

kleinen Kugeln vorhanden. Der hyaline Zellkern ist fast immer zu erkennen (Abbildung). Untersucht man dagegen die Samenschalen später als 32 Stunden vom Beginn der Quellung ab oder erst nach dem Hervortreten der Wurzelspitze, so fällt folgender Unterschied zu den bis 32 Stunden gequollenen auf: die den Wurzelpol der Schale bildenden Zellen sind jetzt bedeutend größer geworden, die Zellwände viel dünner, die Reservestoffe sind ganz oder fast ganz verschwunden (Abbildung). Die so veränderte Zone liegt stets am Wurzelpol der Schale und ist 13–17 Zellen hoch. Die zahlreichen Zellen der ganzen übrigen Schale dagegen haben noch dasselbe Aussehen wie früher. Erst auf etwas späteren Keimungsstadien vergrößern sie sich unter gleichzeitiger Verdünnung ihrer Wände ebenfalls. Auch die Reservestoffe sind in der Form, in welcher sie vorher vorhanden waren, nicht mehr erkennbar. Dafür liegen in diesen Zellen jetzt ein, manchmal zwei große ölige Tropfen.

Man hat zunächst den Eindruck, die Zellen des Wurzelpols seien abgestorben. Genauere Beobachtung ergibt aber, daß auch jetzt noch ein lebender Zellkern vorhanden ist. Die Zellen sind gut plasmolysierbar. Plasmolyse und Deplasmolyse lassen sich dreimal hintereinander wiederholen, ohne daß eine sichtbare Schädigung des Plasmas eintritt. Die Zellen sind sehr widerstandsfähig. Man kann die isolierten Schalen in diesem Stadium mindestens 3 Tage lang in einem Tropfen Leitungswasser mit Deckglas bedeckt aufbewahren; sie zeigen danach noch normale Plasmolyse, während die zahlreichen übrigen Zellen bereits abgestorben sind. Dieser erst kurz vor der Keimung auftretende Gradient, welcher in der plötzlich einsetzenden Aktivität einer kleinen Gruppe von bestimmt gelegenen Zellen der fertig ausgebildeten Samenschale besteht, ist bemerkenswert.

Für einen Keimling ist es lebensnotwendig, daß zuerst die Wurzel aus der Samenschale austritt. Sie befestigt den Keimling im Boden und führt ihm Wasser und anorganische Nährstoffe zu, ohne welche er rasch zugrunde gehen würde. Es scheint uns so – im Hinblick auf den Nutzen – verständlich, daß während der Keimung die Wurzel zuerst erscheint (nur wenige Pflanzen sind bekannt, bei welchen zuerst die Kotyledonen die Samenschale durchbrechen<sup>1</sup>). Vom entwicklungsphysiologischen Standpunkt aus ist jedoch die Situation durchaus nicht klar. Sie wird im allgemeinen als selbstverständlich hingenommen. Auch wenn man die – bisher durch keine genaue Untersuchung gestützte – Annahme macht, daß die Keimung ausschließlich mit Wurzelwachstum beginnt, so hat dies, wenigstens bei geraden Embryonen, wie den vorliegenden, nicht automatisch zur Folge, daß die Wurzel zuerst die Samenschale durchbricht. Der mit einsetzendem Wurzelwachstum entstehende Druck wird sich auf die beiden gegenüberliegenden Enden der Schale auswirken müssen. Welches Ende zuerst durchstoßen wird, hängt bei gleich festem Bau der beiden Schalenpole davon ab, ob der Scheitel der Kotyledonen oder derjenige der Wurzel spitzer ist. Sind aber erhebliche Unterschiede in der Festigkeit der Samenschale zwischen Keimblattpol und Wurzelpol gegeben, so wird derjenige Teil des Embryos als erster durchbrechen, welcher auf den geringsten Widerstand trifft, gleichgültig, ob der Keimungsbeginn auf Wurzelwachstum, Hypokotylwachstum, Kotyledonenwachstum oder auf dem gleichzeitig einsetzenden Wachstum aller drei Organe beruht.

