynthesekette allein eine entscheidende Rolle zukomme, sondern daß die ungenügende Aktivität der gesamten Kette bei der Chlorophyllbiosynthese limitierend ist. So wurde gefunden, daß ALAS in dunkel wachsenden Zellen aktiv ist, aber trotzdem kein Protochlorophyllid gebildet wird, daß die Aktivität von ALAS und die der nachfolgenden Enzyme ALAD und PBGA (die Aueinanderfolge der Enzyme und ihrer Produkte ist in Abb. 1 schematisch dargestellt) im Licht ansteigt und die Menge an Chlorophyll eng mit der Enzymaktivität korreliert ist.

Die Vielschichtigkeit des Problems der Induktion und der Steuerung der Chlorophyllbiosynthese wird noch deutlicher, wenn man Regelmechanismen, wie sie bei dem photosynthetisch tätigen Bakterium *Rhodospseudomonas spheroides* gefunden wurden²⁶⁻³², in die Betrachtungen einbezieht, oder die Vielzahl anderer Endprodukte des Porphyrinstoffwechsels (Abb. 1), die ebenfalls einer Regulation unterliegen müssen.

In *Rhodospseudomonas* repräsentiert Häm als Core-

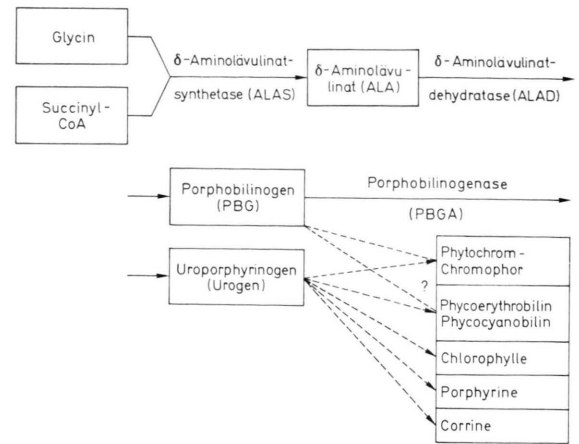


Abb. 1. Schema des Porphyrinsynthesewegs mit seinen Verzweigungen. Die unmittelbaren Vorstufen der offenkettigen Tetrapyrrole Phytochrom-Chromophor, Phycoerythrobilin und Phycocyanobilin sind nicht bekannt.

pressor die Neusynthese von ALAS und hemmt das Enzym selbst allosterisch²⁶⁻²⁹. Man kann sich vorstellen, daß bei Belichtung durch einsetzende Chlorophyllsynthese Porphyrine abgezogen werden und die Konzentration von Häm unter die hemmende Menge absinkt. Möglicherweise liegen ähnliche Steuermechanismen auch in höheren Pflanzen vor. Hinzu kommt bei *Rhodospseudomonas* ein nicht völlig verstandener Regelmechanismus, der von Sauerstoff abhängig ist³⁰⁻³².

Eine gewisse Steuerung ähnlicher Stoffwechsel erreicht die Zelle durch Trennung in verschiedene Reaktionsräume, beim Porphyrinstoffwechsel durch die Verlagerung der gesamten Chlorophyllbiosynthesekette in die Plastiden³³⁻³⁶. Die Chlorophyllbiosynthesekette ist damit untrennbar mit allen ihren Gliedern von der Ausbildung derselben abhängig. Schon in Proplastiden sind die ersten Glieder nachweisbar³⁶, unbestimmt ist allein noch die Lokalisation von ALAS³⁷⁻³⁹, da in den Plastiden noch kein Succinat aktivierendes System gefunden wurde.

Die vorliegende Arbeit verfolgt nun zwei Ziele: 1. Durch direkte Bestimmung von Enzymaktivitäten in der Chlorophyllbiosynthesekette während der Entwicklung und der Ergrünungsphase sollten neue Informationen zum Problem der Induktion und Regulation der Chlorophyllbiosynthesekette gewonnen werden und 2. sollten die bisherigen, so unbefriedigend heterogenen Daten und Beobachtungen so geordnet werden, daß Beziehungen und Abhängigkeiten sichtbar werden und die neuen Informationen zwanglos eingefügt werden können.

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten, wie sie dank der in den letzten Jahren erfolgten Mitteilungen über die Eigenschaften der Enzyme SCoA^{40, 41}, ALAS⁴², ALAD^{34, 43-46} und PBGA⁴⁷⁻⁵¹ vorgenommen werden konnten, erlauben spezifischere Aussagen als Versuche mit Hemmstoffen der Protein- und Nukleinsäuresynthese und die Messung des Endproduktes Chlorophyll.

Methoden

Saatgut und Anzucht

Zu den meisten Versuchen wurde Badischer Landmais verwendet; andere nicht näher bezeichnete Sorten ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die Karyopsen wurden vor der Aussaat in Schalen mit Torf 24 Stdn. eingequollt. Die Temperatur des Kulturraumes betrug 28 °C. Bei Versuchsbeginn hatten die Maispflanzen eine Länge von 12 bis 15 cm über dem Epikotylknoten.

Inkubation

Die Pflanzen wurden kurz unterhalb des Epikotylknotens abgeschnitten und in Bechergläser mit 1/2 konzentrierter KNO₃-Lösung gestellt, die je nach Versuchsziel Substanzen wie LA oder Zucker enthielt. Wenn die gewünschte Menge Substanz im Dunkeln aufgenommen war, wurden die Pflanzen zum Versuch in eine feuchte Kammer umgesetzt. Kleinere Gewebestücke wurden im Medium schwimmend in Petrischalen inkubiert.

Die Lichtintensität unter Leuchtstofflampen (Philips TL 40 W/55) betrug 3500 Lux.

Herstellung von Enzymrohextrakten

Maisblätter wurden von der noch anhaftenden Koleoptile befreit, an ihrem unteren Ende 3 cm abgeschnitten und im Porzellanmörser unter Kühlung mit Quarzsand 1 : 1 (Gew./Vol.) in einer 0,05 M Tris-Lösung, die 0,025 M an ME war, zerrieben. Die Flüssigkeit des Homogenates wurde durch ein Tuch abgepreßt und 30 Min. bei $18 \cdot 10^3$ g zentrifugiert. Für die Bestimmung von ALAD wurde der Extrakt zur Entfernung von Hemmstoffen noch über Sephadex G 25 zentrifugiert⁵².

Succinyl-CoA-Synthetase

Wegen der geringen UV-Durchlässigkeit der Enzymansätze wurde die Hydroxylaminmethode von KAUFMANN⁵³ benutzt. Zum Test wurden 0,2 ml Tris-HCl-Puffer (0,2 M) pH 7,8; 0,05 ml Na-Succinat (1 M); 0,05 ml ATP (0,05 M); 0,2 ml CoA (1 mg/ml); 0,025 ml Mercaptoäthanol (0,1 M); 0,025 ml MgCl₂ (0,1 M); 0,1 ml NH₂OH pH 7,2 (2,4 M), Enzymlösung und Wasser zum Endvolumen von 1 ml einpipettiert. Bei 25 °C wurde längstens 30 Min., so lange die Reaktion noch linear war, inkubiert und die Inkubation mit 0,2 ml eines Reagenzes, das 5 % FeCl₃, 12 % TCA in

3 N HCl enthielt⁵⁴, abgebrochen. Nach dem Zentrifugieren wurde die Extinktion bei 540 nm gegen eine Probe gemessen, die zum Zeitpunkt 0 abgebrochen war oder kein Succinat enthielt. 1 μ Mol Succinhydroxamsäure im Ansatz gibt bei einer Sichtdicke von 1 cm eine Extinktion von 0,43.

δ -Aminolävulinsäuresynthetase

Dieses Enzym ist äußerst labil^{10, 42, 55} und steht deshalb zu Reihentesten nicht zur Verfügung. Es läßt sich jedoch *in vivo* relativ gut über die Anreicherung von ALA nach spezifischer Blockierung des Folgeenzym ALAD mit Strukturanalogen von ALA wie LA⁵⁶ oder Hydroxy-LA⁵⁷ messen⁵⁸⁻⁶⁰. Wir verwendeten LA. Diese Meßmethode hat dazu den Vorteil, die Vorgänge in der Zelle selbst zu erfassen.

Die Pflanzen wurden bei Versuchsende 1 : 2 (Gew./Vol.) mit 0,05 M TCA zerrieben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand auf pH 4,6 gebracht und 20 : 1 mit Acetylaceton versetzt, das ALA während 10 Min. im kochenden Wasserbad in ein mit Ehrlichs Reagenz nachweisbares Pyrrol (2-Methyl-3-acetylpyrrol-4-propionsäure) überführte⁶¹. Bei 552 nm war der m Extinktionskoeffizient $64 \cdot 10^3$ l/Mol \cdot cm⁶¹.

