

Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe

IV. Weitere Untersuchungen über freie Nucleotide in Säureextrakten aus phosphat-angereicherter und -verarmter Hefe

Von

**O. Gabriel, Rosa Ganser, Monika Geyer, C. Jungwirth, A. Orleanski,
G. Stehlik und O. Hoffmann-Ostenhof**

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 10. September 1956)

Scheinbare Divergenzen zwischen den seinerzeit aufgestellten Phosphatbilanzen in Säureextrakten aus phosphat-angereicherter und -verarmter Hefe und den in der letzten Mitteilung dieser Reihe erhobenen Befunden über den Gehalt an freien Nucleotiden in demselben Material, veranlaßten eine genauere Überprüfung der Frage, inwieweit die Extraktionsmethoden die Ergebnisse der Nucleotidbestimmung und der Phosphatbilanzen beeinflussen. Es zeigte sich, daß bei Bestimmung der freien Nucleotide, trotz Verwendung verschiedener Extraktionsmittel, sowohl qualitativ als auch quantitativ weitgehend entsprechende Ergebnisse erhalten wurden.

Die Resultate können wieder in dem Sinne erklärt werden, daß während der Phosphatanreicherung eine Synthese von Nucleinsäure auf Kosten der freien Nucleotide erfolgt.

Gleichzeitig durchgeführte Phosphatbilanzen in den Säureextrakten aus phosphat-verarmter und -angereicherter Hefe ergaben je nach den Extraktionsbedingungen starke, zur Zeit noch schwer deutbare Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Phosphatfraktionen.

Einleitung

In der vorhergegangenen Mitteilung dieser Reihe¹ berichteten wir über die Konzentration freier Nucleotide in Perchlorsäureextrakten aus

¹ O. Gabriel, I. B. Dawid, A. Orleanski, W. Thill und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. 87, 515 (1956).

phosphat-angereicherter und phosphat-verarmter Hefe. Dabei wurde festgestellt, daß aus der phosphat-angereicherten Hefe weitaus geringere Mengen an freien Nucleotiden in den Säureextrakt gehen als aus der phosphat-verarmten, was besonders für die polyphosphorylierten Nucleotide gilt.

Dieser Befund stand in einem scheinbaren Widerspruch zu unseren seinerzeitigen Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Phosphatfraktionen während der Phosphatanreicherung und der Phosphatverarmung²; bei diesen Versuchen fanden wir vor allem einen deutlichen Anstieg der sogenannten 7-Minuten-Phosphatfraktion der Säureextrakte während der Anreicherung, was wir damals als Hinweis auf eine Konzentrationszunahme an „energiereichen“ Phosphatverbindungen, insbesondere vom Typus der polyphosphorylierten Nucleotide, deuteten. Es muß allerdings bedacht werden, daß die Ergebnisse dieser zwei Versuchsreihen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können, da wir seinerzeit² die Säureextraktion mit Trichloressigsäure durchführten, während bei der Analyse freier Nucleotide Perchlorsäure verwendet wurde. Man könnte somit annehmen, daß die bei der Analyse freier Nucleotide in biologischen Materialien allgemein benützte Perchlorsäure nicht für eine quantitative Extraktion dieser Substanzen aus Hefe geeignet ist.

Wir haben nunmehr eine Versuchsreihe zur Klärung dieser Fragen durchgeführt und berichten über deren Ergebnisse in der vorliegenden Mitteilung.

Methodik

Die mit der säurelöslichen („leichtlöslichen“) Fraktion durchgeführten Phosphatbilanzversuche wurden genau nach der in unserer seinerzeitigen Mitteilung² angegebenen Methode durchgeführt, nur wurde an Stelle der dort angewandten Extraktion mit Trichloressigsäure die Extraktion mit Perchlorsäure derart vorgenommen, wie das in unserer vorhergehenden Mitteilung¹ beschrieben ist.

Die Gewinnung der Extrakte zur Säulenchromatographie der Nucleotide erfolgte diesmal auf folgende Weise: 20 g Hefe wurden mit 10%iger Trichloressigsäure bei 0° 1 Std. lang geschüttelt. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wurde der Rückstand nochmals auf die gleiche Weise extrahiert. Die vereinigten Extrakte unterzogen wir dann bis zur vollständigen Entfernung der Trichloressigsäure einer Ätherextraktion im Flüssigkeitsextraktor nach *Kutscher* und *Stuedel*, wobei das Extraktionsgut von außen mit Eis gekühlt wurde. Die erhaltene wäßrige Lösung wurde darauf durch eine Glasfritte unter Eiskühlung so lange belüftet, bis kein Äthergeruch mehr wahrnehmbar war. Darauf brachten wir den Extrakt mit NH₃ auf pH 8,0 und führten mit ihm in der Weise, wie in der vorhergehenden Mitteilung¹ beschrieben wurde, die Säulenchromatographie durch.

