

# Intrazelluläre Lokalisierung und Funktion von NADPH\*-Cytochrom *c*-Reduktase in *Saccharomyces cerevisiae*

Von

**Gottfried Schatz**

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 31. August 1963)

Das Flavoprotein NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase aus Hefe ist im Gegensatz zu bisherigen Anschauungen kein Enzym der mitochondrialen Atmungskette, sondern an bisher unbekannte subzelluläre Partikel gebunden, die nach Homogenisieren der Hefezellen von den Mitochondrien abgetrennt werden können. Die Beteiligung von Cytochrom *b*<sub>2</sub> oder einer Transhydrogenase-Reaktion an der Elektronenübertragung von NADPH auf Cytochrom *c* in einem Hefehomogenat konnte ausgeschlossen werden. Die Natur der neuen Hefepartikel sowie die physiologische Funktion des Enzyms NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase werden diskutiert.

Das Flavoprotein NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase wurde erstmalig 1940 von *Haas* und Mitarbeitern<sup>1</sup> aus Brauereihefe isoliert. Da dieses Enzym für NADPH spezifisch ist, in Hefezellen in hoher Aktivität vorkommt und mit Ferricytochrom *c* wesentlich schneller reagiert als mit molekularem Sauerstoff, wurde es seit seiner Entdeckung allgemein als Komponente der Atmungskette von Hefe betrachtet<sup>1-4</sup>. *Haas* und Mit-

\* Abkürzungen: NADPH: reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat; NADH: reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid; Tris: Tris-(hydroxymethyl)aminomethan; BAL: 1,2-Dimercapto-3-hydroxypropan; RNase: Ribonuklease; ATPase: Adenosintriphosphatase; EDTA: Äthylendiamintetraessigsäure.

<sup>1</sup> *E. Haas, B. L. Horecker und T. R. Hogness, J. Biol. Chem.* **136**, 747 (1940).

<sup>2</sup> *P. P. Slonimski, La formation des enzymes respiratoires chez la levure, Masson (Paris) 1953.*

<sup>3</sup> *T. Yamanaka, T. Horio und K. Okunuki, J. Biochem. [Tokio]* **45**, 291 (1958).

<sup>4</sup> *N. O. Kaplan, M. N. Schwartz, M. E. French und M. M. Ciotti, Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **42**, 481 (1956).

arbeiter postulierten dabei folgende Elektronentransportkette<sup>1</sup>: NADPH → Cytochrom *c* → Cytochromoxydase → Sauerstoff (Schema 1). In den darauffolgenden Jahren wurden für Hefe noch weitere Wege des Elektronentransports von NADPH auf Sauerstoff in Betracht gezogen, die sich jedoch vom ursprünglichen Schema von *Haas* und Mitarbeitern zu meist nur durch die Einbeziehung eines weiteren Redoxschrittes zwischen NADPH und Cytochrom *c* unterschieden: So wurde für die Elektronenübertragung von NADPH auf Cytochrom *c* von *Slonimski*<sup>2</sup> die Beteiligung des BAL-empfindlichen Faktors (Schema 2), von *Yamanaka* und Mitarbeitern<sup>3</sup> die von Cytochrom *b*<sub>2</sub> (Schema 3) diskutiert. Ein grundsätzlich neuartiger Mechanismus der NADPH-Oxydation, der auch für Hefezellen in Betracht zu ziehen war, wurde schließlich von *Kaplan* und Mitarbeitern<sup>4</sup> vorgeschlagen: Diese Autoren konnten an Rattenlebermitochondrien die Beteiligung einer Transhydrogenasereaktion nach folgendem Schema wahrscheinlich machen: NADPH  $\xrightarrow{\text{Transhydrogenase}}$  → NADH → Cytochrom *c* → Cytochromoxydase → Sauerstoff (Schema 4). Die Bedeutung aller dieser Wege für die NADPH-Oxydation in Hefezellen wurde bisher noch nicht untersucht.

