

## Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe

### III. Freie Nucleotide in Säureextrakten aus phosphat-angereicherter und -verarmter Hefe<sup>1</sup>

Von

**O. Gabriel, I. B. Dawid, A. Orleanski, W. Thill und O. Hoffmann-Ostenhof**

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 2. Juni 1956)

Mit Hilfe der Säulenchromatographie an stark basischen Anionenaustauschern in der Modifikation der „gradient elution“ wurde eine Analyse der freien Nucleotide in Perchlorsäureextrakten aus phosphat-angereicherter und phosphat-verarmter Hefe vorgenommen. Während qualitativ in beiden Fällen die gleichen Nucleotide gefunden wurden, ergaben sich wesentliche Unterschiede in bezug auf die Mengenverhältnisse. Es zeigte sich, daß aus der phosphat-angereicherten Hefe beträchtlich geringere Mengen freier Nucleotide in den Säureextrakt gehen als aus der verarmten, welcher Effekt bei den polyphosphorylierten Nucleotiden besonders stark ausgeprägt ist.

#### Einleitung

In den vorhergegangenen Mitteilungen dieser Reihe<sup>2, 3, 4</sup> haben wir über das Verhalten verschiedener Phosphatfraktionen während der Phosphatanreicherung und der Phosphatverarmung der Hefe berichtet. Bei diesen Arbeiten verwendeten wir die allgemein übliche Fraktionierung und Bestimmung der Phosphatanteile. Um nunmehr einen genaueren

<sup>1</sup> Der Inhalt dieser Mitteilung wurde in gekürzter Form von einem von uns (O. G.) beim Chemikertreffen in Salzburg (April 1956) vorgetragen.

<sup>2</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, A. Klíma †, J. Kenedy und K. Keck, Mh. Chem. 86, 604 (1955).

<sup>3</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, K. Keck und J. Kenedy, Mh. Chem. 86, 616 (1955).

<sup>4</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, Ukrain. biokhim. Shur. 27, 488 (1955).

Einblick in die Vorgänge zu erhalten, bemühten wir uns, mit einer anderen Methode das Verhalten bestimmter phosphorhaltiger Verbindungen, nämlich der freien Nucleotide, unter den genannten Bedingungen qualitativ und quantitativ zu verfolgen.

### Methodik

Die Herstellung verarmter und angereicherter Hefe wurde unter genau den gleichen Bedingungen vorgenommen, wie wir sie in den vorhergehenden Mitteilungen<sup>2</sup> berichtet haben. Unsere Untersuchungen beschränkten sich aber diesmal auf aerob angereicherte Hefe.

Sowohl aus angereicherter als auch aus verarmter Hefe wurden säurelösliche Extrakte auf folgende Weise gewonnen: 20 g Hefe wurden in flüssige Luft eingebracht und so lange darin gelassen, bis die Hefe die Temperatur der flüssigen Luft angenommen hatte. Dann wurde in 50 ml 0,6 n Perchlorsäure 5 Min. lang im *Waring*-Blendor homogenisiert und dann bei 0° zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit 0,2 n Perchlorsäure extrahiert und darauf die überstehenden Flüssigkeiten vereinigt. Dann neutralisierte man mit 5 n KOH und ließ über Nacht im Kühlschrank stehen. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Kaliumperchlorats in der Kälte wurde die Lösung mit NH<sub>3</sub> auf pH 8,0 eingestellt.

Die so erhaltenen Extrakte wurden im wesentlichen nach der Methode von *Cohn*<sup>5</sup> in der „gradient elution“-Modifikation von *Potter* und Mitarbeitern<sup>6</sup> an stark basischen Ionenaustauschern (Dowex 1 × 10, 200 bis 400 mesh) chromatographiert. Die kleinen, von uns vorgenommenen Veränderungen an dieser Methode werden in nächster Zeit an anderer Stelle geschildert werden.

