

## Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe, 5. Mitt.:

Weitere Untersuchungen über freie Nucleotide in Säureextrakten aus verschiedenen Stoffwechselbedingungen unterworfenener Hefe

Von

M. F. Abdel-Wahab<sup>1</sup>, J. J. Miller<sup>2</sup>, O. Gabriel<sup>3</sup> und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 19. Oktober 1960)

In Fortsetzung früherer Arbeiten wurden die freien Nucleotide in Säureextrakten aus anaerob phosphat-angereicherter Hefe, aus wachsender Hefe, aus sporulierter Hefe und aus Hefe, die ohne Kohlenstoffquelle auf einer Pufferlösung gezogen wurde, bestimmt. Es zeigte sich, daß die seinerzeit unter aeroben Bedingungen beobachtete Abnahme der Nucleotidkonzentration bei Phosphat-anreicherung anaerob nicht eintritt. Die Suche nach reduzierten Pyrimidinnucleotiden in den Säureextrakten aus anaerob phosphat-angereicherter Hefe gab ein negatives Ergebnis.

Bei Vergleich der freien Nucleotide aus wachsender, sporulierender und im Hungerzustand gehaltener Hefe zeigte sich deutlich, daß während der Sporulierung der „pool“ der freien Nucleotide fast völlig erschöpft wird, während zwischen dem Nucleotidgehalt wachsender Hefe und solcher im Hungerzustand keine sehr markanten Unterschiede zu beobachten sind. Dieses Ergebnis unterstreicht wiederum die Besonderheit des Sporulierungsvorgangs, dessen morphologische Phänomene in den biochemischen Verhältnissen ein deutliches Korrelat finden.

---

<sup>1</sup> Derzeitige Adresse: Egyptian Atomic Energy Commission, Radioisotope Department, Rue Al-Tahrir, Dokki, Cairo, UAR.

<sup>2</sup> Derzeitige Adresse: Department of Biology, Hamilton College, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada.

<sup>3</sup> Derzeitige Adresse: Columbia University College of Surgeons and Physicians, New York (N. Y.).

In den zwei vorhergehenden Mitteilungen dieser Reihe<sup>4, 5</sup> berichteten wir Daten über die Konzentration freier Nucleotide in Säureextrakten aus phosphat-verarmter und phosphat-angereicherter Hefe. Dabei konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Es interessierte uns nunmehr, ob auch andere biologische Bedingungen einen so tiefgreifenden Einfluß auf die Konzentration der freien Nucleotide in der Hefezelle ausüben.

Als erste Aufgabe stellten wir uns die Untersuchung der freien Nucleotide in Hefe, welche unter anaeroben Bedingungen mit Phosphat angereichert worden war. Dabei wollten wir auch die Frage klären, ob in der Hefe, so wie das vor einiger Zeit für tierisches Gewebe gezeigt wurde<sup>6</sup>, reduzierte Pyrimidinnucleotide nachweisbar sind. Das bekannte Reduktionsvermögen anaerob lebender Hefe ließ es möglich erscheinen, daß auch hier hydrierte Verbindungen der Nucleotide vorkommen, von denen bekannt ist, daß sie in den Absorptionsbereichen, die für die nicht-hydrierten Nucleotide charakteristisch sind, keine UV-Absorption zeigen. Zum Nachweis solcher Verbindungen wurde mit Hefe gearbeitet, die unter anaeroben Bedingungen mit <sup>32</sup>P-markiertem Orthophosphat angereichert wurde. Die aus der UV-Extinktion erhaltenen Diagramme wurden dann mit solchen verglichen, in denen an Stelle der UV-Extinktion die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen als Ordinate aufgetragen wurde.

Da in unserem Laboratorium vor einiger Zeit die biochemischen Vorgänge bei der Sporulierung der Hefe etwas eingehender studiert wurden<sup>7-10</sup>, lag es nahe, den Gehalt an freien Nucleotiden in sporulierter Hefe zu bestimmen und mit demjenigen von wachsender Hefe und von solcher Hefe, die unter analogen Bedingungen wie die sporulierte Hefe, aber ohne Nährsubstrat inkubiert worden war, sich also in einem Hungerzustand befand, zu vergleichen. Wir hofften, auf diesem Weg weitere Hinweise über die chemischen Vorgänge bei der Sporulierung zu erhalten.

