

Über die Hydrolyse von Adenosintriphosphat durch Enzyme in den festen Bestandteilen der Hefezelle.

(VII. Mitteilung über Phosphatasen der Hefe.¹)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und W. Weigert.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 3. Juli 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 16. Okt. 1952.)

Während bekannterweise weder Preßsäfte noch Autolysenextrakte aus Hefe Enzyme enthalten, welche die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) katalysieren können, zeigte vor einigen Jahren *Meyerhof*², daß die Hefe ein fest an den Zellresten verankertes Ferment besitzt, welches im Bereich um pH 9,0 zur hydrolytischen Spaltung von ATP befähigt ist. Es gelang durch Ultraschallbehandlung, das Enzym in Lösung zu bringen (*Meyerhof*³); in einem jüngst erschienenen Bericht von *Meyerhof* und *Ohlmeyer*⁴ werden die Eigenschaften des Fermentes eingehend beschrieben. Es handelt sich um eine „wahre“ ATPase, d. h. das Enzym spaltet nur einen Phosphatrest des ATP ab.

Es erschien uns nun von Interesse, zu prüfen, ob das von *Meyerhof* beschriebene Ferment mit alkalischem Wirkungsoptimum das einzige in den festen Zellbestandteilen verankerte Enzym der Hefe ist, welches zur ATP-Spaltung befähigt ist. Wir untersuchten deshalb eine Präparation von Hefezellresten, welche durch Einfrieren der Hefe mit flüssiger Luft und darauffolgendes Abzentrifugieren der aufgetauten Hefe hergestellt war, auf ihre Fähigkeit, ATP bei verschiedenen pH-Werten zu hydrolysieren. Wir konnten dabei feststellen, daß es außer der von *Meyerhof* beschriebenen ATPase mit Wirkungsoptimum bei pH 9,0

¹ VI. Mittlg.: *O. Hoffmann-Ostenhof, H. Moser und R. Ehrenreich*, Mh. Chem. **82**, 295 (1951).

² *O. Meyerhof*, J. biol. Chem. **157**, 105 (1945).

³ *O. Meyerhof*, *ibid.* **180**, 575 (1949).

⁴ *O. Meyerhof* und *P. Ohlmeyer*, *ibid.* **195**, 11 (1952).

noch zumindest ein zweites ähnlich wirkendes Ferment in den Zellresten gibt, dessen optimale Wirksamkeit bei pH 4,1 zu liegen scheint.

Methodik.

Die Hefezellreste wurden nach einer Vorschrift von *Lynen*⁵ hergestellt; die Präparation war imstande, bei Anwesenheit von Glucose eine normale Gärung zu bewirken. 5 g der gewaschenen Zellreste wurden in 20 ml Wasser, in dem 0,3 g Glutathion gelöst waren, aufgeschlämmt; die Suspension enthielt etwa 60 mg Trockensubstanz pro ml. Der Versuchsansatz enthielt im Gesamtvolumen von 10 ml 0,2 ml dieser Suspension.

Als Substrat fand ein im hiesigen Laboratorium nach der Vorschrift von *Le Page*⁶ hergestelltes Natriumsalz des ATP Anwendung.

Für den Bereich von pH 8,0 wurde ein Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffergemisch, für die mittleren Bereiche sowohl Maleinsäurepuffer nach *Smits*⁷ als auch Veronal-Acetat-KCl-Puffergemisch verwendet; für das saure Gebiet (pH 3,5 bis 5,9) kam schließlich ein Essigsäure-Acetatpuffer zur Anwendung.

Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei 30° durchgeführt. Die Substratkonzentration war 1/100 molar. Nach 30 Min. wurde die Enzymwirkung durch Zugabe von 10%iger Trichloressigsäure abgestoppt und darauf die Zunahme des Orthophosphatgehaltes im Versuchsansatz nach *Zeller*⁸ bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Ergebnisse unserer Versuchsserien sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Die verschiedenen Puffergemische haben, wie man aus der Tabelle ersieht, einen nicht unbedeutenden Einfluß auf die Aktivität der Enzyme. So wird bei pH 5,9 in Essigsäure-Acetatpuffer im gleichen Zeitabschnitt mehr als die doppelte Menge des Substrates gespalten als in Maleinsäurepuffer. Eine noch stärkere Hemmwirkung hat das Veronalpuffergemisch; dies ist sowohl an der Grenze des alkalischen als an der Grenze des sauren Bereichs bei dem Vergleich mit den entsprechenden Aktivitätswerten in Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer bzw. in Essigsäure-Acetatpuffer bemerkbar.