Die Extinktionen der einzelnen Fraktionen bei den Wellenlängen 260 und 275 m $\mu$  wurden spektrophotometrisch bestimmt. Zur weiteren Auftrennung der Fraktionen und zur Identifizierung einzelner Bestandteile wurden als Hilfsmethoden Papierchromatographie und Papierelektrophorese in Verbindung mit dem Photoprint-Verfahren von *Markham* und *Smith*<sup>7</sup> angewandt.

### Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Hauptversuchsreihen sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt. Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen erfolgte vor allem durch Vergleich mit ähnlichen Totalanalysen der freien Nucleotide in Hefe (*Schmitz*<sup>8</sup>) und in anderen biologischen Materialien; hier sei z. B. besonders auf die zwar kurze, aber sehr aufschlußreiche Arbeit von *Manson*<sup>9</sup> über die Analyse der säurelöslichen Nucleotide in der Milchdrüse hingewiesen. Neben diesem Vergleich benützten wir aber zur Identifizierung der einzelnen Bestandteile auch die Extinktions-

<sup>5</sup> *W. E. Cohn*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1471 (1950).

<sup>6</sup> *R. B. Hurlbert*, *H. Schmitz*, *A. F. Brumm* und *V. R. Potter*, J. Biol. Chem. **209**, 23 (1954).

<sup>7</sup> *R. Markham* und *J. D. Smith*, Biochemic. J. **45**, 294 (1949).

<sup>8</sup> *H. Schmitz*, Biochem. Z. **325**, 555 (1954).

<sup>9</sup> *W. Manson*, Biochim. Biophys. Acta **19**, 398 (1956).

quotienten  $275 \text{ m}\mu/260 \text{ m}\mu$ , welche, wie bekannt ist, für den Basenbestandteil der Nucleotide charakteristisch sind, weiters die Rechromatographie mit anderen Elutionssystemen, sowie die anderen im experimentellen Teil angeführten Methoden. Es muß hier festgestellt werden, daß in unseren Diagrammen ebenso wie in denjenigen der vorher genannten