Nach jedem dieser vier vorgeschlagenen Mechanismen sollte normale aerobe Bäckerhefe intrazellulär gebildetes NADPH schnell durch molekularen Sauerstoff oxydieren können, da beide Teilschritte einer derartigen NADPH-Oxydasereaktion, nämlich sowohl die Reduktion von Ferricytochrom *c* durch NADPH<sup>1</sup> als auch die Oxydation von Ferrocyclochrom *c* durch Luftsauerstoff<sup>2, 5</sup>, in Homogenaten dieser Zelltype mit hoher Geschwindigkeit ablaufen. Im Gegensatz dazu scheinen jedoch Hefezellen, ebenso wie die meisten Säugetierzellen, intrazellulär gebildetes NADPH nur langsam reoxydieren zu können, da die NADPH-Reoxydation die Geschwindigkeit des Hexosemonophosphat-Shunts begrenzt<sup>6</sup>.

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, daß das Enzym NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase in der Hefezelle keine Komponente der mitochondrialen Atmungskette ist, sondern praktisch ausschließlich an bisher unbekannte, mikrosomenähnliche Partikel gebunden ist. Dieses Ergebnis erklärt nicht nur zwanglos die Diskrepanz zwischen hoher NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase- und weitgehend mangelnder NADPH-Oxydaseaktivität in Bäckerhefemogenaten, sondern führt darüber hinaus auch zu dem Schluß, daß für die Elektronenübertragung von NADPH auf Cytochrom *c* in der lebenden Hefezelle keiner der vier bisher diskutierten Mechanismen quantitativ von Bedeutung sein kann.

<sup>5</sup> G. Schatz, H. Tuppy und J. Klima, Z. Naturforsch. **18b**, 145 (1963).

<sup>6</sup> H. Holzer und I. Witt, Angew. Chem. **70**, 439 (1958).

## Ergebnisse

Anaerob gezüchtete normale Hefezellen (Stamm W) sowie aerob gezüchtete Zellen der cytoplasmatischen „petite“ Mutante (Stamm WA), die beide atmungsdefizient sind und die meisten Enzyme der Atmungskette nur in stark verringertem Ausmaß oder überhaupt nicht<sup>2, 5, 7</sup> synthetisieren, weisen gegenüber atmender, normaler Bäckerhefe eine kaum verminderte NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität auf (Tab. 1):

Tabelle 1. Spezifische Aktivität von NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase in Homogenaten von *S. cerevisiae*

<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	Züchtungsbedingungen	Spezif. Aktivität	Zahl der Versuche
Wildstamm W	aerob	Mittel: 0,05 (0,02—0,07)	3
Wildstamm W	anaerob	0,08	1
„Petite“ Mutante WA	aerob	Mittel: 0,03 (0,02—0,04)	3

In einem Homogenat normaler Bäckerhefe läßt sich also nicht nur eine sehr aktive Cytochromoxydase<sup>2, 5</sup>, sondern auch eine aktive NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität nachweisen. Im Gegensatz dazu kann der integrierte Elektronentransportprozeß, nämlich die Oxydation von NADPH durch molekularen Sauerstoff, im gleichen Homogenat nicht nachgewiesen werden. Der Elektronentransport von NADH verläuft dagegen sowohl auf Luftsauerstoff als auch auf Cytochrom *c* mit annähernd gleicher Geschwindigkeit (Tab. 2).

Tabelle 2. Oxydation von NADPH und NADH durch Luftsauerstoff oder Ferricytochrom *c* in Homogenaten von aerober Bäckerhefe (Stamm W)

Gemessene Enzymreaktion	Spezifische Aktivität
NADH-Oxydase	0,18
NADPH-Oxydase	0,00 Quotient: ∞
NADH-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase	0,10
NADPH-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase	0,05 Quotient: 2,0

1,5 µg/ml Antimycin A beeinflussen die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität eines Hefehomogenats nicht, während die Reduktion von Cytochrom *c* durch NADH oder Succinat fast völlig blockiert wird. In einem Hefehomogenat wird somit Cytochrom *c* durch NADPH nach einem anderen Mechanismus reduziert als durch NADH. Zugleich schließen diese Versuche mit Antimycin A auch die Beteiligung einer Transhydro-

<sup>7</sup> G. Schatz, Biochem. Biophys. Res. Communications **12**, 448 (1963).

genasereaktion bei der in vitro gemessenen NADPH-Cytochrom *c*-Reduktasereaktion (Schema 4) aus, da in diesem Fall der Elektronentransport über das NADH-Cytochrom *c*-Reduktasesystem verlaufen und damit antimycinempfindlich sein müßte.