Durch die Verdünnung der Wände wird die Festigkeit des Zellverbandes herabgesetzt, durch das Wachstum der Zellverband ausgeweitet. Beide Vorgänge, welche

kurz vor der Keimung einsetzen, müssen das Austreten der Wurzelspitze vor den Kotyledonen stark begünstigen. (In gleichem Sinne wirkt wohl auch eine durch Gewebespannung herbeigeführte Spreizung der Kotyledonen, welche nur in frühen Keimungsstadien vorhanden ist.)

Dies scheint mir die einzig mögliche Bedeutung des eigenartigen Gradienten zu sein. Die Samenschale hätte im vorliegenden Fall auf Grund der Befunde und der obigen Auseinandersetzungen nicht nur Schutzfunktion, sondern sie würde durch den Gradienten das Hervortreten der Wurzel vor den Keimblättern bedingen. Der Keimungsvorgang bei *Crepis capillaris* schließt sich an jene von KLEBS<sup>1</sup> erwähnten, allerdings nicht häufigen Fälle an, in welchen sich die Keimung durch präformierte (anatomisch – vor allem in zeitlicher Hinsicht – nicht genauer untersuchte) Rißstellen oder unter Abspaltung eines Deckels vollzieht (KLEBS hat nicht in Betracht gezogen, daß die präformierten Stellen gleichzeitig das Hervortreten der Keimblätter verhindern könnten). Eine Frage (unter verschiedenen andern) bleibt: weshalb der Gradient erst kurz vor der Keimung gebildet wird. Bei der Untersuchung anderer *Crepis*arten und verschiedener anderer Compositen wurden zum Teil ganz analoge Verhältnisse gefunden. Es fehlen aber auch nicht Fälle, in welchen die Differenzierung bereits in der fertig ausgebildeten Samenschale vollzogen ist, andere, in welchen sie überhaupt nicht stattfindet.

Die mit Unterstützung der Freien akademischen Stiftung ausgeführten Untersuchungen werden fortgesetzt.

E. HEITZ

Botanische Anstalt der Universität Basel, den 19. September 1948.

#### Summary

In the seed-coat of *Crepis capillaris* a gradient is formed shortly before the germination. It consists in the growth of all the cells in a small, sharply delimited area at the end around the root-tip. This process takes place under a decrease of the thickness of the walls and a consumption of the reserve materials of the cells. The rest of the cells in the shell, which can not be distinguished from the cells of the pole during and after the swelling, remain at the same time unchanged. It is supposed that the gradient causes the germination of the root prior to the cotyledones. The investigations are being continued.

<sup>1</sup> G. KLEBS, l. c.

### Mitochondrien und Citrullinsynthese in der Leber

Wir haben kürzlich Versuche über die Citrullinbildung in Fermentpräparaten mitgeteilt, die aus Leberhomogenaten nach der Methode von COHEN und HAYANO<sup>1</sup> durch mehrfaches Zentrifugieren und Auswaschen mit isotonischer KCl-Lösung hergestellt wurden (Verh. Schweiz. Vereins Physiol. Pharmakol., Bern, 3. Juli 1948<sup>2</sup>). Es zeigte sich, daß im Verlauf mehrerer Auswaschungen mit der KCl-Lösung die Fähigkeit zur Citrullinsynthese aus Ornithin, Glutaminsäure und Ammoniumsalz beständig abnimmt, währenddem das Fermentpräparat auch nach wiederholtem Auswaschen kaum eine Verminderung der Aktivität erkennen läßt, wenn die Glutaminsäure und das Ammoniumsalz durch Glutamin ersetzt wird. Wir versuchten darauf, unser Präparat weiter zu «reinigen», d. h.

<sup>1</sup> P. P. COHEN und M. HAYANO, J. Biol. Chem. 172, 405 (1948).

<sup>2</sup> F. LEUTHARDT, A. F. MÜLLER und H. NIELSEN, Helv. physiol. acta, im Druck.

<sup>1</sup> G. KLEBS, Beiträge zur Morphologie und Biologie der Keimung (Untersuchungen aus dem Botanischen Institut zu Tübingen, 1883).

zu einer möglichst gut definierten homogenen Suspension der aktiven Fermente zu gelangen. Durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei 1500 g kann das aktive Material aus dem in isotonischer KCl-Lösung bereiteten Homogenat vollständig sedimentiert werden. Wir vermuteten, daß das Sediment die Mitochondrien enthält und daß diese Elemente an der untersuchten Synthese beteiligt seien. Es ist uns der Nachweis gelungen, daß die Citrullinsynthese aus Ornithin tatsächlich durch die Mitochondrien der Leberzelle bewerkstelligt wird.