δ -Aminolävulinsäuredehydratase

1 ml des bei 32 °C inkubierten Ansatzes enthielten 0,1 ml ALA (3 mg/ml), 0,5 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,3 (0,1 M), 0,05 ml MgCl₂ (0,1 M), 0,05 ml ME (0,1 M) und Enzymlösung. Nach dem Abbrechen des Ansatzes mit je 0,1 ml 3 M TCA und 0,1 M HgCl₂-Lösung wurden Aliquote 1 : 1 mit Ehrlichs Reagenz (1 g Dimethylaminobenzaldehyd in 16 ml Perchlorsäure und 34 ml Eisessig) versetzt und die Extinktion bei 555 nm gemessen (E_m : $62 \cdot 10^3$ l/Mol \cdot cm)⁶². Aus PBG entstandenes Uroporphyrin wurde in die Auswertungen einbezogen.

Porphobilinogenase

Wie alle Enzymteste wurden die Ansätze der Einfachheit wegen in Zentrifugengläsern ausgeführt. Sie enthielten 0,1 ml PGB (1 mg/ml), 0,5 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,2 (0,2 M), 0,1 ml EDTA pH 8,2 (0,025 M) und Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Inkubation, die bei 32 °C erfolgte, wurde durch 0,1 ml 3 M TCA abgebrochen und der klarzentrifugierte Überstand 1 : 1 mit 5 M HCl versetzt. Werte für Uroporphyrin wurden nach 2-3-stdg. Autoxydation im Licht bei 406 nm gemessen (E_m : $530 \cdot 10^3$ l/Mol cm)⁴⁷.

Kolorimetrischer Nachweis von Lävulinsäure

Eine Farbreaktion der $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ Gruppe⁶³ wurde für Lävulinsäure zum quantitativen Nachweis verwendet. Unter Schütteln wurde in der angegebenen Reihenfolge 0,2 ml Lävulinsäure (10^{-3} - 10^{-4} M), 0,5 ml H₂O, 0,25 ml konzentrierte Schwefelsäure und 0,05 ml Salicylaldehyd einpipettiert. Die Mischung

wurde daraufhin 2 Stdn. im kochenden Wasserbad gehalten, danach abgekühlt und vor dem Messen mit 1 ml Isopropanol versetzt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 518 nm. Gegen eine Probe ohne LA gemessen ergeben 0,1 μ Mol LA eine Extinktion von etwa 0,4. Zusatz größerer Mengen Schwefelsäure bedingt Farbvertiefung und schnellere Farbbildung, erhöht jedoch das Risiko unkontrollierter Farbbildung mit Salicylaldehyd allein. Von ALA wird der Test nicht beeinflusst.

Chromatographie von ALA, PBG, LA und verwandten Verbindungen

Es wurden Kieselgel- (Kieselgel G, Merck) und Zellulose- (Marcherey, Nagel & Co, MN 300 und mikrokristallin) Platten in der üblichen Weise hergestellt. An Laufmitteln für Zelluloseplatten wurden verwendet:

- 1) n-Butanol – Eisessig – Wasser (63:11:26) ⁶⁴
- 2) n-Butanol – Ameisensäure – Wasser (55:45:3)
- 3) n-Butanol – 10 N NH_4OH – Wasser (50:1:49, obere Phase) ⁶¹
- 4) Äthanol – Eisessig – Pyridin – Wasser (95:10:3:3) ⁶⁵

Zur Trennung auf Kieselgelplatten dienten:

- 2) n-Butanol – Ameisensäure – Wasser (55:45:3)
- 3) n-Butanol – 10 N NH_4OH – Wasser (50:1:49, obere Phase) ⁶¹
- 5) Äthanol – Chloroform – Ammoniak – Wasser (53:30:15:1,5) ⁶⁶
- 6) Benzol – Methanol – Eisessig (79:14:7) ⁶⁷

Eine Übersicht über die R_f -Werte gibt Tab. I. Auf mikrokristalliner Zellulose liegen diese im allgemeinen etwas tiefer als auf MN 300. ALA zersetzt sich leicht auf Kieselgelplatten.

Tab. I. R_f -Werte von ALA, AA, ALAP AAP PBG und LA auf Zellulose- und Kieselgelschichten ($\ddagger \equiv$ Schwanzbildung).

Schicht	Laufmittel	ALA/ALAP		AA/AAP		PBG	LA
Zellulose	1	43	87	44	96	61	88
Zellulose	2	70	94	87	94	85	88
Zellulose	3	0	21	63	91	0	—
Zellulose	4	23	92 \ddagger	44	94 \ddagger	45 \ddagger	87
Kieselgel	2	28	78	29	85	50	76
Kieselgel	3	—	19	—	82	0	—
Kieselgel	5	20	64	—	97	13	36
Kieselgel	6	15	45	—	66	8	75

Nachweis von ALA, PBG, LA und verwandten Verbindungen auf DC-Platten

PBG, ALAP und AAP konnten unmittelbar durch Besprühen mit Wasser verdünntem Ehrlich Reagenz (1:1) sichtbar gemacht werden. ALA und AA wurden auf den Platten durch Besprühen mit Acetylaceton in 0,5 M Natriumacetatpuffer pH 4,6 (1:10) und anschließendes Erhitzen auf 80–90 °C in ALAP und AAP

übergeführt. In wenigen Fällen erfolgte der Nachweis von ALA mit Pikrinsäure ⁶⁸. Zum Nachweis von LA auf Kieselgelplatten wurden diese mit einer frischbereiteten Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure, Äthanol und Salicylaldehyd (20:80:5) besprüht. Nach dem Erhitzen auf 100–120 °C zeigten sich in der Position von LA ziegelrote Flecken auf schwach rosa Untergrund. 1 μ g war noch nachzuweisen. ¹⁴C-markierte Verbindungen wurden im DC-Scanner (Berthold) oder durch Autoradiographie nachgewiesen.

Bestimmung von Bezugsgrößen

Trockengewichtsangaben beziehen sich auf gefriergetrocknetes Material. Lösliches Protein wurde zur Vermeidung störender Absorption in 0,3 M TCA ausgefällt, in 1-proz. Na-Dodecylsulfat gelöst und mit der Methode von Lowry *et al.* ⁶⁹ bestimmt.

Bei sehr stark gefärbten Lösungen wurde die Kjeldahlmethode verwendet. Chlorophyll wurde aus gefriergetrocknetem Material mit 80-proz. Aceton extrahiert. Mittels eines Nomogramms ¹² wurden die bei 663 und 645 nm gemessenen Extinktionswerte in Chlorophyllwerte übertragen.

Enzymatische Synthese von Porphobilinogen

Für die Synthese von PBG aus ALA genügte das dialysierte Präzipitat des ersten Anreicherungs-schrittes von ALAD aus Spinat ³⁴. Der Ansatz enthielt in 100 ml etwa 125 mg Protein, 100 mg ALA, 5 mMol Tris-HCl-Puffer pH 8,3; 0,5 mMol ME und 0,5 mMol MgCl_2 . Vor der Inkubation bei 32 °C wurde die für den jeweiligen Versuchsansatz optimale Na-Dodecylsulfatkonzentration ermittelt ²³. Die Reaktion kam bei etwa 75 % der theoretisch möglichen Menge an PBG zum Stillstand, wonach das Protein mit TCA ausgefällt wurde. Aus dem auf pH 4,5 gebrachten Überstand wurde mit frischbereiteter, gesättigter HgAc_2 -Lösung PBG als Hg-Salz mit roten Nebenprodukten ausgefällt und abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in H_2O suspendiert und PBG mit H_2S freigesetzt. Nach Zentrifugation, Einengen des Überstandes auf 1–2 ml und vorsichtiger Einstellung des pH-Wertes auf pH 4,5 bildeten sich meist spontan noch stark rot gefärbte Kristalle ⁷⁰ (Ausbeute 45 %). Diese wurden in wenig verdünntem Ammoniak gelöst und über eine 50 · 2,5 cm Sephadex G 25 Säule gegeben, die die roten Begleitsubstanzen an der Front abtrennte. Die PBG-Lösung ist danach völlig farblos. Bei erneuter, durch die geringe Salzkonzentration erleichterter Kristallisation bilden sich nur noch schwach rosa gefärbte Kristalle.

Herstellung von uniform ¹⁴C-markierter Lävulinsäure aus Fruktose

20 mg Fruktose mit einer auf alle C-Atome verteilten Radioaktivität von 50 μ Ci wurden mit 0,5 ml 0,5 N HCl im Glasrohr eingeschmolzen und 8 Stdn.

auf 140 °C erhitzt. Diese Temperatur begünstigt in den ersten Stunden die Anreicherung des Zwischenproduktes Hydroxyfurfural⁷¹, das dann im weiteren Verlauf zu Lävulinsäure und Ameisensäure zerfällt.

Durch Variation der H⁺-Ionenkonzentration läßt sich die Reaktion beschleunigen oder verlangsamen. Abb. 2 zeigt den Versuchsverlauf mit nicht markierter Fruktose in $2,5 \cdot 10^{-2}$ HCl. Zu verschiedenen Zeiten entnommene Proben wurden auf Kieselgelplatten aufgetragen und mit Laufmittel 5 entwickelt. Mit Salicylaldehydsprühmittel wird die unterste Fleckenreihe schwarz (Fruktose), die große mittlere ziegelrot (Lävulinsäure), die schmale darunter braun und die oberste dunkelviolett (Hydroxyfurfural?). Man erkennt deutlich wie sich zuerst auf Kosten der Ausgangssubstanz das Zwischenprodukt anreichert und mit dem Entstehen des Endproduktes dieses wieder verschwindet.

