



Doctoral Thesis

Subzelluläre Organisation des Inulinstoffwechsels in *Helianthus tuberosus* L.

Author(s):

Frehner-Auletta, Marco

Publication Date:

1985

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000361735> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 7912

SUBZELLULAERE ORGANISATION DES INULINSTOFFWECHSELS IN
HELIANTHUS TUBEROSUS L.

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
Marco Frehner-Auletta
Dipl. Natw. ETH Zürich
geboren am 16. März 1958
von Urnäsch AR

Angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. Ph. Matile, Referent
Prof. Dr. A. Wiemken, Korreferent

1985

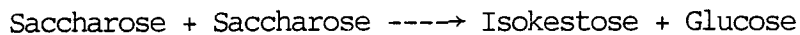
ZUSAMMENFASSUNG

Inulin ist ein lineares, aus Fructoseeinheiten aufgebautes Polysaccharid mit einer endständigen Glucose, das zur Gruppe der Fructane gehört. Diese finden sich in höheren Pflanzen bei Vertretern von Dicotylen (z.B. Compositae) sowie der Monocotylen (z.B. Gramineae). Edelman und Jefford (New Phytol. 67, 517-531 (1968)) stellten ein hypothetisches Modell zur subzellulären Organisation des Inulinstoffwechsels in Speicherparenchymzellen von Topinambur auf. Dieses sieht in der Synthesephase die Lokalisation der Saccharose-Saccharose-Fructosyltransferase (SST) im Cytosol vor. Diese setzt zwei Saccharosemoleküle zu einem Trisaccharid (Isokestose) und einem Glucosemolekül um, das dort zu Saccharose rezykliert wird. Die am Tonoplasten plazierte Fructan-Fructan-Fructosyltransferase (FFT) trennt der extravakuolären Isokestose den endständigen Fructosylrest ab und transferiert ihn im Zellsaft auf ein wachsendes Inulinmolekül. Somit erklärt das Modell alle Inulinmoleküle ausser der Isokestose vollständig vakuolär. Bei Depolymerisation und Abbau hydrolysiert die membrangebundene Fructan-Exo-Hydrolase (FEH) das vakuoläre Inulin. Die dabei entstehende Fructose wird durch ein Transportenzym ins Cytosol gebracht, wo sie zu Saccharose umgesetzt wird.

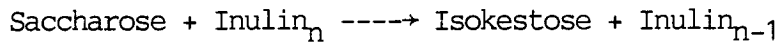
Zur Verifizierung bzw. Modifizierung dieses Modells des Inulinmetabolismus wurde eine direkte Analyse der Kompartimentierung in Protoplasten und Vakuolen aus Speicherparenchym von Topinambur vorgenommen. Die Mazerierung der Zellwände mit Zellulase und Pectinase von plasmolysierten parenchymatischen Gewebestücken setzte Protoplasten frei. Durch Filtration wurden sie von festen, und anschliessend durch wiederholte Sedimentation bei 1 * g in frischem Medium von löslichen Verunreinigungen befreit. Bei vorsichtiger Lyse der Plasmamembran wurden aus den Protoplasten intakte Vakuolen freigesetzt, welche in Stufengradienten aus Glycin-betain von den extravakuolären Bestandteilen abgetrennt wurden. Berechnet anhand der vakuolären Enzyme α -Mannosidase und β -N-Acetylglucosaminidase betrug die Ausbeute an Vakuolen von wachsenden Knollen etwa 30 % und von gelagerten Knollen ca. 50 %. Die Verunreinigung der Vakuolen betrug aufgrund der extravakuolären Marker wie Malatdehydrogenase und Alkoholdehydrogenase 3-5 % (gelagert) bzw. 36-39 % (wachsend).

Die Messung der SST- und FFT-Aktivitäten in Protoplasten- und Vakuolenfraktionen erfolgte in einem Mikroansatz mit Saccharose und Inulin

als Substrate und gaschromatographische Analyse der Produkte. Die SST-Aktivität wurde anhand der freigesetzten Glucose in der Reaktion



erfasst. Für die FFT-Aktivität wurde die Isokestose aus der Reaktion



gemessen, wobei um die Menge der Isokestose aus der SST-Reaktion korrigiert wurde.

Zur Messung der FEH-Aktivität wurde die aus Inulinsacchariden mit DP zwischen 5 und 12 freigesetzte Fructose enzymatisch bestimmt. Die Kompartimentierungsexperimente mit wachsenden (SST und FFT aktiv) und gelagerten (FFT und FEH aktiv) Knollen zeigten, dass alle drei Inulinenzyme SST, FFT und FEH wie auch die Inulinsaccharide ausschliesslich in den Vakuolen lokalisiert sind.