Alle diese Befunde sprechen gegen eine Beteiligung des Enzyms NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase am mitochondrialen Elektronentransport der Hefezelle. Weitere Beweise für diese Anschauung konnten durch die Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung der Reduktase gewonnen werden:

Durch hochtouriges Zentrifugieren (2 Stdn. bei 105 000 *g*) lassen sich über 95% der NADH- und NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität eines Hefehomogenats sedimentieren. Beide Enzymaktivitäten sind also praktisch ausschließlich an subzelluläre Partikel gebunden. Zentrifugiert man ein Hefehomogenat in einem Saccharose-Dichtegradienten, so läßt sich zeigen, daß beide Reduktasen eine voneinander verschiedene intrazelluläre Lokalisierung aufweisen (Abb. 1).

In früheren Untersuchungen wurde für Hefemitochondrien unter den hier angewandten Bedingungen eine Gleichgewichtsdichte von 1,16—1,18  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  gefunden. Abb. 1 zeigt somit, daß praktisch die gesamte NADH-Cytochrom *c*-Reduktase- und NADH-Oxydaseaktivität eines Homogenats atmender Bäckerhefe an Mitochondrien gebunden ist. NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase bildet dagegen eine Bande bei der wesentlich geringeren Dichte von 1,11—1,13  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Dieses Enzym ist also an bisher noch nicht beschriebene subzelluläre Partikel gebunden, deren Verhalten in der präparativen Ultrazentrifuge sowohl von den Hefemitochondrien als auch den früher beschriebenen, ATPase-reichen Doppelmembranen aus Hefe<sup>5</sup> sowie den Mitochondrienvorstufen aus aerober Hefe<sup>7, 8</sup> deutlich abweicht. Diese bisher unbekanntenen Hefepartikel können von den Mitochondrien auch unter den Bedingungen einer Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse abgetrennt werden, da sie wesentlich langsamer sedimentieren als Hefemitochondrien<sup>8</sup>. Deshalb dürfte die aus Abb. 1 ersichtliche Dichte von 1,11—1,13  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  keine echte Gleichgewichtsdichte sein, da für die betreffenden Partikel, im Gegensatz zu den Hefemitochondrien, das Dichtegleichgewicht unter den gewählten Zentrifugierbedingungen noch nicht erreicht wurde.

Durch Kombination mehrerer Zentrifugierschritte konnten die Partikel mit NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität weitgehend gereinigt werden. Das Ausmaß der Anreicherung ist aus Tab. 3 ersichtlich, in der die Verunreinigung der Partikelfractionen mit Mitochondrien durch die Aktivität des Mitochondrienenzym Succinat-Cytochrom *c*-Reduktase ausgedrückt ist.

<sup>8</sup> G. Schatz, unveröffentlichte Versuche.

Tabelle 3. Reinigung der Partikel mit NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität durch Kombination mehrerer Zentrifugierschritte

Fraktion	NADPH-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase Succinat-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase	Relative spezif. Aktivität von NADPH-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase
Homogenat	0,18	1
Partikelsediment	0,16	2,5
1. Gradienten- zentrifugierung	4,20	4,5
2. Gradienten- zentrifugierung	9,30	9,8

Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser gereinigten Fraktion ist im Gange.

Die partikelgebundene NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität kann wohl durch 0,5% Desoxycholat bei 0°, nicht jedoch durch eine energische Behandlung mit RNase (100 µg/ml; 1 Stde. bei 28°) solubilisiert werden.