Nach Versuchsabbruch wurde das Produkt von teerartigen Bestandteilen abzentrifugiert und über Chromatographie auf Kieselgelplatten gereinigt. Radioaktivität, die noch aus der braunroten Bande mitgeschleppt wurde, wurde über eine $80 \times 0,8$ cm Sephadex-G-10-Säule abgetrennt. Danach war das Produkt auf 2 Schichten und 5 Laufmitteln einheitlich. Von den eingesetzten $1,85 \cdot 10^6$ cps ($50 \mu\text{Ci}$) waren im Produkt 10^6 cps wieder zu finden. Bei Berücksichtigung des Verlusts eines C-Atoms entspricht dies einer Ausbeute von 65 %.

Die Radioaktivität wurde im Scintilationszähler (Tri-Carb. Modell 3380, Packard) bestimmt oder mit einer etwa 12-proz. Zählausebeute auf Zelluloseschichten mit einem Methandurchflußzähler (Frieske und Hoepfner).

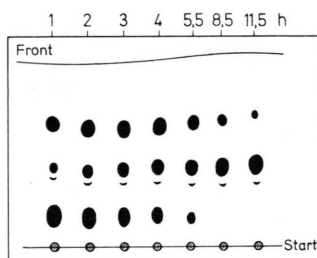


Abb. 2. Synthese von Lävulinsäure aus Fruktose. Dem auf 140 °C erhitzten Ansatz (Fruktose in $2,5 \cdot 10^{-2}$ N HCl) wurden zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn Proben entnommen und auf Kieselgelplatten mit Laufmittel 5 aufgetrennt. In der untersten Fleckenreihe findet sich Fruktose, in der obersten ein Zwischenprodukt, in der mittleren, stark ausgeprägten, Lävulinsäure. Nachweis mit Salicylaldehyd-Sprühreagenz.

Ergebnisse

1. Nachweis von ALAS über die Anreicherung von ALA

Das Enzym ALAS konnte bisher nicht aus höheren Pflanzen isoliert werden und selbst der Nachweis des-

selben ist in Extrakten pflanzlicher Gewebe nur selten möglich gewesen^{42, 72}. In vivo bietet sich jedoch die Möglichkeit, ALAS-Aktivität über die Anreicherung seines Produktes ALA zu bestimmen.

Werden nämlich kleine Stücke pflanzlichen Gewebes in Nährlösung mit LA inkubiert, so häufen sich in den Zellen meßbare Mengen einer Substanz an, die sich mit Acetylaceton ebenso wie ALA zu einer mit Ehrlichs Reagenz kirschrot nachweisbaren Verbindung umsetzt. Dasselbe wird beobachtet, wenn Mikroorganismen mit LA inkubiert werden⁵⁸⁻⁶⁰. Da LA das ALA umsetzende Enzym ALAD blockiert⁵⁶, ist anzunehmen, daß die vor dem Block angereicherte Substanz mit ALA identisch ist. Die Identität ließ sich durch Cochromatographie und Chromatographie auf DC-Platten in verschiedenen Laufmitteln mit Vergleichssubstanzen wie ALA, AA, PBG, ALAP und AAP beweisen. Vor der DC mußten noch die Trennung störende Stoffe aus dem TCA-Extrakt (s. Methoden) entfernt werden. Nach Ausäthern, Einengen und einer Fällung mit Ammoniak bei pH 7-9 wurde der klarzentrifugierte Überstand auf einer Sephadex G 10 oder G 15 Säule in 0,02 N HCl chromatographiert. Danach konnte die mit Ehrlichs Reagenz positive Fraktion auf DC-Platten weiter analysiert werden. Laufmittel, Schichten und R_F-Werte sind unter den Methoden aufgeführt.

Den Analysenergebnissen zufolge besitzen die unterschiedlichsten, in Tab. II zusammengestellten pflanzlichen Gewebe wie Wurzeln, Knollen, Hypokotyl, Epikotyl und Endosperm die Fähigkeit ALA in nachweisbarer Menge zu synthetisieren. Sie liefern damit den Beweis, daß das für die ALA-Synthese verantwortliche Enzymsystem oder Enzym ALAS in pflanz-

Tab. II. Anreicherung von ALA in verschiedenen pflanzlichen Geweben nach Inkubation mit LA.

Organ	Pflanze	in $2 \cdot 10^{-2}$ M LA nMol ALA/g FG		in 10^{-2} M LA nMol ALA/g FG	
		in 24 ^h	in 48 ^h	in 24 ^h	in 48 ^h
Wurzel	Meerrettich	83	130	38	69
	Mais	—	—	51	104
	Schwarzwurzel	19	92	—	—
	Karotte	—	—	—	12
	Rizinus	—	—	69	—
Knolle	Kartoffel	51	172	—	—
	Kohlrabi	53	134	—	—
	Sellerie	54	116	—	—
Hypokotyl	Rizinus	39	—	—	—
Epikotyl	Mais	38	—	—	—
Endosperm	Rizinus	33	—	—	—

lichen Geweben schon vor dem Ergrünen ständig aktiv ist. (Man vgl. hierzu die Hypothese von GASSMAN und BOGORAD^{6, 7}.) Entsprechende Ergebnisse erhielten wir von Versuchen mit Gewebekulturen von Tabak²⁵. In Kartoffelscheibchen reicherten sich in 48 Std. über 170 nMol ALA pro g Frischgewicht an. Ergrünt die Kartoffeln, so stiegen die Werte für ALA an. An das umgebende Medium wurde ALA nicht abgegeben.

Nach diesen Versuchen war es um so überraschender, daß in etiolierten Maisblättern unter denselben Bedingungen keine ALA oder nur Spuren davon nachgewiesen werden konnten. ALA reicherte sich erst an, als die Maisblätter während der Inkubation ins Licht gestellt wurden.

2. ¹⁴C-Einbau von markierter LA in ALA

Bei den in unseren Versuchen verwendeten hohen LA-Konzentrationen und den vergleichsweise geringen Mengen angereicherter ALA war nicht auszuschließen, daß LA wie γ, δ -Dioxovaleriansäure⁷³ von der Pflanze aminiert wird und ALA entsteht. Um diesem, die Versuche in Frage stellenden Verdacht nachzugehen, wurde LA durch uniform ¹⁴C-markierte LA ersetzt und die Radioaktivität der entstehenden ALA bestimmt.

Die Pflanzenextrakte wurden in der für die Identifizierung von ALA beschriebenen Weise gewonnen, von Ballaststoffen befreit, eingengt und über eine 80 · 0,8 cm Sephadex G 10 Säule gegeben, auf der ALA von LA getrennt wird. Die Abtrennung der Radioaktivität ist nicht vollständig, da eine Reihe von markierten Substanzen auftreten, bei denen es sich weder um ALA noch um LA handelt. Bei DC traten bis zu 8 Verbindungen auf.

Diese Verbindungen ließen sich auch durch weitere Chromatographie an Säulen wie Dowex 50 oder Polyamid nicht vollständig aus den ALA enthaltenden Fraktionen entfernen. Es wurde deshalb ALA in den Eluaten mit Acetylaceton in 2-Methyl-3-acetylpyrrol-4-propions. überführt und dieses bei niedrigem PH-Wert ausgeäthert. Dieses Verfahren brachte für alle Versuche ein einheitliches Ergebnis. Nur noch 7–9 % der spezifischen Radioaktivität der eingesetzten LA waren in ALA wiederzufinden. Die Ergebnisse sind in Tab. III zusammengestellt. Chromatographie von ALAP änderte an der spezifischen Aktivität nichts mehr. Sprühfleck und Aktivitätsfleck waren deckungsgleich. Mindestens 92 % der gebildeten ALA sind demnach nicht aus LA entstanden; selbst die Markierung des Rests kann über LA-Metaboliten in ALA gelangt sein.

ALA ist über ein System gebildet worden, für dessen Tätigkeit die durch LA hervorgerufene ALA-Anreicherung als Maß dienen kann.

3. Lichtinduzierte ALA-Anreicherung in Abhängigkeit von der LA-Konzentration

LA wird von Maispflänzchen über das kurz unter dem Knoten abgeschnittene Epikotyl im selben Verhältnis mit der Nährlösung aufgenommen, wie es in dieser enthalten ist. Zwei Versuche mit je drei Proben mit ¹⁴C-markierter LA ergaben für 5 λ auf Zellose-schichten eingetrockneter Nährlösung im Methandurchflußzähler folgende Werte: 401 bzw. 1382 cpm bei Beginn des Versuchs und 406 bzw. 1233 cpm am Ende. Die Verteilung der aufgenommenen LA in den Blättern ist nicht völlig homogen. Im unteren Blattdrittel sammelte sich bei einem Versuch mit markierter LA

Tab. III. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von ALA aus Maisblättern nach Inkubation der Pflanzen mit uniform ¹⁴C-markierter LA. Bei Versuch II wurden die oberen (a) von den unteren (b) Blatteilen getrennt.