² *O. Hoffmann-Ostenhof, A. Klima †, J. Kenedy und K. Keck, Mh. Chem. 86, 604 (1955).*

Die Phosphatanreicherung und Phosphatverarmung der Hefe wurde nach der in unserer seinerzeitigen Publikation² angegebenen Methode durchgeführt; für die hier beschriebenen Versuche wurde ausschließlich aerob angereicherte Hefe verwendet.

Ergebnisse

Um die Frage zu entscheiden, inwieweit die einzelnen Phosphatfraktionen durch Perchlorsäure in anderer Weise extrahiert werden als

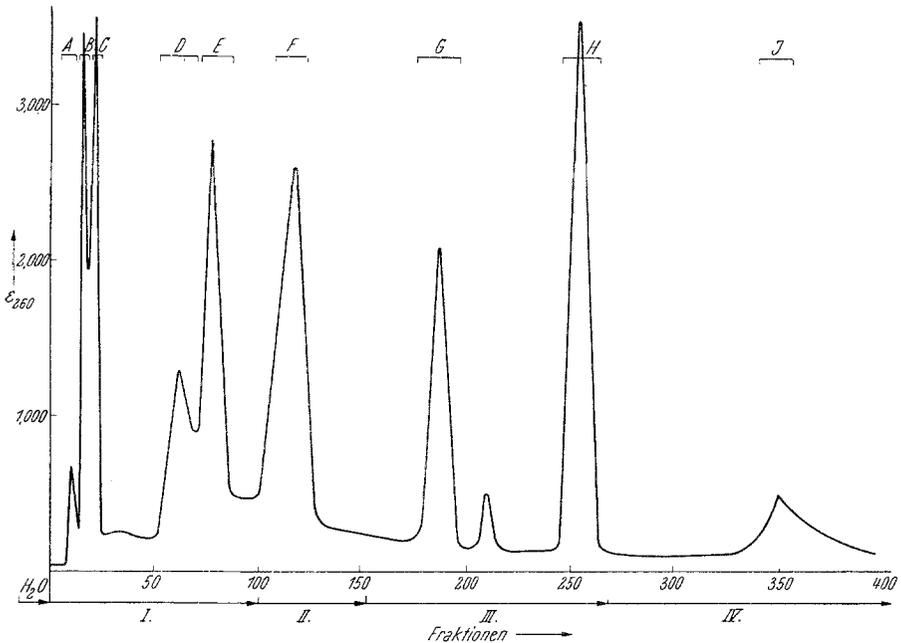


Abb. 1. Chromatographie des Trichloressigsäure-Extraktes von 20 g phosphat-verarmter Hefe. Als Ordinate ist die UV-Absorption bei $260\text{ m}\mu$ bei 10 mm Schichtdicke angegeben. Die Fraktionen wurden mittels eines automatischen Fraktionssammlers getrennt. Jede Fraktion hat ein Volumen von 5 ml. Die Elutionsflüssigkeit bei den Fraktionen im Bereich I bestand aus 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

mit Trichloressigsäure, führten wir vorerst Versuche über das Verhalten der einzelnen Fraktionen des säurelöslichen Anteiles während der Phosphatanreicherung und -verarmung in analoger Weise mit Perchlorsäure durch, wie wir es seinerzeit² mit Trichloressigsäure gemacht haben. Dabei verglichen wir auch die Ergebnisse, welche durch insgesamt 2stünd. Schütteln bei 0° mit Perchlorsäure erhalten wurden, mit denjenigen, bei welchen die Hefe 5 Min. bei derselben Temperatur im *Waring*-Blendor