---

<sup>4</sup> O. Gabriel, I. B. Dawid, A. Orleanski, W. Thill und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **87**, 515 (1956).

<sup>5</sup> O. Gabriel, R. Ganser, M. Geyer, C. Jungwirth, A. Orleanski, G. Stehlik und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **87**, 695 (1956).

<sup>6</sup> L. Grossmann und D. W. Visser, J. Biol. Chem. **216**, 775 (1955).

<sup>7</sup> J. J. Miller, E. Scheiber, O. Gabriel und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **88**, 271 (1957).

<sup>8</sup> E. Scheiber, O. Gabriel, O. Hoffmann-Ostenhof und J. J. Miller, Mh. Chem. **88**, 414 (1957).

<sup>9</sup> J. J. Miller, O. Gabriel, E. Scheiber und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **88**, 417 (1957).

<sup>10</sup> J. J. Miller, O. Hoffmann-Ostenhof, E. Scheiber und O. Gabriel, Canad. J. Microbiol. **5**, 153 (1959).

### Experimenteller Teil

Für die hier beschriebenen Versuche wurde durchweg Bäckerhefe der Ottakringer Brauerei, Wien XVI, benützt, für deren kostenlose Überlassung wir der genannten Firma zu großem Dank verpflichtet sind.

Die Phosphat-anreicherung unter anaeroben Bedingungen wurde in gleicher Weise durchgeführt, wie das in einer früheren Mitteilung dieser Serie<sup>11</sup> beschrieben wurde. Ein etwas veränderter Versuchsansatz fand bei der anaeroben Anreicherung mit radioaktivem Phosphat Anwendung; diese Modifikation diente dazu, eine erhöhte Einbaurate des Phosphors zu erreichen. 20 g (Frischgewicht) phosphat-verarmter Hefe wurden in einer Lösung von 20 g Glucose, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1 Millicurie  $^{32}\text{P}$  (trägerfrei als Orthophosphat) in 200 ml destill.  $\text{H}_2\text{O}$  rasch suspendiert und dann in üblicher Weise vorgerinigter (sauerstofffreier) Stickstoff eingeleitet.

Bemerkenswerterweise war es nicht möglich, mit Hilfe der von uns gewöhnlich benützten Perchlorsäure Extrakte zu erhalten, die für die Chromatographie an Dowex 1 verwertbar sind. Die unter anaeroben Bedingungen phosphat-angereicherte Hefe enthält offenbar — im Gegensatz zu aerob gezogener Hefe — vermutlich höhermolekulare Substanzen, welche mit Perchlorsäure nicht fällbar sind und die chromatographische Trennung der Nucleotide stören. Eine ähnliche Erscheinung bei der Extraktion mit Perchlorsäure wurde auch von *Joklik* (persönliche Mitteilung) beobachtet. Erst durch Verwendung von Trichloressigsäure (*TCE*) zur Extraktion gelang es, für die chromatographische Trennung brauchbare Extrakte zu erhalten. Diese wurde sonst in gleicher Weise wie bereits beschrieben durchgeführt.

Für die Versuche über den Gehalt an freien Nucleotiden bei sporulierter Hefe und die entsprechenden Vergleichsexperimente (wachsende Hefe, Hefe in Pufferlösung ohne Nährsubstrat) wurde in folgender Weise verfahren: Die Züchtung der Hefe erfolgte in 10 l-Fermentatoren bei sehr guter Belüftung bei 27°. Das Nährmedium (1 l) enthielt 10 g Pepton, 50 g Glucose und Kochsaft von 20 g Frischgewicht Hefe (15 Min. Kochen in 200 ml Wasser). Nach 48stdg. Inkubation auf diesem Medium wurde die wachsende Hefe abzentrifugiert und dreimal mit sterilem destillierten Wasser gewaschen. Je 20 g Frischgewicht wurden dann für die einzelnen Versuche weiterverarbeitet.