	Versuch I	IIa	Versuch IIb
Blattgewicht (g)	355		165
aufgenommene LA (μ Mol)	$3,13 \cdot 10^4$		$1,69 \cdot 10^5$
angereicherte ALA (μ Mol)	$5,56 \cdot 10^6$	$9,45 \cdot 10^5$	$6,54 \cdot 10^6$
eingesetzte spezifische Aktivität (cpm/ μ Mol LA)			
Aktivität im ausgeätherten TCA-Extrakt (cpm/ μ Mol ALA)	$5,85 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^4$	—
Aktivität nach der Sephadex-Säule (cpm/ μ Mol ALA)	$3,15 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$	$3,95 \cdot 10^5$
Aktivität nach der Dowex-Säule (cpm/ μ Mol ALA)	$2,92 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^4$	$1,19 \cdot 10^4$
Aktivität nach Überführung ins Pyrrol (cpm/ μ Mol ALAP)	16,7	11,5	8,4
% der ursprünglichen spezifischen LA-Aktivität in ALAP	1,42	4,75	1,63
	9,3	7,4	7,0
% der ursprünglichen spez. LA-Aktivität nach Dünnschichtchromatographie von ALAP	—		10,9
			7,6

mehr LA ($1,06 \cdot 10^7$ cpm) an als in den oberen zwei Dritteln ($4,48 \cdot 10^6$ cpm), obwohl 75 % der ALA sich dort bildeten (vgl. Tab. III).

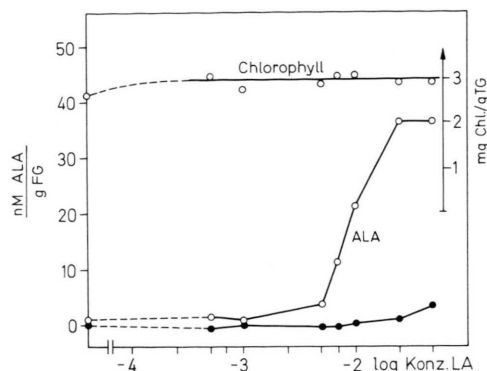


Abb. 3. Chlorophyllbildung und Anreicherung von δ -Aminolävulinat nach Inkubation von Maispfländen mit verschiedenen Konzentrationen von LA im Licht (○) und Dunkeln (●). Versuchsdauer 10 Std.

Bei den Versuchen wurden die Pflanzen im Dunkeln und im leichten Luftstrom so lange belassen, bis sie die gewünschte LA-Menge aufgenommen hatten und anschließend unter einem Glassturz und hoher Luftfeuchtigkeit belichtet. Die Inkubationsdauer betrug 6–8 Std. Die in Abb. 3 wiedergegebenen Konzentrationswerte beziehen sich auf das gesamte Blatt, dessen Gewicht mit der aufgenommenen LA-Menge in Beziehung gesetzt wurde. Die für die Anreicherung von ALA optimale Konzentration lag bei etwa $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l LA (\cong Mol/g Blatt). Zu niedrigeren Konzentrationen hin fällt die Anreicherungskurve steil ab. Erst bei Konzentrationen von $3\text{--}5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l und höher beginnen die Pflanzen zu welken und weniger ALA zu synthetisieren. Die Zeit ist nur für die angereicherte Menge, nicht jedoch für die Lage des Optimums von Bedeutung. Es fällt auf, daß ganz im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Tabakgewebekulturen²⁵ die Chlorophyllsynthese wenig oder nicht beeinflusst wird. Im Dunkeln bildeten sich nur Spuren von ALA am Ende der Konzentrationsreihe.

4. Zeitlicher Verlauf der ALA-Anreicherung

Nachdem die Pflanzen im Dunkeln die gewünschte Menge an LA aufgenommen haben, steigt im Licht die in den Blättern nachweisbare Menge an ALA allmäh-

lich an. Während der ersten Stunden der Belichtung ist noch wenig Anreicherung festzustellen, obwohl die Chlorophyllsynthese schon merklich einsetzt. Der weitere Verlauf der ALA-Anreicherungskurve ist dann exponentiell bis linear ansteigend und wird, wenn größere Mengen an ALA gebildet worden sind, sigmoid oder abfallend. Dem Kurvenverlauf der Abb. 4 ist zu entnehmen, daß die Aktivität von ALAS über einen längeren Zeitraum hin während der Belichtung ansteigt. Der Aktivitätsanstieg kann als lichtinduzierte Neusynthese von Enzymprotein gedeutet werden. Versuche mit Hemmstoffen der Protein- und Nukleinsäuresynthese stützen diese Deutung^{6, 7, 10}.

Lichtabbruch führt zum sofortigen Stillstand der ALA-Anreicherung; der ALA-Spiegel bleibt für Stunden auf demselben Niveau, ehe er langsam absinkt. Auch bei einer labilen ALAS mit geringer biologischer Halbwertszeit von 1 1/2 Std., wie sie bei Gerste aus Versuchen mit Hemmstoffen der Proteinsynthese ermittelt¹⁰ wurde, hätte man in den ersten Stunden nach Lichtabbruch noch einen geringen Anstieg erwartet. In einer unlängst erschienenen Arbeit⁶⁵, die sich wiederum mit Effekten von Hemmstoffen der Protein- und Nukleinsäure-Synthese auf die Chlorophyllsynthese beschäftigte, wird die Lebenserwartung von ALAS aus Gerste mit 10 Min. angegeben. Der Verlauf der ALA-Anreicherungskurve in Abb. 4 spricht für eine mindest ebenso geringe Überlebensdauer von ALAS aus Maisblättern. Allenfalls könnte man noch eine nur im Dunkeln auftretende allosterische Hemmung annehmen. Das der Abb. 4 eingefügte Diagramm, in dem die Ergebnisse aus 5 Versuchen gemittelt sind, zeigt nochmals, daß mit Beginn der Dunkelheit keine Synthese von ALA mehr zu verzeichnen ist.

Erneuter Lichtbeginn nach mehrstündiger Dunkelheit setzt die ALA-Synthese nicht wieder in Gang. 4 Std. nach Lichtbeginn ist noch keine Steigerung über das Ausgangsniveau zu beobachten. Da seit der Keimung im Hell-Dunkel-Wechsel aufgewachsene, voll ergrünte Pflanzen noch ALA-Anreicherung zeigen, ist zumindest mit einer ausgedehnten, vielleicht durch die lange Einwirkung von LA bedingten Latenzzeit zu rechnen.

5. Einfluß primärer Stoffwechselprodukte auf die ALA-Anreicherung

Die für die Chlorophyll- und ALA-Synthese nötigen Vorstufen Glycin und Succinat scheinen auch von abgeschnittenen Pflänzchen in optimaler Menge gebil-

det zu werden. In 1/2 konzentrierter Knoop'scher Nährlösung, die 10^{-1} oder 10^{-2} M an Glycin bzw. Succinat war, wurde von den Pflänzchen weniger ALA angereichert als in Lösungen ohne Zusätze. Besonders

Tab. IV. Chlorophyll- und ALA-Anreicherung bei Fütterung von Maispflanzen mit primären Stoffwechselprodukten ($0,1$ M). Die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern sind auf Kontrollen ohne LA (Chlorophyll) bzw. auf Kontrollen mit LA aber ohne die aufgeführten Substanzen (ALA) bezogen. $n \equiv$ Anzahl der Proben.

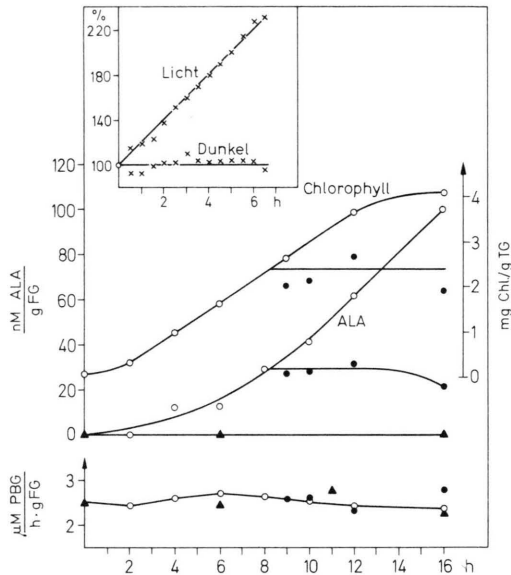


Abb. 4. Chlorophyllbildung, Anreicherung von δ -Aminolävulinat und in vitro-Aktivität von δ -Aminolävulinatdehydratase im Licht (\circ) und nach Lichtabbruch (\bullet). In vivo war ALAD durch 10^{-2} M LA gehemmt (\blacktriangle) \equiv Dunkelkontrollen. Eingefügte Abbildung: Anreicherung von ALA nach Lichtabbruch im Vergleich zu Dauerlicht; aus 5 Versuchen gemittelte Kurven.

stark war der Rückgang, wenn beide Substanzen gleichzeitig anwesend waren. Nicht anders verhielt sich α -Ketoglutarat. Es fiel auf, daß sich der Chlorophyllgehalt trotzdem nicht signifikant von dem der Kontrollen unterschied (Tab. IV). Diese Beobachtung deckt sich mit Befunden an Gerste, bei der Glycin und Succinat ebenfalls ohne Wirkung auf die Chlorophyllsynthese bleiben¹⁰. Zucker, die bei Versuchen mit Bohnenblättern die Latenzzeit der Chlorophyllsynthese verkürzen und die Protochlorophyllid- und Chlorophyllsynthese stimulieren^{74, 75}, beeinflussen in Maispflänzchen ALA-Anreicherung und Chlorophyllsynthese nur geringfügig. Von den verwendeten Zuckern wurde nur mit Saccharose eine gesicherte, ein Drittel über den Kontrollen liegende Zunahme von ALA beobachtet. Wieder waren die Chlorophyllwerte nicht signifikant von den Kontrollwerten verschieden. In Ansätzen mit LA allein war der Chlorophyllgehalt gegenüber den nur mit Knoop'scher Lösung behandelten Pflanzen im Mittel um etwa 6 % reduziert.