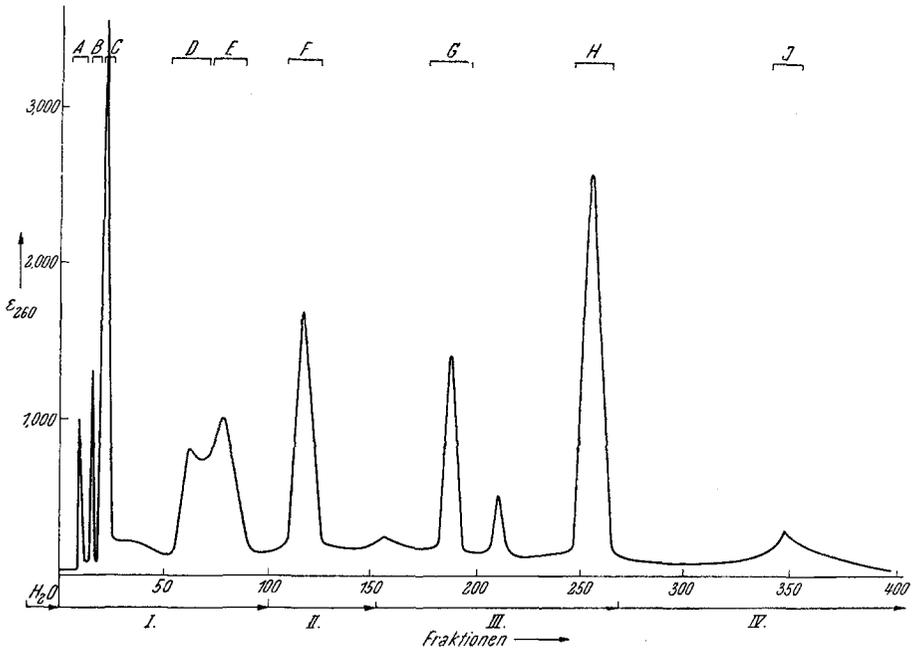


Abb. 2. Chromatographie des Trichloressigsäure-Extraktes von 20 g phosphat-angereicherter Hefe. Bezüglich der Koordinaten, Bedingungen des Versuches und Symbole vergleiche die Legende zu Abb. 1

Tabelle 1. Vergleich dreier Versuchsreihen über das Verhalten einzelner Phosphatfraktionen des säurelöslichen Anteiles aus Hefe bei der aeroben Phosphatanreicherung bei Verwendung verschiedener Extraktionsmethoden

Methode I: Hefe mit 10%iger Trichloressigsäure unter Eiskühlung 1 Std. lang geschüttelt²

Methode II: Hefe mit flüssiger Luft behandelt und dann mit 0,6 n Perchlorsäure 2 Stdn. lang geschüttelt

Methode III: Hefe mit flüssiger Luft behandelt und dann bei 0° mit 0,6 n Perchlorsäure im *Waring-Blendor* extrahiert¹

Die Zahlen bedeuten μg Phosphor pro g Hefe Frischgewicht

	Orthophosphat	7-Minuten-Phosphat	180-Minuten-Phosphat
Methode I:			
verarmte Hefe	640	180	195
angereicherte Hefe.....	175	660	10
Methode II:			
verarmte Hefe	685	350	90
angereicherte Hefe.....	285	255	0
Methode III:			
verarmte Hefe	470	410	15
angereicherte Hefe.....	840	400	260

mit der gleichen Säure behandelt wurden. In Tabelle 1 geben wir die erhaltenen Daten und zum Vergleich dazu eine entsprechende Versuchsreihe mit Trichloressigsäure aus unserer seinerzeitigen Arbeit wieder.

Ferner untersuchten wir mit Hilfe der Säulenchromatographie an stark basischen Anionenaustauschern (Dowex 1×10 , 200 bis 400 mesh) die Trichloressigsäure-Extrakte aus phosphat-verarmter und phosphat-angereicherter Hefe auf ihren Nucleotidgehalt. Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in den Abb. 1 und 2.

Diskussion

Die Ergebnisse der Phosphatfraktionierung unter verschiedenen Bedingungen, für welche typische Versuchsreihen in Tabelle 1 dargestellt werden, geben ein auf den ersten Blick ziemlich widersprechendes Bild. Wenn wir zuerst die sogenannte Orthophosphatfraktion betrachten, welche das tatsächlich frei in der Hefe vorhandene Orthophosphat ebenso wie jenes enthält, das während der Vorgänge der Extraktion oder der Analyse freigesetzt wird³, so sehen wir, daß bei Extraktion durch Schütteln mit Trichloressigsäure in der verarmten Hefe weitaus größere Mengen dieser Fraktion vorhanden sind als in der phosphat-angereicherten Hefe. Dieselben Verhältnisse finden wir auch bei der Extraktion durch Schütteln mit Perchlorsäure. Gänzlich umgekehrt ist aber das Verhältnis, wenn man die Hefe mit Perchlorsäure im *Waring*-Blendor extrahiert. Eine Erklärung für diesen Effekt können wir zur Zeit noch nicht geben.