Somit sind wohl die mit den verschiedenen Puffergemischen erhaltenen Aktivitätswerte nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar; trotzdem kann man aus der Tabelle klar die Existenz zweier Aktivitätsmaxima erkennen, von welchen das eine etwa bei pH 9,0, das andere bei pH 4,1 liegt.

Es ist sicher, daß das pH-Maximum bei 9,0 dem von *Meyerhof*^{2, 3, 4} entdeckten Ferment zuzuschreiben ist; für das andere Maximum bei

⁵ *F. Lynen*, Liebigs Ann. Chem. **539**, 1 (1939).

⁶ *G. A. Le Page*, in *Biochemical Preparations*, herausgegeben von *H. E. Carter*, New York 1949, S. 5.

⁷ *G. Smits*, Biochim. biophys. Acta **1**, 280 (1947).

⁸ *E. A. Zeller*, Helv. chim. Acta **32**, 2512 (1949).

Tabelle 1. pH-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse durch Hefezellreste.

Puffergemisch	pH	Aktivität in willkürlich gewählten Relativeinheiten
Essigsäure-Acetatpuffer	3,5	205
	4,1	215
	4,7	210
	5,3	177
	5,9	140
Maleinsäurepuffer	5,9	59
	6,1	46
	6,5	46
	6,8	48
	7,8	57
Veronal-Acetat-KCl-Puffer	5,3	54
	6,1	50
	6,75	43
	7,25	48
	7,65	64
	8,2	72
Ammoniumchlorid-Ammoniak- puffer	8,0	96
	8,3	135
	8,6	153
	8,9	156
	9,2	152
	9,5	131

pH 4,1 muß aber jedenfalls ein anderes Enzym verantwortlich sein. Wir halten es für wahrscheinlich, daß dieses Ferment mit der ursprünglich von *Albers* und *Albers*⁹ entdeckten sog. Oberhefephosphatase identisch ist. Dieses Enzym wurde in unserem Laboratorium kürzlich konzentriert und auf seine Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Substraten untersucht¹⁰; es ist nach unseren Untersuchungen relativ sehr unspezifisch und spaltet außer Phosphorsäuremonoester auch Pyrophosphate, Metaphosphate und ATP¹¹. Es ist allerdings noch nicht festgestellt, ob es sich hier um ein einheitliches Enzymindividuum oder um ein aus verschiedenen Enzymen bestehendes System handelt. Die Annahme, daß dieses Enzym oder Enzymsystem mit dem Faktor in den Zellresten identisch ist, wird auch dadurch gestützt, daß wir bei unseren Isolierungsversuchen

⁹ *H. Albers* und *E. Albers*, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **235**, 47 (1935).

¹⁰ *O. Hoffmann-Ostenhof*, *H. Moser* und *F. Neumann*, Mh. Chem. **81**, 708 (1950).

¹¹ *O. Hoffmann-Ostenhof*, Abstr. XIIth. Intern. Congr. pure appl. Chem. New York 1951, S. 119.

fanden, daß die Oberhefephosphatase nur sehr schwer in Lösung zu bringen ist und somit dem Typus eines *desmo*-Fermentes entspricht.

Nach *Meyerhof*² ist in Hefepreßsäften und Macerationssäften das Fehlen von Fermenten, welche ATP hydrolysieren können, für das Auftreten des sog. *Harden-Young*-Effektes verantwortlich, während in der lebenden Zelle und bei ganz bestimmten Zellpräparationen dieser Effekt nicht zu beobachten ist und die Gärung der *Gay-Lussacschen* Gleichung folgt. Falls diese Auffassung richtig ist, was allerdings noch unter Diskussion steht¹², wäre es vorstellbar, daß neben dem von *Meyerhof* gefundenen Enzym auch das Ferment mit pH-Optimum 4,1 an der Verhinderung des *Harden-Young*-Effektes in der lebenden Zelle beteiligt ist.

¹² *O. Hoffmann-Ostenhof* und *W. Weigert*, *Naturwiss.* **39**, 303 (1952).