1. *Wachsende Hefe.* Die Hefe wurde direkt, wie in unserer früheren Mitteilung beschrieben<sup>9</sup>, mit 10proz. *TCE* extrahiert, die *TCE* entfernt, der Extrakt zur Trennung der Nucleotide auf den Ionenaustauscher (Dowex  $1 \times 10$ , 200—400 mesh) aufgebracht und durch nachfolgende Elution mit dem Ameisensäuresystem eluiert.

2. *Sporulierte Hefe.* Die Hefe wurde in 10 l m/30 Phthalatpuffer (pH 5), der 0,3%  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  enthielt, 72 Stdn. bei 27° im Fermentator belüftet. Danach wurden bei der mikroskopischen Auszählung mit Hilfe einer Zählkammer etwa 70—75% sporulierende Zellen gefunden. Die weitere Behandlung (Extraktion mit *TCE* etc.) erfolgte wie bei 1.

Es muß hier erwähnt werden, daß Versuche zur quantitativen Trennung der sporulierten von den nicht-sporulierten Zellen erfolglos verliefen. Mit kleinen Versuchsansätzen gelang es manchmal durch wiederholte Zentrifugierung in m/30 Phthalatpuffer (pH 5), eine Anreicherung bis auf 95% sporulierte Zellen zu erhalten. Aber auch diese Methode versagte bei größeren Ansätzen.

<sup>11</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, A. Klima, J. Kenedy und K. Keck, Mh. Chem. 86, 604 (1955).

3. *Hefe im Hungerzustand.* Die Hefe wurde in völlig gleicher Weise behandelt, wie die Hefe, bei welcher Sporulierung induziert werden sollte, nur wurde dem Medium kein Natriumacetat zugesetzt; dieses enthielt somit lediglich m/30 Phthalatpuffer vom pH 5.

Nach dem Aufbringen der Extrakte auf den Anionenaustauscher und darauffolgender Elution mit dem Ameisensäuresystem nach dem Prinzip der „gradient elution“<sup>12</sup> wurden die einzelnen Fraktionen am UV-Spektrophotometer auf ihre Extinktion gemessen. Die auf diese Weise erhaltenen „peaks“ wurden dann gefriergetrocknet und papierchromatographisch auf Schleicher & Schüll-2043b untersucht. Dabei fanden folgende Lösungsmittelgemische Anwendung: 1. Isobuttersäure, conc. NH<sub>3</sub>, Wasser im Verhältnis 66:1:33; 2. Äthanol, 1 m Ammoniumacetat im Verhältnis 7:3; und 3. 0,1 m Phosphatpuffer (pH 6,8), gesättigte Ammoniumsulfatlösung, n-Propanol im Verhältnis 100:60:2. Die Lokalisierung der einzelnen Flecke erfolgte mit dem Photoprint-Verfahren von *Markham* und *Smith*<sup>13</sup>. Die so aufgefundenen Flecke wurden eluiert, ihr UV-Spektrum im sauren, alkalischen und neutralen Milieu gemessen und mit demjenigen der entsprechenden Reinsubstanzen verglichen.

### Ergebnisse

Die Untersuchung des *TCE*-Extraktes aus Hefe, die unter anaeroben Bedingungen mit Phosphat angereichert worden war, ergab bei der Chromatographie am Ionenaustauscher ein Diagramm, das in Abb. 1 dargestellt ist. Bei den Versuchen mit <sup>32</sup>P-Anreicherung unter denselben Bedingungen erhielten wir, wenn wir an Stelle der Extinktion die Radioaktivität der Fraktionen in das Diagramm einzeichneten, bei Anwendung eines entsprechenden Maßstabs ein völlig analoges Bild. Es konnten keine „peaks“ im radioaktiven Diagramm gefunden werden, die nicht in den „peaks“ des UV-Diagramms ihre Entsprechung fanden; dies bedeutet, daß reduzierte Pyrimidinnucleotide in den Extrakten nicht — oder zumindest nicht in mit unseren Methoden meßbaren Mengen — vorkommen. Im Vergleich zu den Verhältnissen bei der aeroben Phosphat-Anreicherung<sup>4, 5</sup> finden sich wohl qualitativ im wesentlichen gleichartige Verhältnisse; bei Betrachtung der Höhe der einzelnen „peaks“ fällt aber auf, daß weitaus größere Mengen polyphosphorylierte Nucleotide (Adenosin-triphosphat [*ATP*], Guanosin-triphosphat [*GTP*] und Uridin-triphosphat [*UTP*]) gefunden werden als in den entsprechenden Extrakten aus aerob angereicherter Hefe.