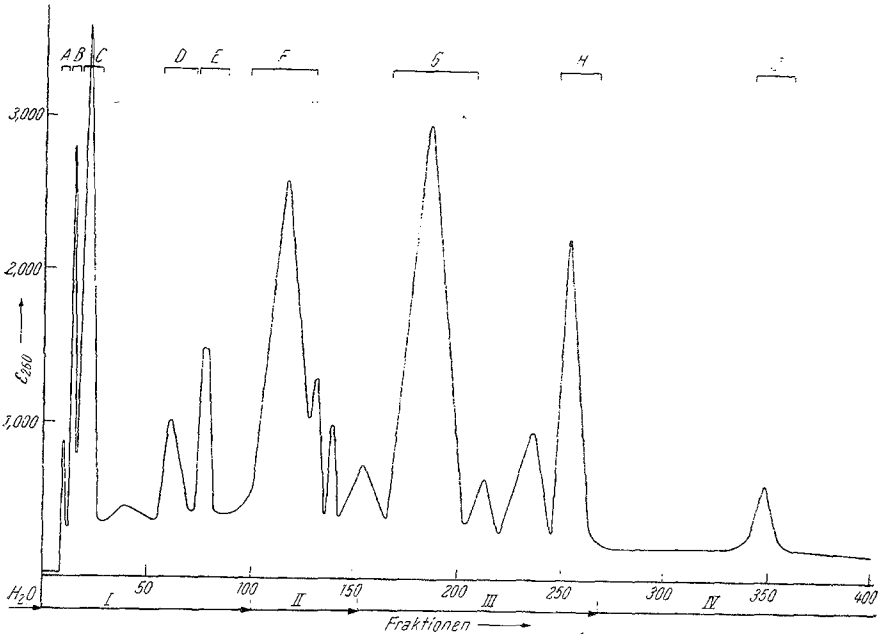


Abb. 1. Chromatographie des Perchlorsäureextrakts von 20 g phosphat-verarmter Hefe. Als Ordinate ist die UV-Absorption bei  $260 \text{ m}\mu$  bei 10 mm Schichtdicke angegeben. Die Fraktionen wurden mittels eines automatischen Fraktionssammlers getrennt. Jede Fraktion hatte ein Volumen von 5 ml. Die Elutionsflüssigkeiten bei den Fraktionen im Bereich I bestand auf 4 m Ameisensäure; im Bereich II aus 4 m Ameisensäure + 0,2 m Ammoniumformiat; im Bereich III aus 4 m Ameisensäure + 0,4 m Ammoniumformiat und im Bereich IV aus 4 m Ameisensäure + 0,8 m Ammoniumformiat. Die im Diagramm bezeichneten Fraktionen enthalten als Hauptbestandteile: A: CMP; B: DPN; C: AMP; D: GMP und etwas TPN; E: UMP und etwas CDP; F: ADP; G: „UDPX“ (Zuckerderivate von UDP); H: ATP; J: UTP und GTP. Der kleine „peak“ nach G enthält vor allem GDP; der darauffolgende „peak“ vor H enthält UDP und UDP-Glucose

Autoren einige „peaks“ aufscheinen, bei welchen die zugrunde liegenden Verbindungen bisher noch nicht erkannt werden konnten.

Die folgenden Nucleotide konnten eindeutig nachgewiesen werden: Cytidin-5'-monophosphat (CMP), Diphosphopyridinnucleotid (DPN), Adenosin-5'-monophosphat (AMP), Guanosin-5'-monophosphat (GMP), Triphosphopyridinnucleotid (TPN), Cytidin-5'-diphosphat (CDP), Uridin-5'-monophosphat (UMP), Adenosin-5'-diphosphat (ADP), eine Fraktion von Uridin-5'-diphosphat-glykosiden (UDPX), Guanosin-5'-diphosphat (GDP), Cytidin-5'-triphosphat (CTP), Adenosin-5'-triphos-

phat (ATP), Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Uridin-5'-triphosphat (UTP). Außerdem wurde regelmäßig Harnsäure inmitten der Nucleotide im Chromatogramm gefunden.

Da gleiche Mengen phosphat-angereicherter und -verarmter Hefe der Analyse unterzogen wurden und wir auch bei einer Kontrollbestimmung des Stickstoffs nach *Kjeldahl* gleich großen Stickstoffgehalt bei beiden

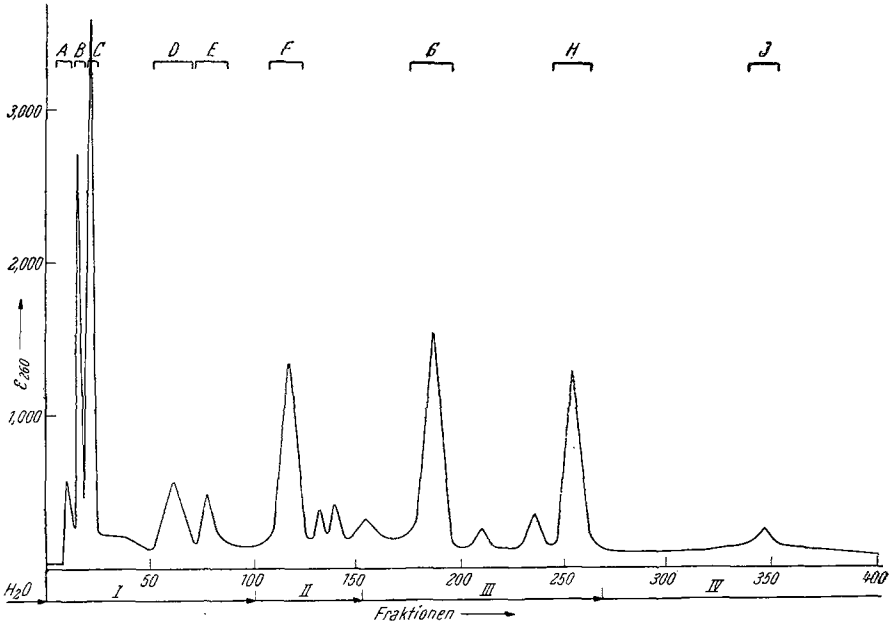


Abb. 2. Chromatographie des Perchlorsäureextrakts von 20 g phosphat-angereicherter Hefe. Bezüglich der Koordinaten, Bedingungen des Versuches und Symbole vgl. die Legende zu Abb. 1

Fraktionen feststellen konnten, fühlen wir uns berechtigt, die beiden Diagramme auch zu quantitativen Vergleichen heranzuziehen.