Die Mitochondrien der Leber sind von HOGEBOM, SCHNEIDER und PALLADE<sup>1</sup> isoliert worden. Die hauptsächlichste Schwierigkeit, die sich ihrer Abtrennung von den übrigen Zellbestandteilen entgegenstellt, liegt in ihrer Agglutination durch Elektrolytlösungen. Die genannten Autoren sind durch Verwendung einer 0,88-Mol-Saccharoselösung zum Ziel gelangt. In der Rohrzuckerlösung verkleben die Mitochondrien nicht, sondern sie bleiben isoliert und behalten ihre ursprüngliche Form bei. (Die schädliche Wirkung von NaCl-Lösungen auf das Chondriom von Pflanzenzellen war schon GUILLIERMOND<sup>2</sup> bekannt, der für die intravitale Beobachtung der Mitochondrien bereits die Verwendung einer 7,5-10%-Lösung von Rohrzucker empfahl.) Für unsere Zwecke erwies sich die Verwendung von Rohrzucker als ungeeignet. Saccharose gibt bei der Citrullinbestimmung nach der Methode von GORNALL und HUNTER-ARCHIBALD<sup>3</sup> eine unspezifische Gelbfärbung, welche die kolorimetrische Bestimmung verunmöglicht. Es mußte daher eine Waschflüssigkeit gesucht werden, die diesen Nachteil nicht zeigt. Wir fanden, daß Mannit sich zum Auswaschen eignet und bei der Citrullinbestimmung nicht stört. Wir sind daher folgendermaßen vorgegangen (die ganze Aufarbeitung erfolgt bei 0°):

20 cm<sup>3</sup> eines auf die übliche Weise im Apparat von POTTER und ELVEHJEM<sup>4</sup> unter Eiskühlung in isotonischer KCl-Lösung bereiteten 25%-Leberhomogenats (Ratte) wurden 10 Minuten in der Kältezentrifuge bei 1500 g zentrifugiert und das Überstehende verworfen. Der Rückstand wurde im halben ursprünglichen Volumen 5,75%iger Mannitlösung aufgenommen, nochmals 10 Minuten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und das gelblich klare Überstehende abermals verworfen. Der Rückstand wurde erneut in etwa 6 cm<sup>3</sup> Mannit aufgenommen und 3-5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Es hat nun eine Trennung der festen Bestandteile stattgefunden: der gut absitzende Rückstand, der die Erythrozyten, intakte Zellen, die Kerne der Leberzellen enthält, ist hellrot gefärbt; das Überstehende stellt eine milchige homogene Suspension dar. Wird der Rückstand noch 2-3mal während je 1 Minute mit der Mannitlösung gewaschen, so ist er völlig inaktiv. Die gesamte Aktivität befindet sich in der überstehenden weißen Suspension, die pro mg N gegenüber dem ursprünglichen Präparat eine bedeutend gesteigerte Citrullinbildung zeigt.

Die histologische Untersuchung läßt erkennen, daß die Suspension aus Körperchen verschiedenen Durchmessers, von der Grenze der Auflösbarkeit bis etwa 2  $\mu$ , besteht; die sich mit Janusgrün anfärben lassen. Es wird allgemein angenommen, daß Janusgrün sich elektiv auf den Mitochondrien fixiert. Die isolierten Granula nehmen nach Behandlung mit einer 0,05%<sub>00</sub>-Lösung von Janusgrün während 20-30 Minuten den Farbstoff auf wie in der intakten Leberzelle. Durch Anilinsäurefuchsin nach ALTMANN färben sie sich nach vorheriger Fixierung in 2%-Osmiumsäure (nach HOGEBOM und Mitarbeiter<sup>1</sup> 1 Vol. 4% OsO<sub>4</sub> + 1 Vol. Suspension, 24 Stunden im Eis-