In der Synthesephase spielen Permeasen für den Transport von Saccharose aus dem Cytosol in den Zellsaft und von Glucose, einem Produkt der SST-Reaktion, aus dem Zellsaft ins Cytosol eine wichtige Rolle. Auch für die Phase der Depolymerisation und des Abbaus wurden Transportsysteme im Tonoplasten postuliert, welche das Abbauprodukt Fructose aus dem Zellsaft ins Cytosol der Saccharosesynthese zuführen. In Transportexperimenten mit Vakuolen aus gelagerten Knollen und ^{14}C -markierten Zuckern liessen sich zwei Transportsysteme, eines für Hexosen und ein zweites für Saccharose, unterscheiden. Die Glucoseaufnahme wurde durch einen Fructoseüberschuss gehemmt und umgekehrt, wogegen der Transport von Saccharose durch die Monosaccharide nicht beeinflusst wurde. Die Aufnahme von Saccharose in die Vakuolen wird durch ATP (nicht aber durch $\text{ADP} + \text{P}_i$) stimuliert. Die Monosaccharide zeigen keine solche Abhängigkeit von der Energetisierung durch ATP. Für das Saccharosesystem konnte keine Sättigung der Aufnahme im Bereich von 1-25 mM festgestellt werden. Selektivität hinsichtlich der transportierten Zucker und / oder die Energieabhängigkeit sind starke Hinweise auf die Existenz von mindestens zwei Zuckerpermeasen im Tonoplasten.

In Speicherparenchymzellen der Topinamburknolle stellt die Vakuole den Ort der Synthese, der Speicherung und des Abbaus des Inulins dar. Die Verbindung des Inulinmetabolismus mit dem extravakuolären Stoffwechsel wird über ein passives Monosaccharid- und ein aktives Saccharosetransportsystem bewerkstelligt.

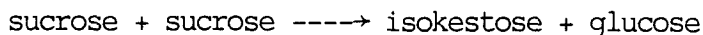
ABSTRACT

The subcellular organization of the inulin metabolism was investigated in tubers of Helianthus tuberosus L. Knowing the biochemistry of this metabolism, Edelman and Jefford (New Phytol. 67, 517-531 (1968)) put forward a hypothetical two-fold model of its subcellular compartmentation. Their model for biosynthesis: The key enzyme sucrose-sucrose-fructosyltransferase (SST), combining two sucrose molecules to form a trisaccharide (isokestose) and free glucose, was thought to be located in the cytosol. The fructan-fructan-fructosyltransferase (FFT) was positioned in the tonoplast, accepting a fructosyl residue from isokestose at the cytosolic surface, leaving sucrose there, and transferring the above residue onto a growing inulin molecule at the vacuolar surface. According to this hypothesis, all the inulin molecules, except for the trisaccharide, reside in the vacuole only. Their model for depolymerization and degradation: In this phase the SST has disappeared and a vacuolar fructan-exohydrolase (FEH) hydrolyses the inulin. The thereby released fructose enters the cytosol and is converted there to sucrose, which reenters the vacuole during depolymerization or is exported during inulin breakdown.

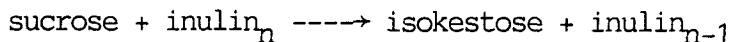
To test the above hypothesis, the subcellular compartmentation of fructan metabolism was determined by employing protoplasts and vacuoles which were prepared from growing and from resting tubers of H. tuberosus. Protoplasts were obtained by digesting the cell walls of plasmolysed pieces of tuber tissue in a medium containing cellulase and pectinase. Solid debris was eliminated by filtering the protoplast suspension; the soluble additives and impurities were washed out by repeated sedimentation at 1 * g and resuspension of the protoplasts in fresh medium. After gentle lysis of the protoplasts the central vacuoles were released intact and could be collected at the bottom of a gradient of glycine-betaine. As estimated by the vacuolar marker enzymes α -mannosidase and β -N-acetylglucosaminidase, about 30 % of the vacuoles from the protoplasts of growing tubers and 50 % of those from resting tubers could be recovered. A check of the purity of the vacuolar fraction from resting tubers revealed a contamination of 3 % and 5 % of malate-dehydrogenase and alcohol-dehydrogenase respectively; with respect to growing tubers the figures were 36 % and 39 %.

To determine the activities of SST and FFT, a microassay was deve-

loped using GLC for the quantitative analysis of their reaction-products. The assay contained sucrose and inulin as substrates for both enzymes. SST was monitored by the glucose formation in the reaction



and FFT by the trisaccharide in the reaction



after subtracting the amount of isokestose produced simultaneously by the SST. FEH activity was determined on inulin-saccharides with DP between 5 and 12 as a substrate and the fructose released was estimated enzymatically.

Vacuoles of growing tubers contained all the SST and FFT activities, and vacuoles of resting tubers contained all the FFT and FEH activities. The results of the carbohydrate analysis of vacuoles of both growing and resting tubers showed that all the inulin-saccharides, including the trisaccharide, were 100 % vacuolar.

In transport experiments with the vacuoles of resting tubers and ^{14}C -sugars, two different transport systems could be detected. One is a passive, monosaccharide system of facilitated diffusion, and the other is an active transport system for sucrose. The latter system can be stimulated by ATP but not by ADP + P_i . This and other results point to a possible identification of the sucrose transport as proton / sucrose antiport.

In view of these results, a new model of the subcellular organization of the metabolism of inulin is proposed: The vacuole is the compartment of its synthesis, storage and mobilization; the exchange of sugars between the inulin metabolism and the general metabolism of the cytosol is effected by a passive monosaccharide transport facility and an active sucrose one.