	ALA % der Kontr.	n	Chlorophyll % der Kontr.	n
Succinat	60,0 \pm 13,8	5	100,0 \pm 12,2	4
Glycin	75,8 \pm 11,3	5	95,3 \pm 7,4	4
α -Ketoglutarat	86,0 \pm 6,0	2	109,5 \pm 5,0	2
Succinat+Glycin	27,0 \pm 2,0	2	114,0	1
Glukose	108,5 \pm 12,1	5	100,0 \pm 10,4	4
Fructose	118,0 \pm 8,6	3	84,7 \pm 4,2	3
Saccharose	133,9 \pm 11,6	7	87,0 \pm 11,5	3
LA ohne Zutat	100,0		93,8 \pm 6,2	6

Ein Ernährungsmangel, wie er nach den Versuchen mit Bohnenblättern angenommen wurde, scheint in Maisblättern nicht vorzuliegen. Die Förderung der ALA-Anreicherung durch Saccharose dürfte auf eine allgemeine Stoffwechselsteigerung durch das bei Monokotylen weit verbreitete Kohlenhydrat zurückzuführen sein, ohne aber die Bildung von Chlorophyllholochrom einzuschließen. In welcher Weise Succinat, Glycin und α -Ketoglutarat die LA-Blockierung von ALAD verringern, ist nicht bekannt.

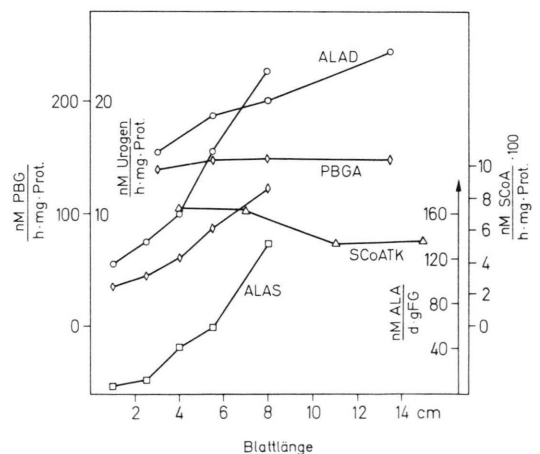


Abb. 5. Enzymaktivitäten von δ -Aminolävulinatdehydratase, Porphobilinogenase und Succinyl-CoA-Synthetase während der Entwicklung von Maisblättern im Dunkeln. Aktivität von δ -Aminolävulinatdehydratase im Licht. Steile Kurvenstücke: Aufarbeitung mit Koleoptile.

6. Aktivität von SCoAS, ALAS, ALAD und PBGA während der Blattentwicklung

In belichteten Maisblättchen, die noch von der Koleoptile umschlossen waren und in LA-Lösungen schwammen, konnte wie in den 12–15 cm großen Pflänzchen ALA nachgewiesen werden. Die Fähigkeit zur Anreicherung war nahezu linear mit der Länge der Blättchen korreliert. In 24 Std. wurden in 1,5 cm langen, noch von der Koleoptile umschlossenen Blättchen 7–8 nMol ALA pro g Frischgewicht gefunden, in 8 cm langen waren die Werte 15–20 mal höher. Diese Korrelation zwischen Länge der Blättchen und angereicherter ALA legt eine mit der Entwicklung der Pflanzen steigende Induzierbarkeit von ALAS nahe, doch sollte man nicht außer acht lassen, daß sich in den bei der Zellstreckung vergrößernden Vakuolen auch mehr ALA anreichern könnte. In den Dunkelkontrollen wurde keine ALA gefunden. Spuren davon fanden sich, wenn Blattstückchen von etiolierten, 15 cm langen Blättchen in derselben Weise behandelt wurden.

Das in der Biosynthese folgende Enzym ALAD ist dagegen schon in sehr kleinen etiolierten Pflänzchen hoch aktiv. Die auf das Frischgewicht bezogene Aktivität ändert sich auch während des Blattwachstums kaum. Da aber die Werte für lösliches Protein mit der Länge der Blättchen abnehmen, steigt die spezifische Aktivität während der Entwicklung an (Abb. 5). Der Anstieg ist weniger steil, wenn die Koleoptile, deren Masse und geringe Aktivität bei kleinen Blättchen besonders ins Gewicht fällt, vor der Aufarbeitung entfernt wurde.

Ein entsprechender Aktivitätsverlauf während des Blattwachstums war auch bei dem auf ALAD folgenden Enzym PBGA zu beobachten, wenn auch die Gesamtaktivität beträchtlich geringer als die der ALAD war.

Auch für SCoAS, die neben α -Ketoglutaratdehydrogenase SCoA für ALAS bereitstellt⁴, wurde die höchste Aktivität in jungen Blättern gefunden. Während des Blattwachstums nimmt dann Aktivität und Protein annähernd im gleichen Maße ab. Die spezifische Aktivität ändert sich daher nur unwesentlich.

7. Einfluß des Lichtes auf die Aktivität von SCoAS, ALAD und PBGA

Der Einfluß von Licht auf die Aktivität von ALAS wurde in vorausgehenden Abschnitten eingehend be-

schrieben. Im Gegensatz zu deren Aktivitätssteigerung im Licht und zu Beobachtungen an belichteten Tabakgewebekulturen blieb Licht im Hinblick auf die Aktivität von ALAD wirkungslos. Über die gesamte Versuchsdauer von 12 bzw. 16 Std. (Abb. 4 u. 6) unterschied sich die spezifische Aktivität im Licht nicht wesentlich von der im Dunkeln. Der leichte Aktivitätsanstieg zu Beginn des Versuchs der Abb. 6 ist, wie die Kontrolle erkennen läßt, endogen bedingt. Trotz der in vivo erfolgten Blockierung von ALAD durch LA ist das Enzym nach Entfernung von LA durch Gelfiltration voll aktiv (Abb. 4). Im Mittel aus 6 Versuchen besaßen mit LA inkubierte Pflanzen sogar 108 % der Aktivität der nicht behandelten.

In Versuchen mit Tabakgeweben und Mais war die Entwicklung der Enzyme ALAD und PBGA eng miteinander verknüpft und gab Anlaß, eine gemeinsame Steuerung zu vermuten²⁴. Auf Grund des Aktivitätsverlaufes von ALAD war deshalb anzunehmen, daß sich in Mais die Aktivität von PBGA im Licht wenig ändern würde. Trotzdem wurde gegenüber den Dunkelkontrollen eine leichte, etwa 25-proz. Aktivitätszunahme beobachtet, die aber im Vergleich mit der Zunahme während des Wachstums gering war.

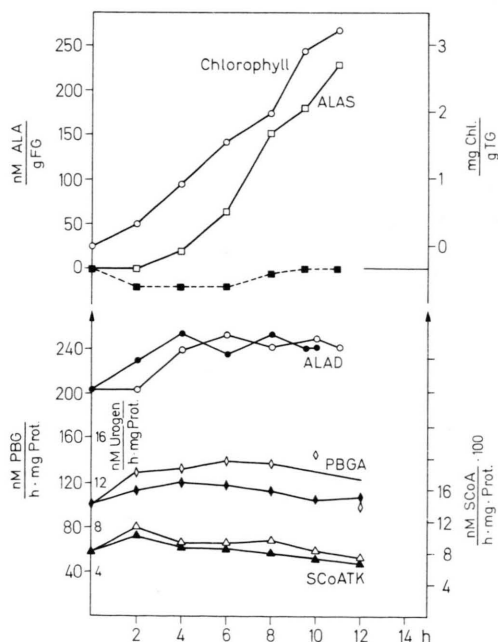


Abb. 6. Chlorophyll und Aktivität von δ -Aminolävulinat-synthetase, δ -Aminolävulinatdehydratase, Porphobilinogenase und Succinyl-CoA-Synthetase in 15 cm langen Maisblättchen während der Belichtung und im Dunkeln (dunkle Symbole).