Abb. 2 zeigt die Verhältnisse in Säureextrakten aus wachsender Hefe, Abb. 3 diejenigen in solchen aus sporulierter Hefe und Abb. 4 schließlich die freien Nucleotide in den Extrakten, die aus Hefe erhalten wurden, welche sich im Hungerzustand befand. In allen diesen Diagrammen finden wir wohl ebenfalls qualitativ gleichartige Verhältnisse wie in den

<sup>12</sup> R. B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brumm und V. R. Potter, *J. Biol. Chem.* **209**, 23 (1954).

<sup>13</sup> R. Markham und J. D. Smith, *Biochem. J.* **45**, 294 (1949).

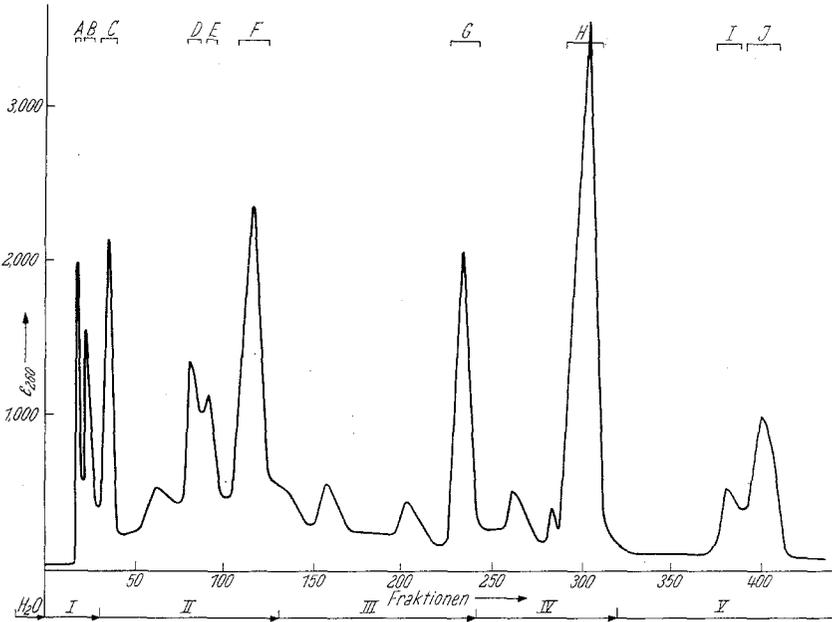


Abb. 1. Chromatographie des Trichloressigsäure-Extraktes von 20 g anaerob phosphat-verarmter Hefe. Als Ordinate fungiert die UV-Absorption bei 260 m $\mu$  bei 10 mm Schichtdicke. Die Fraktionen wurden mittels eines automatischen Fraktionensammlers getrennt. Jede Fraktion hatte ein Volumen von 5 ml. 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 enthielten als Hauptbestandteile: A: *CMP*; B: *DPN*; C: *AMP*; D: *GMP*; E: *UMP*; F: *ADP*; G: „*UDP-X*“ (Zuckerderivate von *UDP*); H: *ATP*; I: *UTP*; J: *GTP*