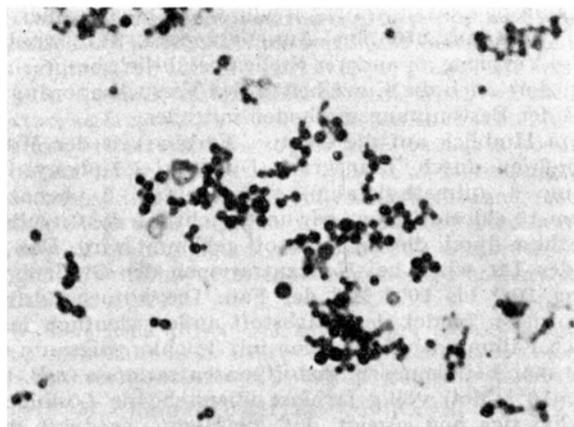


Abb. 1. Ausstrich der aktiven Suspension. Vergr. 1500mal. Osmiumfixierung. Färbung mit Anilinsäurefuchsin nach ALTMANN.

schränk) leuchtend rotviolett (siehe Abb. 1). Es handelt sich also ohne Zweifel um Mitochondrien. Die Ausstriche der aktiven Präparate zeigen, daß eine annähernd reine Suspension von Mitochondrien vorliegt, mit ganz vereinzelt Erythrozyten und Leberzellkernen. Der inaktive Rückstand dagegen setzt sich vornehmlich aus Zelltrümmern, Leberzellkernen, Erythrozyten und mit wenig zahlreichen Mitochondrien zusammen. Wir sind also berechtigt, anzunehmen, daß die Citrullinsynthese in der Leberzelle im Chondriom lokalisiert ist. Es ist wenig wahrscheinlich, daß mitgeschleppte Mikrosomen bei der Synthese eine Rolle spielen.

Die Verfolgung der Citrullinsynthese in diesen Präparaten bei Gegenwart von Glutaminsäure und Ammoniak oder von Glutamin mit und ohne Zusatz von Ammoniak ergab genau die gleichen Resultate wie unsere früheren Untersuchungen mit den Suspensionen, die durch Auswaschen mit isotonischer KCl-Lösung gewonnen waren<sup>1</sup>. Wir teilen als Beleg die Kurven in Abb. 2 mit, aus denen erneut die Tatsache hervorgeht, daß unter gewissen Be-

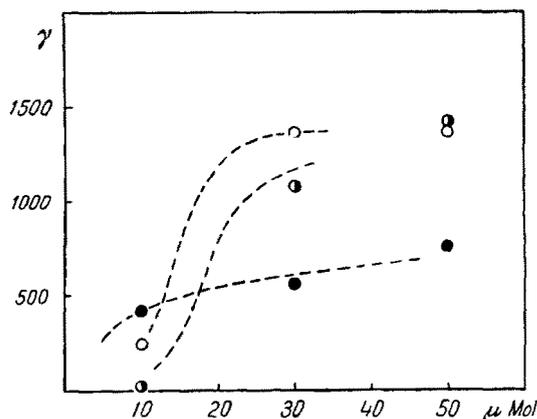


Abb. 2. Citrullinsynthese durch Mitochondriensuspension. Alle Ansätze (Gesamtvol. 3 cm<sup>3</sup>) enthalten Ornithin (0,0033 Mol), NaHCO<sub>3</sub> (0,0135 Mol); Adenosintriphosphat 0,001 Mol; MgSO<sub>4</sub> 0,01 Mol; 0,3 cm<sup>3</sup> Fermentsuspension (=0,85 mg N). Gasatmosphäre: Sauerstoff + 5 Vol. % CO<sub>2</sub>. Versuchsdauer 30 Minuten. Temperatur 38°. Abszisse: Konzentration der Glutaminsäure oder des Glutamins in  $\mu$ Mol pro Ansatz. Ordinate: Citrullinbildung in  $\gamma$ . ● Glutaminsäure + NH<sub>4</sub>Cl (0,0067 Mol bzw. 0,0033 Mol bei der kleinsten Glutaminsäurekonzentration). ● Glutamin ohne Zusatz. ○ Glutamin + NH<sub>4</sub>Cl (Konzentration wie bei Glutaminsäure).

<sup>1</sup> G. H. HOGEBOM, W. C. SCHNEIDER und G. E. PALLADE, J. Biol. Chem. 172, 619 (1948).

<sup>2</sup> M. A. GUILLIERMOND, Rev. gén. de Bot. 31, 372 (1919).