War die spezifische Aktivität von SCoAS schon während der Blattentwicklung relativ konstant geblieben, so änderte sie sich auch bei Belichtung kaum; die Lichtwerte lagen nur unwesentlich über denen im Dunkeln. Isoliert man jedoch Mitochondrien aus ergrünenden und etiolierten Blättern über Saccharosegradienten, so stellt man immer wieder fest, daß Mitochondrien aus grünen Blättern eine geringere spezifische Aktivität ($1,1 \mu\text{Mol/mg Prot.} \cdot \text{h}$; Mittel aus 4 Versuchen) besitzen als parallele Dunkelkontrollen ($2,4 \mu\text{Mol/mg Prot.} \cdot \text{h}$).

Von allen untersuchten Enzymen ist ALAS somit das einzige, das in etiolierten Maisblättern nicht nachweisbar ist und die Chlorophyllsynthese entscheidend beeinflussen kann.

8. Enzymaktivitäten und Chlorophyllmenge

Wenn man die in einer bestimmten Zeit gebildete Chlorophyllmenge mit der durch die Enzymaktivitäten gegebenen theoretisch möglichen Menge an Zwischenprodukten vergleicht, stellt man fest, daß etwa 20-mal mehr PBG gebildet werden könnte als im Endprodukt auftritt. Urogen wäre noch in 4–5-fachem Überschuß vorhanden, SCoA in fast der 40fachen Menge, wenn man nur SCoAS berücksichtigt und die SCoA-Produktion über α -Ketoglutaratdehydrogenase⁴ vernachlässigt. Die Zahlen machen deutlich, daß die Zwischenproduktsynthese eine weit höhere Kapazität aufweist als stöchiometrisch zur Chlorophyllsynthese nötig ist. Ein schnelleres Ergrünen bei hohen Lichtintensitäten läge im Bereich des Möglichen. Das einzige durch Licht induzierbare Enzym ALAS fällt nun aus der Reihe, da sich überraschender Weise nur 6% der für die Chlorophyllsynthese benötigten Menge an ALA *in vivo* anreichern lassen. Die absolute Menge ist kaum größer als die von anderen Geweben im Dunkeln angereicherte. Das Ergebnis aus 10–12 Versuchen, bei denen nicht stets alle Enzyme gleichzeitig überprüft wurden, ist in Tab. V zusammengefaßt. Interessant ist, daß die angereicherte Menge an ALA der durchschnittlichen Reduzierung des Chlorophyllgehaltes entspricht (Tab. IV).

LA blockiert allem Anschein nach ALAD in Maisblättern nur unvollständig; damit im Einklang steht der geringe Einfluß von LA auf die Chlorophyllsynthese. Die Unstimmigkeit, daß diese bei Belichtung schon merklich einsetzt, während die Anreicherung von ALA noch in der Anlaufphase steckt, klärt sich damit auch. Die anfängliche Verzögerung in diesem System

ist deshalb nicht unbedingt einer gleichlangen Verzögerung der ALAS-Synthese gleichzusetzen.

Tab. V. Übersicht über die in 12 Std. gebildete Chlorophyllmenge und die Menge der nach Enzymtesten theoretisch möglichen Zwischenprodukte in der selben Zeit.

	SCoA	ALA	PBG	Urogen	Chl.
$\mu\text{Mol/g FG in 12 Std.}$	74,5	0,11	22,4	1,12	0,24
aus den Vorstufen synthetisierbares Chlorophyll in μMol	9,3	0,014	5,5	1,12	0,24
aus den Vorstufen synthetisierbares Chlorophyll in Prozenten der erreichten Chlorophyllmenge	3880	6	2285	466	100

Der Vergleich der Menge an angereicherter ALA und der Enzymaktivitäten mit der gebildeten Chlorophyllmenge zeigt erneut, daß die Chlorophyllsyntheserate in Maisblättern nur von der Menge der angebotenen ALA abhängt. Keines der anderen Zwischenprodukte ist bei den festgestellten, hohen Enzymaktivitäten limitierend. Diese Feststellung steht zu unseren Versuchen mit Gewebekulturen von Tabak^{23–25} und anderen Pflanzenteilen in krassem Widerspruch. Es fällt schwer, zu entscheiden, welches Objekt als Beispiel des „Normalfalles“ angesehen werden kann. Da wir jedoch wissen, daß die gesamte Chlorophyllbiosynthesekette in den Chloroplasten lokalisiert ist^{33–36}, darf als sicher angenommen werden, daß der Entwicklungsstand dieser Organellen großen Einfluß auf das Induktionsmuster hat. Gewebekulturen von Tabak besitzen nur Proplastiden und Leukoplasten so lange sie dunkel gehalten werden, Maisblätter dagegen schon weit differenzierte Etioplasten.

Diskussion

Unsere Versuche zur Induktion von SCoAS, ALAS, ALAD und PBGA in ergrünenden Zell- und Gewebekulturen von *Nicotiana tabacum*^{23–25} hatten ergeben, daß 1. die genannten Enzyme in Dunkelkulturen nachweisbar sind und daß 2. mit Ausnahme von SCoAS im Licht eine deutliche Steigerung der Aktivität der Enzyme zu beobachten war. Diese Befunde waren nicht mit den Hypothesen in Einklang zu bringen, nach denen der limitierende Faktor der Chlorophyllbiosynthese ein Enzym oder Protein am Anfang oder am Ende der Chlorophyllbiosynthesekette ist^{6, 21}, das

nur unter dem Einfluß sichtbarer Strahlung ständig in ausreichender Menge gebildet wird. Die in den Tabakgewebekulturen induzierten Enzyme ALAD und PBGA, deren Aktivität eng mit dem Chlorophyllgehalt korreliert ist, liegen weder am Anfang noch am Ende der Chlorophyllbiosynthesekette. Zudem hemmt ALA, das Produkt der auch im Dunkeln aktiven ALAS, die Chlorophyllbiosynthese; es entsteht kein Protochlorophyllid. Man kann aus diesen Beobachtungen den Schluß ziehen, daß die Chlorophyllbiosynthese in den Tabakgewebekulturen von der gleichzeitigen Synthese aller Enzyme dieser Biosynthesekette im Licht abhängt.

Die in der nun vorliegenden Arbeit mitgeteilten Ergebnisse über die Induktion an der Chlorophyllbiosynthese beteiligter Enzyme beim Ergrünen von Maisblättern stehen zu dieser Schlußfolgerung in krassm Widerspruch. SCoAS, ALAD und PBGA sind im Vergleich mit der gebildeten Chlorophyllmenge in 5–40-fachem Überschuß vorhanden und ändern ihre Aktivität im Licht kaum. ALAS ist im Gegensatz zu den Tabakgeweben in dunkel wachsenden Pflanzen nicht nachzuweisen und bedarf der ständigen Induktion durch Licht. Diese Beobachtungen aber stehen im Einklang mit der Hypothese, die die Synthese von ALA im Dunkeln für limitierend hält^{6, 10}. Für Mais konnte

damit die auf GRANICK⁴ zurückgehende Hypothese durch direkte Enzymmessungen bewiesen werden, doch die Lösung ist unbefriedigend. Sie erschwert für sich genommen eine allgemeinere Betrachtung des Problems der Induktion der Chlorophyllbiosynthese. Für Tabakgewebekulturen würde eine eigene Hypothese benötigt ebenso wie für die Alge *Euglena*, die Anlaß war, den limitierenden Faktor am Ende der Chlorophyllbiosynthesekette zu suchen¹².

Eine allgemeinere Lösung bietet sich an, wenn die verschiedenen Möglichkeiten als Teilaspekte eines gemeinsamen Entwicklungsablaufes gedeutet werden. Das Schema der Abb. 7 entstand unter der Voraussetzung, daß allgemein formulierte Theorien zur Enzyminduktion und -regulation auf die betrachteten Pflanzen anwendbar sind und auf Grund der Beobachtung, daß die Chlorophyllsynthese von der lichtinduzierten Reifung der Chloroplasten ebenso abzuhängen scheint wie von der Induktion der eigentlichen Chlorophyllbiosynthesekette. Letztere Beobachtung macht eine Unterscheidung zwischen Lichteffekten nötig, die die Reifung der Plastiden bewirken und solchen, die diese voraussetzen, auch wenn sie sich zum Teil überlagern. Die Einteilung des zeitlichen Ablaufes der Chlorophyllbiosynthese in Protochlorophyllidreduktion – Latenzzeit – kontinuierliche Chlorophyllsyn-