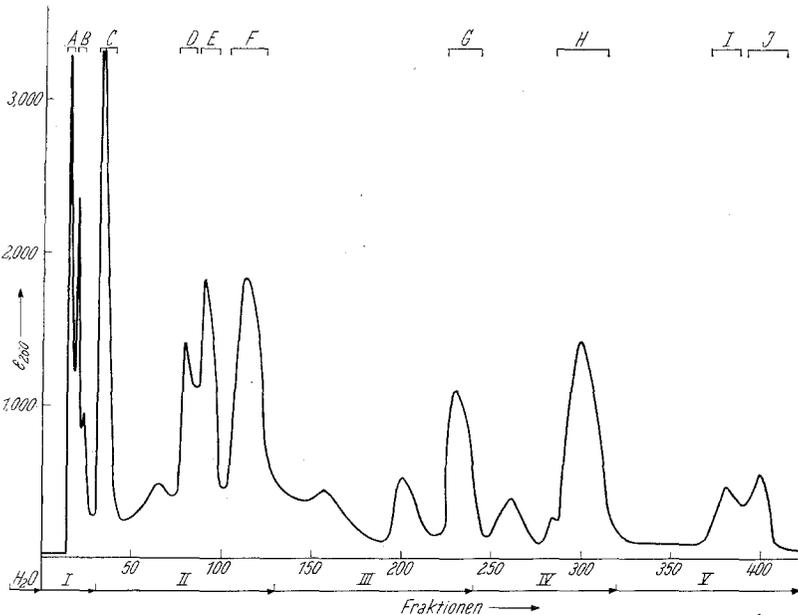


Abb. 2. Chromatographie des Trichloressigsäure-Extraktes von wachsender Hefe. Bezüglich der Koordinaten, Bedingungen des Versuches und Symbole vergleiche die Legende zu Abb. 1

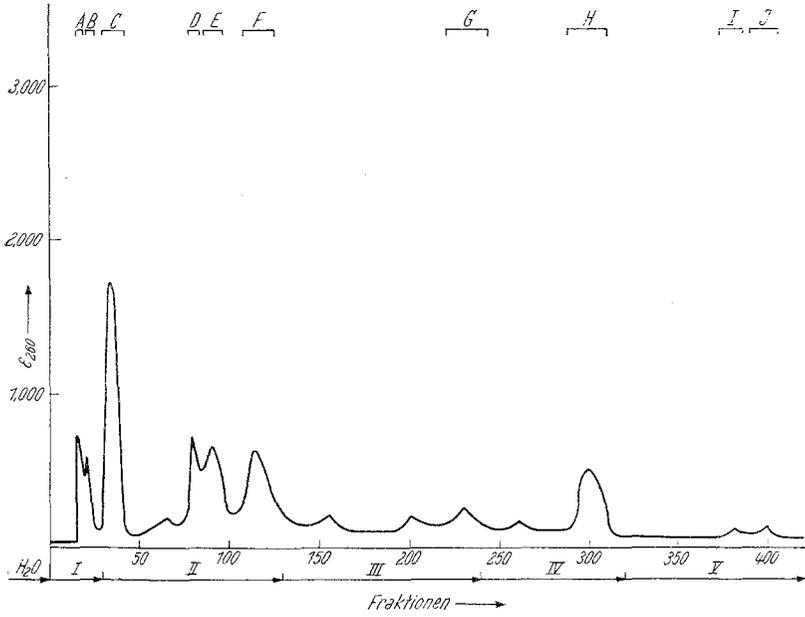


Abb. 3. Chromatographie des Trichloressigsäure-Extraktes von 20 g Hefe, die 70% Sporen enthielt. Bezüglich der Koordinaten, Bedingungen des Versuches und Symbole vergleiche die Legende zu Abb. 1