Bei der sogenannten 7-Minuten-Phosphatfraktion, die uns ja im Zusammenhang mit den polyphosphorylierten Mononucleotiden besonders interessiert, finden wir ebenfalls recht widersprechende Ergebnisse. Während diese Fraktion bei der Extraktion mit Trichloressigsäure im Verlauf der Anreicherung deutlich ansteigt, beobachten wir bei beiden Formen der Perchlorsäureextraktion ein Absinken. Das letztgenannte Resultat stimmt gut überein mit unserer seinerzeitigen Beobachtung¹, daß in phosphat-angereicherter Hefe beträchtlich weniger freie polyphosphorylierte Nucleotide aufzufinden sind als in der phosphat-verarmten. Die Frage, welche Verbindungen dafür verantwortlich sind, daß in den Trichloressigsäure-Extrakten bei der Phosphatanreicherung ein deutlicher Anstieg der 7-Minuten-Phosphatfraktion zu beobachten ist, werden wir weiter unten behandeln.

Ebenfalls ein vollständig unregelmäßiges Verhalten zeigt die Fraktion der sogenannten 180-Minuten-Phosphate. Hier haben wir wiederum bei den Schüttelverfahren mit Trichloressigsäure und auch mit Perchlorsäure ein starkes Absinken dieser Fraktion während der Anreicherung, während bei Extraktion mit Perchlorsäure im *Waring*-Blendor gerade

³ H. Holzer und F. Lynen, Ann. Chem. 569, 138 (1950).

das Umgekehrte eintritt. In dieser Fraktion finden sich bekanntlich unter anderem die monophosphorylierten Mononucleotide.

Wenn wir nunmehr die Abb. 1 und 2 betrachten, so müssen wir feststellen, daß zwischen diesen und Abb. 1 und 2 der vorhergehenden Arbeit¹ weitgehende qualitative und auch quantitative Übereinstimmungen bestehen. Dies ist in Anbetracht der so unterschiedlichen Phosphatbilanzen erstaunlich und deutet jedenfalls darauf hin, daß mit beiden Extraktionsmitteln die gesamte Menge der freien Nucleotide erfaßt wurde.

Das verschiedenartige Verhalten der 7-Minuten-Phosphatfraktion je nach der Extraktionsmethode müssen wir nun in dem Sinne deuten, daß bei der Phosphatanreicherung phosphathaltige Substanzen entstehen, welche zwar mit Trichloressigsäure, nicht aber mit Perchlorsäure extrahierbar sind. Hier wäre vor allem an kondensierte Phosphate („Metaphosphat“) zu denken; allerdings deckt dieser Anteil nach unseren seinerzeitigen Bestimmungen² nicht völlig die zwischen den beiden Versuchsanordnungen auftretende Diskrepanz, so daß noch an das Auftreten weiterer sich bei der Extraktion gleichartig verhaltender Substanzen zu denken wäre.

Unsere in der letzten Mitteilung¹ vorsichtig geäußerte Vermutung, daß während der Phosphatanreicherung ein Einbau freier Nucleotide in die Nucleinsäuren stattfindet, scheint durch die berichteten Versuche verstärkt zu werden. Wir hätten also in der Hefe ein Gleichgewichtssystem zwischen freien Nucleotiden und Nucleinsäuren vor uns, das im stickstofffreien Medium, wo keine *de-novo*-Synthese von Purin- oder Pyrimidinbasen wahrscheinlich ist, bei Phosphat- und Glucosezugabe im Sinne der Synthese der Nucleinsäuren verschoben ist. Vorversuche, welche wir zur Klärung dieser Frage durchführten, ergaben tatsächlich einen Anstieg der Nucleinsäuren (bestimmt nach *Schneider*⁴), der größenordnungsmäßig dem Abfall an freien Nucleotiden adäquat ist. Wir beabsichtigen, das für diese Synthese der Nucleinsäuren verantwortliche System weiter zu untersuchen.

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

⁴ *W. C. Schneider, J. Biol. Chem.* **161**, 293 (1945).