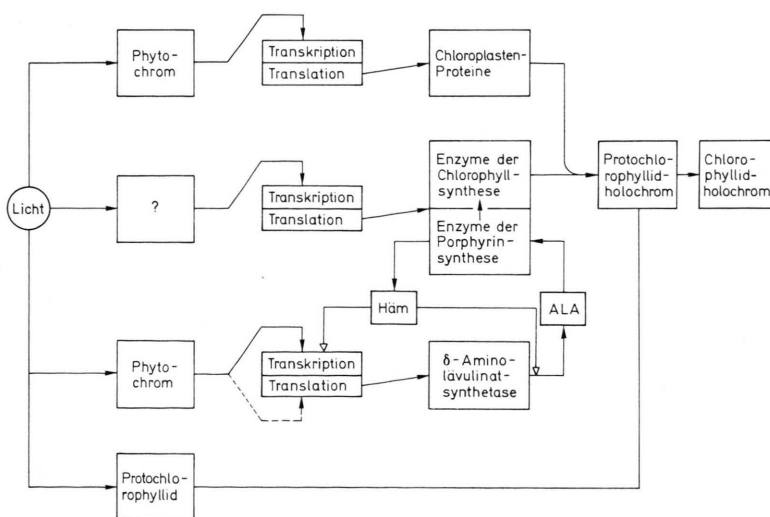


Abb. 7. Ein die verschiedensten Versuchsergebnisse integrierendes Schema zur Regulierung der Chlorophyllbiosynthese. Über Photoakzeptoren nimmt Licht an verschiedenen Orten Einfluß auf die Transkription oder Translation und führt dadurch zum Stillstand gekommene Syntheseschritte weiter. Im Zusammenspiel aller Systeme bildet sich Protochlorophyllidholochrom, das wiederum durch Licht in Chlorophyllidholochrom übergeführt wird. In vielen Fällen hat ALAS, bedingt durch schnelle Aktivitätsänderungen, bevorzugt Steuerungsfunktion. Der bei *Rhodospseudomonas spheroides* gefundene Kontrollmechanismus über Häm unterbricht die Tätigkeit von ALAS.

these^{6, 20, 21, 76-78} geht an dieser Differenzierung vorbei.

In Analogie zur Kontrolle bakterieller Enzyme⁷⁹ kann angenommen werden, daß die Synthese vieler Chloroplastenenzyme von wenigen Regulatorgenen abhängt, deren jedes die Strukturgene einer Biosynthesekette beherrscht. Beim dargestellten Modell wäre das die Regulation der Synthese von verschiedenen Plastidenproteinen (System I), worunter eventuell die Synthese des Proteinanteils von Protochlorophyllidholochrom zählte, von Enzymen der Porphyrin- und Chlorophyllbiosynthesekette (System II) und schließlich die von ALAS (System III). Die Neusynthese dieser Proteine im Licht kann als Derepression gedeutet werden und abhängig vom Objekt, Pflanzenteil und Entwicklungsstand der Plastiden wird das eine oder andere System bevorzugt dereprimiert.

Die unterschiedliche Ausgangsbasis für eine Lichtinduktion zeigt sich deutlich beim Vergleich der Plastidenformen in Zellkulturen von Tabak und in Blättern von Mais.

Die bevorzugte Derepression eines Systems macht die im Modell aufgeführten Systeme unterscheidbar. In Mais hebt sich I und III dadurch von II ab, daß diese bei Belichtung induziert werden, wie aus der Plastidenvergrößerung folgt und aus der ausschließlich im Licht tätigen ALAS, während, soweit gemessen, II kaum beeinflusst wird. Bei voll ergrüntem, im Hell-Dunkel-Wechsel aufgewachsenen Pflanzen mit voll ausgebildeten Chloroplasten ist ALAS immer noch induzierbar und macht dadurch I von III abgrenzbar. Die Ergebnisse anderer Autoren fügen sich diesem Schema ein. Man vergleiche z. B. MEGO u. JAGENDORF¹⁸ und STEER u. GIBBS⁸⁵.

Meist steht Phytochrom am Anfang der in Einzelheiten nicht bekannten Reaktionskette^{80, 81} durch die Licht über die Transkription die Synthese der verschiedensten Biosyntheseketten beeinflusst. Es wurden jedoch auch Hinweise gefunden, daß die Beeinflussung auf der Ebene der Translation stattfindet^{82, 83}. Bei der Chlorophyllbiosynthese soll dies bei der Induktion von ALAS der Fall sein¹⁰. In Zellkulturen von Tabak ist die Beteiligung von Phytochrom fraglich, da von diesem absorbierbares Rotlicht im Gegensatz zu blauem oder

weißem Licht beim Ergrünen ziemlich wirkungslos bleibt²².

In das Schema ist noch ein Regelmechanismus eingezeichnet, der bei *Rhodospseudomonas spheroides*¹⁶ und im tierischen Organismus⁴ gefunden wurde. Häm reprimiert die Synthese von ALAS und hemmt gleichzeitig das Enzym aus Bakterien allosterisch. Wenn man nicht eine sehr wahrscheinlich äußerst kurze Lebensdauer von ALAS annehmen will, könnte der abrupte Synthesestopp bei Lichtabbruch in Mais ebenfalls mit einer allosterischen Hemmung gedeutet werden. Häm oder ein Mg-Porphyrin könnten sich in der Dunkelheit anreichern. Erste Versuche mit Metallkomplexbildnern vermochten im Dunkeln in Maispflänzchen den Synthesestopp nur ganz geringfügig zu beheben. In Tabakgeweben hemmt ALA selbst – in Analogie zu den Verhältnissen bei *Rhodospseudomonas* möglicherweise^{16, 84} nach Umwandlung in ein Porphyrin – Chlorophyllsynthese und Wachstum. Eventuell verhindert aktive ALAS in Wurzeln und Knollen durch ALA-Synthese ein schnelles Ergrünen dieser normalerweise nicht grünen Pflanzenteile im Licht. Eine weitere Regulation der Chlorophyllsynthese wäre durch ALAD über das Angebot von Mg⁺⁺-Ionen möglich³⁴.

Durch Lichtinduktion und das Zusammenspiel der verschiedenen Syntheseketten bildet sich endlich Protochlorophyllidholochrom, das durch Protochlorophyllid als Photoakzeptor in Chlorophyllidholochrom übergeführt wird. Im weiteren Verlauf der Synthese bildete sich dann der Chlorophyll-Protein-Lipid-Komplex der Thylakoide.

Alle Beobachtungen und Effekte können als Ausdruck einer Einwirkung von Licht auf verschiedene Zustände eines Entwicklungsablaufes gesehen werden, der im Dunkeln endogen auf unterschiedlichem Niveau unterbrochen ist. Genauere Kenntnis und weitere Aufschlüsselung der Vorgänge bei der Lichtinduktion der Chlorophyllsynthese mögen Änderungen im vorgestellten Modell bedingen, doch im Augenblick können alle Beobachtungen zu diesem Problem zwangslos mit diesem Modell beschrieben werden.

Fraülein HANNA WOTHKE danke ich für sorgfältige technische Mitarbeit.

¹ J. T. O. KIRK u. R. A. E. TILNEY-BASSETT, *The Plastids*, W. H. Freeman, London 1967.

² J. H. C. SMITH, *Comparative Biochemistry of Photo-reactive Systems* (M. B. Allen) p. 257, Acad. Press, New York u. London 1960.

³ S. R. FRANK, *J. gen. Physiol.* **29**, 157 [1946].

⁴ S. GRANICK, *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. II (T. W. Goodwin) Acad. Press, London u. New York 1967.

⁵ S. GRANICK, *Plant Physiol.* **34**, XVIII [1959].

⁶ M. GASSMAN u. L. BOGORAD, *Plant Physiol.* **42**, 774 [1967].

⁷ M. GASSMAN u. L. BOGORAD, *Plant Physiol.* **42**, 781 [1967].