<sup>3</sup> A. G. GORNALL und A. HUNTER, Biochem. J. 35, 650 (1941). - R. M. ARCHIBALD, J. Biol. Chem. 156, 121 (1944).

<sup>4</sup> V. R. POTTER und C. A. ELVEHJEM, J. Biol. Chem. 114, 495 (1936).

<sup>1</sup> F. LEUTHARDT, A. F. MÜLLER und H. NIELSEN, Helv. physiol. acta, im Druck.

dingungen Glutamin als Citrullinbildner wirksamer ist als Glutaminsäure plus Ammoniumsalz. Wir werden diese Versuche an anderer Stelle ausführlich besprechen und dort auch die Einzelheiten der Versuchsanordnung und der Bestimmungsmethoden mitteilen.

Im Hinblick auf die elektive Färbbarkeit der Mitochondrien durch Janusgrün (Dimethyl-2,7-phenyl-10-amino-3-[(dimethylamino)-4'-benzolazo]-6-phenazonium-10-chlorid) haben wir untersucht, ob die Citrullinsynthese durch diesen Farbstoff gehemmt wird. Das ist in der Tat schon bei Konzentrationen der Größenordnung  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  Mol der Fall. Die Mitochondrien-suspension bindet den Farbstoff außerordentlich fest. Nach Fällung der Suspension mit Trichloressigsäure erhält man bei kleinen Farbstoffkonzentrationen (z. B. bis  $1,6 \cdot 10^{-5}$  Mol) völlig farblose überstehende Lösungen. Es hat sich nun gezeigt, daß die Hemmung durch den Farbstoff praktisch vollständig ist, wenn man so viel Janusgrün zusetzt, daß man nach der Fällung der Suspension durch Trichloressigsäure gerade eine schwachgefärbte überstehende Lösung erhält. Man kann annehmen, daß in diesem Fall die Mitochondrien mit dem Farbstoff «gesättigt» sind. Mit abnehmender Konzentration des Farbstoffs nimmt auch die Hemmung ab. Man erhält, wenn man die Aktivität des Systems gegen den Logarithmus der Farbstoffkonzentration aufträgt, die Kurven in Abb. 3, die den typischen S-förmigen Verlauf von Dissoziationskurven erkennen lassen. Wenn man die Aktivität des Ferments als Maß für den «Sättigungsgrad» der Mitochondrien mit dem Farbstoff annimmt, kann man aus diesen Kurven ablesen, daß die Mitochondrien bei einer Konzentration des Janusgrüns von etwa  $5 \cdot 10^{-6}$  Mol zur Hälfte «gesättigt» sind. Wir betrachten das Parallelgehen von Fermenthemmung und elektiver Farbstoffbindung durch die Mitochondrien als weitere Stütze für unsere Annahme, daß die Synthese in den Mitochondrien stattfindet. Die Kurven zeigen, daß die Synthese im glutaminsäurehaltigen System stärker gehemmt wird als im glutaminhaltigen. Auch in dieser Tatsache spiegelt sich eine gewisse Überlegenheit des Glutamins als Citrullinbildner. Über die Wirkungsart des Janusgrüns können wir nichts aussagen.

Unsere Versuche weisen erneut auf die große Bedeutung der Mitochondrien für die chemischen Umsetzun-

gen in der Zelle hin. SCHNEIDER<sup>1</sup> und HOGEBOOM und Mitarbeiter<sup>2,3</sup> haben nachgewiesen, daß wichtige Respirationsfermente, Succinoxidase und Zytochromoxydase, in den Mitochondrien angehäuft sind. Es scheint, daß die gesamte Succinoxidase der Leberzelle sich in den Mitochondrien vorfindet<sup>2</sup>. Die Darstellungsmethode von GREEN, LOOMIS und AUERBACH<sup>4</sup> für die «Zyklophorase» aus Niere, das Fermentsystem, welches Pyruvat nach dem Tricarbonsäurezyklus oxydiert, läßt vermuten, daß auch dieses System Mitochondrien als wesentlichen Bestandteil enthält. Neuerdings teilen auch LEHNINGER und KENNEDY<sup>5</sup> Beobachtungen mit, die darauf schließen lassen, daß die Fermente der Fettsäureoxydation ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert sind.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe der Fritz-Hoffmann-La-Roché-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ausgeführt, der wir unseren besten Dank aussprechen.