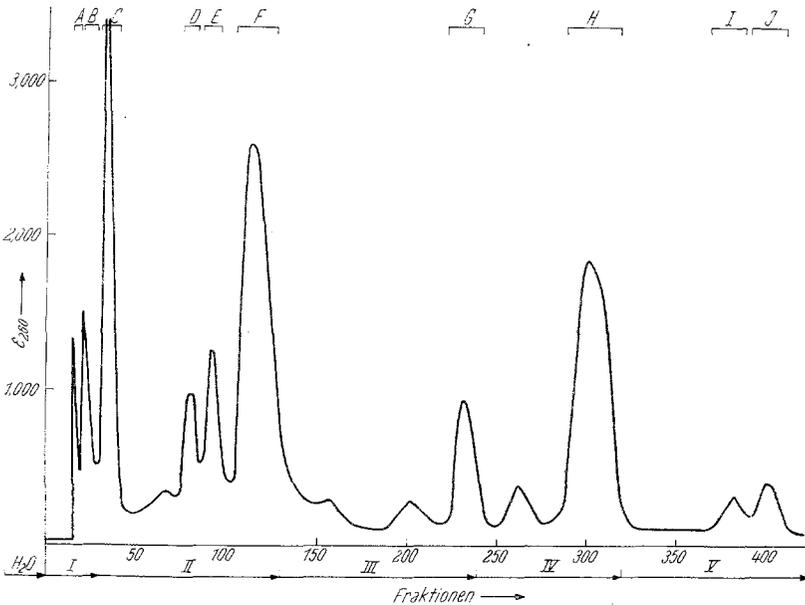


Abb. 4. Chromatographie des Trichloressigsäure-Extraktes von 20 g Hefe, die ohne Kohlenstoffquelle gehalten wurde (Hungerzustand). Bezüglich der Koordinaten, Bedingungen des Versuches und Symbole vergleiche die Legende zu Abb. 1

Diagrammen der aeroben und anaeroben Phosphatanreicherung; quantitativ sind aber sehr bedeutende Unterschiede festzustellen, die weiter unten diskutiert werden sollen.

### Diskussion

Die vorliegenden Diagramme geben Momentbilder über den Gehalt der Hefezellen an freien Nucleotiden unter den betreffenden Stoffwechselbedingungen. Sie können uns naturgemäß keinen Aufschluß darüber vermitteln, woher die einzelnen Substanzen stammen, d. h. ob sie Abbauprodukte aus höheren Einheiten (Nucleinsäuren) darstellen oder durch *de novo*-Synthese entstanden sind. Ohne Zweifel erfolgen beide Prozesse, Abbau und Synthese *de novo* in der lebenden Hefezelle immer gleichzeitig, allerdings in verschiedenem Ausmaß.

Immerhin erscheint uns eine Deutung der Diagramme bis zu einem gewissen Grade möglich, wenn wir sie untereinander vergleichen. Dies scheint vor allem dann zulässig zu sein, wenn wir einen bestimmten Ausgangszustand mit einem späteren durch entsprechende Veränderung der Bedingungen herbeigeführten Zustand vergleichen. In unserer Versuchsreihe stellt z. B. das Diagramm der Nucleotide aus der phosphat-verarmten Hefe (Abb. 1 in der 4. Mitt. dieser Reihe<sup>5</sup>) den Ausgangszustand für die Diagramme der Nucleotide in aerob phosphat-angereicherter Hefe (Abb. 2 der 4. Mitt.) und anaerob phosphat-angereicherter Hefe (Abb. 1 dieser Mitteilung) dar. Andererseits ist das Diagramm der Nucleotide aus der wachsenden Hefe (Abb. 2) der Ausgangszustand für die Abb. 3 und 4 (sporulierte Hefe und Hefe im Hungerzustand).

Wie bereits in der vorhergehenden Mitteilung berichtet wurde<sup>5</sup>, findet bei der aeroben Phosphat-Anreicherung eine deutliche Verminderung der freien Nucleotide — und zwar besonders der polyphosphorylierten — statt, die wir damals in dem Sinne deuteten, daß während dieses Vorgangs ein Einbau freier Nucleotide in Ribonucleinsäure stattfindet, was auch durch die Beobachtung gestützt wurde, daß eine Zunahme der Ribonucleinsäure erfolgt. Unter anaeroben Bedingungen scheint eine solche Nucleinsäure-synthese nicht oder zumindest in weitaus geringerem Ausmaß stattzufinden, weil die quantitativen Verhältnisse der Nucleotide nach der Phosphat-anreicherung (Abb. 1) denjenigen vor der Anreicherung (Abb. 1 der 4. Mitt.<sup>5</sup>) weitgehend entsprechen. Dieser Befund, der allerdings noch weiterer Bestätigung bedarf, ist deshalb bemerkenswert, weil die zur Zeit bekannten Eigenschaften der Enzymssysteme, welche Nucleinsäure synthetisieren, keine Erklärung dafür bieten, warum anaerob die Synthese geringer ist. Die an sich naheliegende Erklärung, daß unter aeroben Bedingungen größere Mengen polyphosphorylierter Nucleotide entstehen, die als Bausteine der Nucleinsäure-synthese fungieren, scheidet in unserem Fall aus, da wir aus unseren Diagrammen entnehmen können,

daß unter anaeroben Bedingungen sogar größere Mengen polyphosphorylierter Nucleotide zur Verfügung stehen als unter aeroben.