- ⁸ M. M. MARGULIES, *Plant Physiol.* **42**, 218 [1967].
- ⁹ L. BOGORAD u. A. JAKOBSON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 113 [1964].
- ¹⁰ K. NADLER u. S. GRANICK, *Plant Physiol.* **46**, 240 [1970].
- ¹¹ J. T. O. KIRK u. R. L. ALLEN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 523 [1965].
- ¹² J. T. O. KIRK, *Planta* **78**, 200 [1968].
- ¹³ J. L. MEGO u. A. T. JAGENDORF, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **53**, 237 [1961].
- ¹⁴ M. J. BULL u. J. LASCELLES, *Biochem. J.* **87**, 15 [1963].
- ¹⁵ E. D. GRAY, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **138**, 550 [1967].
- ¹⁶ J. LASCELLES, *Porphyrins and Related Compounds*, p. 49, *Biochem. Soc. Symp. Nr. 28.*, (T. W. Goodwin) Acad. Press, London u. New York 1968.
- ¹⁷ R. B. WITHROW, J. B. WOLFF u. L. PRICE, *Plant Physiol.* **31**, XIII [1956].
- ¹⁸ K. MITRAKOS, *Physiol. Plantarum* [Copenhagen] **14**, 497 [1961].
- ¹⁹ L. PRICE u. W. H. KLEIN, *Plant Physiol.* **36**, 733 [1961].
- ²⁰ I. H. VIRGIN, *Physiol. Plantarum* [Copenhagen] **14**, 439 [1961].
- ²¹ E. G. SISLER u. W. H. KLEIN, *Physiol. Plantarum* [Copenhagen] **16**, 315 [1963].
- ²² L. BERGMANN u. CH. BERGER, *Planta* **69**, 58 [1966].
- ²³ HJ. A. W. SCHNEIDER, *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, 133 [1970].
- ²⁴ HJ. A. W. SCHNEIDER, *Phytochemistry* **10**, 319 [1971].
- ²⁵ HJ. A. W. SCHNEIDER, im Druck.
- ²⁶ B. F. BURNHAM u. J. LASCELLES, *Biochem. J.* **87**, 462 [1963].
- ²⁷ J. LASCELLES, *Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation*, W. A. Benjamin, New York 1964.
- ²⁸ K. GOTO, M. HIGUCHI, H. SAKAI u. S. KIKUCHI, *J. Biochemistry* [Tokyo] **61**, 186 [1967].
- ²⁹ R. J. PORRA u. E. A. IRVING, *Arch. Biochem. Biophysics* **148**, 37 [1972].
- ³⁰ J. MARRIOTT, *Porphyrins and Related Compounds*, p. 61, *Biochem. Soc. Symp. Nr. 28* (T. W. Goodwin) Acad. Press, London u. New York 1968.
- ³¹ J. MARRIOTT, A. NEUBERGER u. S. H. TAIT, *Biochem. J.* **117**, 609 [1970].
- ³² G. R. WARNICK u. B. F. BURNHAM, *J. biol. Chemistry* **246**, 6880 [1971].
- ³³ E. F. CARELL u. J. S. KAHN, *Arch. Biochem. Biophysics* **108**, 1 [1964].
- ³⁴ HJ. A. W. SCHNEIDER, *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, 328 [1970].
- ³⁵ C. A. REBEIZ, M. A. HAIDAR, M. YAGHI u. P. A. CASTELFRANKO, *Plant Physiol.* **46**, 543 [1970].
- ³⁶ HJ. A. W. SCHNEIDER, *Z. Naturforsch.* **26b**, 908 [1971].
- ³⁷ F. A. WELLBURN u. A. R. WELLBURN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 747 [1971].
- ³⁸ D. L. NANDI u. E. R. WEYGOOD, *Canad. J. Biochem.* **43**, 1605 [1965].
- ³⁹ J. T. O. KIRK u. N. A. PYLIOTIS, *Z. Pflanzenphysiol.* **66**, 325 [1972].
- ⁴⁰ S. KAUFMANN u. S. G. A. ALIVISATOS, *J. biol. Chemistry* **216**, 141, 153 [1955].
- ⁴¹ J. M. PALMER u. R. T. WEDDING, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **113**, 167 [1966].
- ⁴² E. A. WIDER DE XIFRA, A. M. DEL C. BATLLE u. H. A. TIGIER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **235**, 511 [1971].
- ⁴³ D. L. NANDI u. E. R. WEYGOOD, *Canad. J. Biochem.* **45**, 327 [1967].
- ⁴⁴ H. A. TIGIER, A. M. DEL C. BATLLE u. G. LOCASICO, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **151**, 300 [1968].
- ⁴⁵ A. S. SHETTY u. G. W. MILLER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **185**, 458 [1969].
- ⁴⁶ A. S. SHETTY u. G. W. MILLER, *Biochem. J.* **114**, 331 [1969].
- ⁴⁷ L. BOGORAD, *Methods in Enzymology*, Vol. V, p. 885 (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan) Acad. Press, New York 1962.
- ⁴⁸ E. STEVENS u. B. FRYDMAN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **151**, 429 [1968].
- ⁴⁹ E. STEVENS, R. B. FRYDMAN u. B. FRYDMAN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **158**, 496 [1968].
- ⁵⁰ J. PLUSCEC u. L. BOGORAD, *Biochemistry* **9**, 4736 [1970].
- ⁵¹ E. B. C. LLAMBIAS u. A. M. DEL C. BATLLE, *Biochem. J.* **121**, 327 [1971].
- ⁵² U. DETERMANN, *Gelchromatographie*, S. 61, Springer, Berlin [1967].
- ⁵³ S. KAUFMANN, *Methods in Enzymology*, Vol. I, p. 719, (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan) Acad. Press, New York 1955.
- ⁵⁴ F. LIPMANN u. L. C. TUTTLE, *J. biol. Chemistry* **158**, 505 [1945].
- ⁵⁵ S. SÜZER u. K. SAUER, *Plant Physiol.* **48**, 60 [1971].
- ⁵⁶ D. L. NANDI u. D. SHERIN, *J. biol. Chemistry* **243**, 1236 [1968].
- ⁵⁷ H. YAMASAKI u. T. MORIYAMA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 790 [1970].
- ⁵⁸ S. I. BEALE, *Plant Physiol.* **45**, 504 [1970].
- ⁵⁹ S. I. BEALE, *Plant Physiol.* **48**, 316 [1971].
- ⁶⁰ Y. K. HO u. J. LASCELLES, *Arch. Biochem. Biophysics* **144**, 734 [1971].
- ⁶¹ G. URATA u. S. GRANICK, *J. biol. Chemistry* **238**, 811 [1963].
- ⁶² D. MAUZERALL u. S. GRANICK, *J. biol. Chemistry* **219**, 435 [1956].
- ⁶³ K. TÄUFEL u. H. THALER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **212**, 256 [1932].
- ⁶⁴ C. RIMINGTON, zitiert nach J. E. Falk, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam 1964.
- ⁶⁵ W. H. ELLIOTT, *Biochem. J.* **74**, 90 [1960].
- ⁶⁶ C. PASSERA, A. PEDROTTI u. G. FERRARI, *J. Chromatogr.* [Amsterdam] **14**, 289 [1964].
- ⁶⁷ H. J. PETROWITZ u. G. PASTUSKA, *J. Chromatogr.* [Amsterdam] **7**, 128 [1962].
- ⁶⁸ L. SCHUSTER, *Biochem. J.* **64**, 101 [1956].
- ⁶⁹ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 [1951].
- ⁷⁰ G. H. COOKSON u. C. RIMINGTON, *Biochem. J.* **57**, 476 [1954].
- ⁷¹ R. MONTGOMERY u. L. F. WIGGINS, *J. Soc. chem. Ind.* **66**, 31 [1947].
- ⁷² J. W. MILLER u. D. TENG, *Proc. Intern. Congr. Biochem.* p. 1059 Tokio [1967].
- ⁷³ M. GASSMAN, J. PLUSCEC u. L. BOGORAD, *Plant Physiol.* **43**, 1411 [1968].
- ⁷⁴ J. B. PRICE u. L. PRICE, *J. biol. Chemistry* **235**, 1603 [1960].
- ⁷⁵ Y. EILAM u. S. KLEIN, *J. Cell. Biol.* **14**, 169 [1962].
- ⁷⁶ I. H. VIRGIN, *Physiol. Plantarum* **16**, 445 [1955].
- ⁷⁷ M. V. KOSKI, *Arch. Biochemistry* **29**, 339 [1950].
- ⁷⁸ J. B. WOLFF u. L. PRICE, *Arch. Biochem. Biophysics* **72**, 293 [1957].
- ⁷⁹ F. JAKOBS u. J. MONOD, *J. molecular Biol.* **3**, 318 [1961].
- ⁸⁰ W. L. BUTLER, S. B. HENDRICKS u. H. W. SIEGELMANN, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* p. 197, (T. W. Goodwin) Acad. Press, London 1965.

- ⁸¹ S. B. HENDRICKS u. H. A. BORTHWICK, Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, p. 405, (T. W. Goodwin) Acad. Press 1965.
- ⁸² J. BRACHET, Biology of Acetabularia, p. 281, (J. Brachet u. Bonotto) Acad. Press, New York, London 1970.
- ⁸³ A. S. SPIRIN, Current topics in developmental biology, Vol. I, p. 2, (A. A. Moscona u. A. Monroy) Acad. Press, New York, London 1966.
- ⁸⁴ D. SHEMIN, G. KIKUCHI u. T. ABRANSKY, Les maladies du métabolisme des porphyrines. p. 173, Presse Universitaires de France, Paris 1963.
- ⁸⁵ B. T. STEER u. M. GIBBS, Plant Physiol. 44, 771 [1969].

Abkürzungen: AA, Aminoaceton; ALA, δ -Aminolävulinat; AAP, 2,4-Dimethyl-3-acetylpyrrol (AA-Pyrrol); ALAP, 2-Methyl-3-acetylpyrrol-4-propionsäure (ALA-

Pyrrol); PBG, Porphobilinogen; Urogen, Uroporphyrinogen; LA, Lävulinat; ME, Merkaptoäthanol.

DC, Dünnschichtchromatographie; EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure; FG, Frischgewicht; TG, Trockengewicht.

SCoA, Succinyl-Coenzym A; SCoAS, Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.5); ALAS, δ -Aminolävulinatsynthetase; ALAD, δ -Aminolävulinatdehydrase; SCoATK, SCoA-Thiokinase (EC 4.2.1.24); PBGA, Porphobilinogenase, Porphobilinogendeaminase/Uroporphyrinogen-III-Cosynthetase.

Die Bezeichnung Proplastid wird stets für nicht differenzierte Plastidenvorstufen gebraucht. Mit Etioplasten werden Plastidenstadien bezeichnet, die einen Prolamellarkörper besitzen.