Bereits bei einfacher Betrachtung der Diagramme erkennt man wesentliche Unterschiede in dem Sinne, daß die Extrakte aus phosphat-angereicherter Hefe allgemein weitaus geringere Mengen freier Nucleotide enthalten als die aus phosphat-verarmter; dies gilt in besonders starkem Ausmaß für die polyphosphorylierten Nucleotide.

### Diskussion

Wie bereits erwähnt wurde, sind die vorliegenden Analysen der Perchlorsäureextrakte aus Hefe auf freie Nucleotide nicht die ersten ihrer Art; bereits vor einiger Zeit wurde eine derartige Arbeit von *Schmitz*<sup>8</sup> veröffentlicht. *Schmitz* führte allerdings seine Untersuchungen an Hefe

in der logarithmischen Wachstumsphase durch, das heißt in einem ganz anderen Stoffwechsellzustand der Hefe, als er bei unseren Versuchen vorliegt. Wie nicht anders zu erwarten ist, stimmen deshalb unsere Analysen mit denjenigen dieses Autors qualitativ wohl weitgehend überein; die Relationen der Mengen der einzelnen Verbindungen untereinander zeigen aber wesentliche Unterschiede. In einer Hinsicht finden wir auch eine qualitative Verschiedenheit: es gelang uns niemals, Inosin-5'-monophosphat (IMP) in unseren Extrakten nachzuweisen.

Ein wesentlicher Grund für die Durchführung der hier berichteten Untersuchungen war, daß wir im Anschluß an unsere seinerzeitigen Versuche<sup>2</sup> genaueren Aufschluß über das Schicksal einiger Verbindungen der säurelöslichen Fraktion im Verlauf der Phosphatanreicherung erhalten wollten. Die etwas überraschende Feststellung, daß während dieses Vorganges eine Konzentrationsverminderung der polyphosphorylierten Nucleotide zu beobachten ist, was mit unseren seinerzeitigen Ergebnissen nicht leicht in Einklang zu bringen ist, veranlaßt uns, die Frage zu prüfen, inwieweit die Bedingungen der beiden Versuchsserien vergleichbar sind. Wir beschäftigen uns zur Zeit damit, den Einfluß der Extraktionsbedingungen auf die Extrahierbarkeit der einzelnen Phosphatfraktionen zu untersuchen und werden darüber in einer folgenden Mitteilung berichten.

Es besteht aber kein Zweifel darüber, daß das in den Extrakten meßbare Absinken der Konzentration der freien monophosphorylierten und polyphosphorylierten Nucleotide während der aeroben Phosphatanreicherung eine biologische Bedeutung hat, das heißt einem Geschehen innerhalb der Hefezelle während dieses Vorganges entspricht, welches wir auf Grund der vorliegenden Ergebnisse als ein Verschwinden der freien Nucleotide auffassen müssen. Für diese Erscheinung während der Phosphatanreicherung gibt es prinzipiell zwei Deutungsmöglichkeiten. Die erste, weitaus wahrscheinlichere ist, daß unter den Bedingungen der Phosphatresorption aus der Nährlösung eine Addition der freien Nucleotide an Zellbestandteile, die mit Perchlorsäure nicht extrahierbar sind, erfolgt, wobei ein Einbau in die Nucleinsäuren am naheliegendsten wäre. Die zweite, wohl eher auszuschließende Möglichkeit wäre, daß unter den genannten Bedingungen eine Veränderung der Nucleotide entweder durch Dephosphorylierung oder durch Überführung in Substanzen stattfindet, die nicht im betreffenden Bereich absorbieren und sich deshalb unserer Nachweismethode entziehen.

Der eine von uns (*O. G.*) dankt dem Theodor-Körner-Stiftungsfonds für die ihm gewährte großzügige Unterstützung.