Die Abb. 2, 3 und 4 sind wiederum untereinander vergleichbar; Abb. 2 kann dabei als Ausgangszustand betrachtet werden. Während des Wachstums dürften dauernd freie Nucleotide durch Biosynthese *de novo* entstehen und andererseits zum Aufbau höherer Einheiten verbraucht werden; Abb. 2 stellt den Nucleotid-„pool“ in diesem dynamischen Zustand dar.

In Abb. 3, welche die freien Nucleotide in derjenigen Hefepräparation darstellt, die auf Natriumacetat, einem die Sporulierung induzierenden Agens, als einziger Kohlenstoffquelle gehalten wurden, findet sich ein signifikant verschiedenes Bild. Die Konzentration aller Nucleotide ist sehr deutlich vermindert; manche der „peaks“ sind nur mehr angedeutet. Es findet offenbar ein sehr weitgehender Verbrauch aller Nucleotide statt, ohne daß eine Neubildung erfolgt. Vielleicht am bemerkenswertesten ist der starke Abfall der sog. „UDP-X“-Fraktion, die mehrere Glykoside des UDP enthält. Diese Erscheinung läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß während der Sporulierung Sporenzellwände aufgebaut werden müssen, für welche UDP-Glykoside als Ausgangssubstanzen fungieren.

Überraschenderweise finden sich im Vergleichsdiagramm Abb. 4, welches die freien Nucleotide aus einer Hefe darstellt, die unter genau den gleichen Bedingungen gehalten wurde wie die sporulierende Hefe, mit der einzigen Ausnahme, daß das sporulierungs-induzierende Agens weggelassen wurde, ein ganz anderes Bild. Die Konzentrationen aller Nucleotide sind hier zumindest vergleichbar groß oder sogar höher als in Abb. 2. Da unter den Bedingungen der Züchtung, die einem Hungerzustand gleichkommen, kaum irgendeine *de novo*-Synthese von Nucleotiden zu erwarten ist, dürfte der Überschuß an manchen Nucleotiden durch Abbau zustande gekommen sein.

Die Unterschiede zwischen den Abb. 3 und 4 sind um so bemerkenswerter, als es uns ja niemals gelungen war, eine komplette Abtrennung der sporulierten von den nichtsporulierten Zellen zu erreichen und die für die Bestimmung der Nucleotide verwendete Hefekultur nur 70—75% sporulierte Zellen enthielt. Es ist allerdings vorstellbar, daß unter dem Einfluß des die Sporulierung induzierenden Agens Natriumacetat auch diejenigen Zellen der Kultur, die selbst nicht der Sporulierung unterworfen sind, in ihrem biochemischen Verhalten gleiche Verhältnisse zeigen wie die sporulierten. Dies würde auch mit unseren früheren Versuchen über die Veränderung des respiratorischen Quotienten bei der Sporulierung übereinstimmen<sup>7,8</sup>; obwohl auch in den dort verwendeten Kulturen niemals alle Zellen sporulierten, ist der beobachtete Effekt so groß, daß auf ein gleichartiges Verhalten aller Zellen geschlossen werden kann.

Jedenfalls kann aus den hier vorliegenden Resultaten geschlossen werden, daß es sich bei der Sporulierung auch biochemisch um einen von anderen Stoffwechselforgängen sehr deutlich verschiedenen Prozeß handelt<sup>14</sup>. Das morphologische Phänomen der meiotischen Reduktionsteilung läßt sich nicht nur durch chemische Einflüsse induzieren, sondern erzeugt auch chemische Verhältnisse in den Zellen, welche unter keinen bisher bekannten Bedingungen wiedergefunden werden.

*M. F. Abdel-Wahab* dankt der staatlichen ägyptischen Atomenergie-Kommission, *J. J. Miller* der Ontario Research Foundation und dem National Research Council of Canada und *O. Gabriel* dem Theodor-Körner-Stiftungsfond für die ihnen gewährte großzügige Hilfe.

---

<sup>14</sup> Vgl. dazu: *J. J. Miller*, Wallerstein Lab. Commun. **22**, 267 (1959).