F. LEUTHARDT und A. F. MÜLLER

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich, den 22. September 1948.

### Summary

By differential centrifugation of rat-liver homogenates prepared in isotonic solutions of mannitol it is possible to obtain mitochondria in suspensions that are apparently free from other cellular components. Our preparation contains all of the enzymes responsible for the conversion of ornithine to citrulline with glutamic acid and ammonium or glutamine. The synthesis is strongly inhibited by Janus green, which is a specific vital stain for mitochondria.

<sup>1</sup> W. C. SCHNEIDER, J. Biol. Chem. 165, 585 (1946).

<sup>2</sup> G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER und G. E. PALLADE, J. Biol. Chem. 172, 619 (1948).

<sup>3</sup> G. H. HOGEBOOM, A. CLAUDE und R. D. HOTCHKISS, J. Biol. Chem. 165, 615 (1946).

<sup>4</sup> D. E. GREEN, W. F. LOOMIS und V. H. AUERBACH, J. Biol. Chem. 172, 389 (1948).

<sup>5</sup> A. L. LEHNINGER und E. P. KENNEDY, Fed. Proc. 7, 166 (1948).

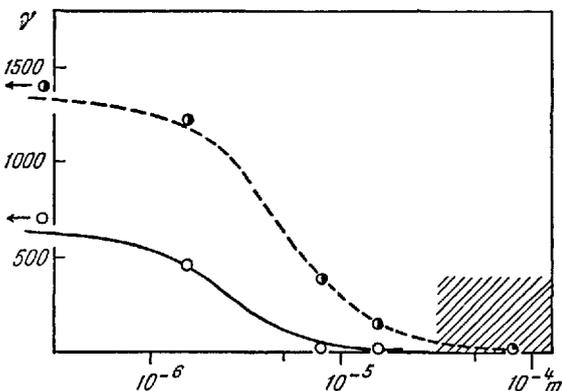


Abb. 3. Hemmung der Citrullinsynthese durch Janusgrün. (Versuchsbedingungen siehe Abb. 2). Glutaminsäure, Glutamin: 50  $\mu$ Mol pro Ansatz. Abszisse: Konzentration des Farbstoffes in  $\mu$ Mol/cm<sup>3</sup>. Ordinate: Citrullinbildung in  $\gamma$ . ○ Glutaminsäure + NH<sub>4</sub>Cl. ● Glutamin ohne Zusatz. Die Punkte links außen geben die Citrullinbildung ohne Farbstoffzusatz. Die schraffierte Fläche bezeichnet den Konzentrationsbereich des Farbstoffs, in welchem die überstehende Lösung nach Fällung der Suspension mit Trichloressigsäure gefärbt erscheint, in welchem also die Mitochondrien nicht mehr allen Farbstoff zu binden vermögen.

### On the Zoological Specificity of Myosin and Actin

The possibility of union of SZENT-GYÖRGYI's myosin and actin (formation of actomyosin<sup>1</sup>), taken from different zoological species<sup>2</sup>, is examined. The present research was done to investigate the zoological specificity of proteins extracted from muscles.

The possibility of combining myosin and actin extracted from different muscles of the same animal had already been demonstrated by RÓZSA's<sup>3</sup> researches. In preliminary researches we united myosin with actin, the latter was stored for more than three weeks in a refrigerator after treatment with acetone and after drying. We extracted also WEBER and EDSALL's myosin (SZENT-GYÖRGYI's actomyosin) from the muscles of *Palinurus vulgaris* L. and from the foot of *Helix pomatia* L. *Helix's* actomyosin was not completely free from mucus. These actomyosins may both be pulled in threads, following WEBER's method<sup>4</sup>. With addition of adenosine triphos-

<sup>1</sup> According to SZENT-GYÖRGYI actomyosin is formed through the union of myosin and actin: A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of muscular contraction* (Academic Press, New York, 1947).

<sup>2</sup> The chemical compositions of the actomyosins of different zoological species are reported in: K. BAILEY, Adv. in Prot. Chem. 1, 289 (1944).

<sup>3</sup> R. RÓZSA, unpublished, quoted after SZENT-GYÖRGYI (1947).

<sup>4</sup> H. H. WEBER, Naturwiss. 27, 33 (1939).