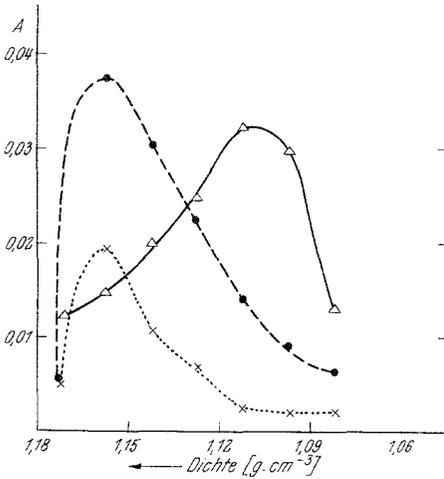


Abb. 1

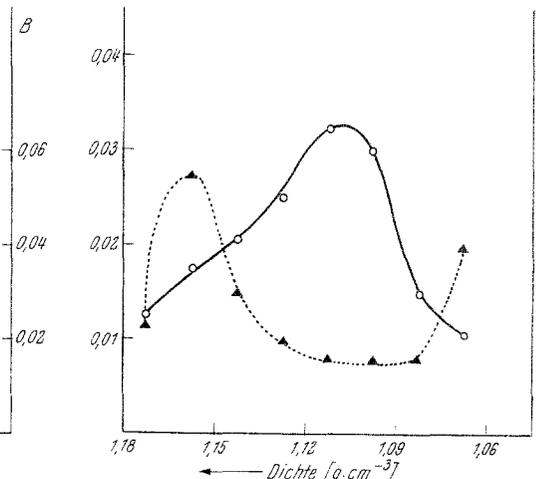


Abb. 2

Abb. 1. Verteilung von NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase (-----), NADH-Cytochrom *c*-Reduktase (————) und NADH-Oxydase (.....) in einem Saccharose-Dichtegradienten. Bezüglich der Zentrifugierbedingungen siehe Experimenteller Teil.

Ordinate A: Aktivität von NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase ( $\Delta E_{350}$  pro Min. pro 0,01 ml Fraktion) und NADH-Cytochrom *c*-Reduktase ( $\Delta E_{350}$  pro Min. pro 0,002 ml Fraktion).

Ordinate B: Aktivität von NADH-Oxydase ( $\Delta E_{340}$  pro Min. pro 0,1 ml Fraktion)

Abb. 2. Verteilung von L-Lactat-Cytochrom *c*-Reduktase (.....) und NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase (————) im Saccharose-Dichtegradienten. Bezüglich der Zentrifugierbedingungen siehe Experimenteller Teil.

Ordinate: Aktivität von L-Lactat-Cytochrom *c*-Reduktase ( $\Delta E_{550}$  pro Min. pro 0,005 ml Fraktion) und Aktivität von NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase ( $\Delta E_{550}$  pro Min. pro 0,01 ml Fraktion)

Die hier isolierten Hefepartikel sind also nicht Ribosomen oder deren Abbauprodukte, sondern wahrscheinlich Lipoproteinmembranen.

Abb. 2 zeigt, daß in der Hefezelle das partikelgebundene Cytochrom  $b_2$  (gemessen an der L-Lactat-Cytochrom  $c$ -Reduktaseaktivität) fast ausschließlich an Mitochondrien gebunden ist. Cytochrom  $b_2$  und NADPH-Cytochrom  $c$ -Reduktase sind also an verschiedene subzelluläre Strukturen gebunden. Dies läßt eine Beteiligung von Cytochrom  $b_2$  am Elektronentransport von NADPH auf Cytochrom  $c$  (Schema 3) als sehr unwahrscheinlich erscheinen. Eine derartige Rolle von Cytochrom  $b_2$  wird auch durch die Befunde an anaerob gezüchteter Hefe ausgeschlossen, da anaerob gezüchtete Hefezellen wohl eine hohe NADPH-Cytochrom  $c$ -Reduktaseaktivität (Tab. 1), jedoch kein Cytochrom  $b_2$  enthalten<sup>9</sup>.

### Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Aktivität des Enzyms NADPH-Cytochrom  $c$ -Reduktase in der Hefezelle weder durch Anaerobiose noch durch den Verlust des für die „petite“ Mutation postulierten hypothetischen extrachromosomalen Atmungsfaktors<sup>2</sup> vermindert wird und praktisch zur Gänze an bisher unbekannte subzelluläre Partikel gebunden ist. Diese neuen Partikel unterscheiden sich von den Hefemitochondrien, den Mitochondrienvorstufen aus aerober Hefe<sup>7, 8</sup>, den ATPasereichen Doppelmembranen<sup>5</sup> sowie den Ribosomen der Hefezelle. NADPH-Cytochrom  $c$ -Reduktase aus Hefe ist also im Gegensatz zu bisherigen Anschauungen kein Enzym der mitochondrialen Atmungskette. Da Cytochrom  $c$  in Hefe, ebenso wie in Säugetierzellen, praktisch ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist<sup>10</sup>, besteht somit keine Verbindung zwischen dem Flavoprotein, das NADPH oxydiert, und dem mitochondrialen Cytochromsystem. Damit lassen sich die hohe NADPH-Cytochrom  $c$ -Reduktaseaktivität und die mangelnde NADPH-Oxydaseaktivität eines Hefehomogenats zwanglos in Einklang bringen. Es ergibt sich somit, daß keine der vier bisher postulierten Elektronentransportketten für die Oxydation von NADPH durch Luftsauerstoff in der lebenden Hefezelle quantitativ von Bedeutung sein kann.

Darüber hinaus führt diese Arbeit zu dem Schluß, daß die bisher bekannte enzymatische Aktivität des Flavoproteins „NADPH-Cytochrom  $c$ -Reduktase“ ein Artefakt ist, da für dieses Enzym in vivo Cytochrom  $c$  auf Grund seiner andersartigen intrazellulären Lokalisierung als Elektronenakzeptor nicht in Betracht kommt. Die physiologische Funktion dieses Flavoproteins ist also noch unbekannt. Ein Hinweis

<sup>9</sup> A. P. Nygaard, J. Biol. Chem. **236**, 1585 (1961).

<sup>10</sup> Th. Heyman-Blanchet, F. Zajdela und P. Chair, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **36**, 569 (1959).

auf seine Funktion läßt sich aus der Natur der Partikel ableiten, an die es gebunden ist: Diese Partikel sind frei von Enzymen der Atmungskette, sedimentieren langsamer als die Hefemitochondrien und bestehen wahrscheinlich aus Lipoprotein. Sie entsprechen somit weitgehend den Mikrosomenfraktionen, die aus Homogenaten von Säugetierzellen isoliert werden können. Die Bedeutung der Membranen des endoplasmatischen Retikulums, aus denen sich die Mikrosomenfraktionen bekanntlich ableiten<sup>11</sup>, für NADPH-umsetzende Reaktionen läßt daran denken, daß es sich bei dem Flavoprotein „NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase“ um eine Komponente einer mikrosomalen Elektronentransportkette handelt, die an NADPH- und O<sub>2</sub>-abhängigen Cyclisierungen, Hydroxylierungen und Desaturierungen beteiligt ist. Diesbezügliche Untersuchungen sind im Gange.

Der Autor ist Herrn Prof. Dr. *H. Tuppy* für zahlreiche fachliche Diskussionen sowie wertvolle Anregungen zu besonderem Dank verpflichtet.

Frau *K. Oplatka* sei für ihre gewissenhafte Mithilfe gedankt.

Diese Arbeit erfolgte mit Unterstützung des U.S. Public Health Service (Grant GM 11225-01) sowie, zum Teil, der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft.

### Experimenteller Teil

Die verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme W und WA, die Bedingungen der Züchtung der anaeroben und atmungsmutanten Zellen sowie die Herstellung der Zellhomogenate waren die gleichen wie in vorausgegangenen Untersuchungen<sup>5, 7</sup>, außer, daß ein Homogenisationsmedium folgender Zusammensetzung verwendet wurde: 0,25 m Saccharose, 20 · 10<sup>-3</sup> m Trispuffer pH 7,4 und 1 · 10<sup>-3</sup> m EDTA. Für Versuche mit aerober Bäckerhefe wurde käufliche Preßhefe verwendet, die als Quelle der Stämme W und WA gedient hatte.

Für die Gradienten-Gleichgewichtszentrifugierung wurde 1 ml eines Hefehomogenats (20—30 mg Protein/ml) über 4,5 ml eines Saccharosedichtegradienten (0,3—1,4 m Saccharose, Zusätze wie beim Homogenisationsmedium) geschichtet und 3 Stdn. im Rotor SW 39 der Spinco Modell L Ultrazentrifuge bei 39000 UpM zentrifugiert. Die Entnahme der Fraktionen mit verschiedener Dichte nach beendeter Zentrifugation wurde bereits beschrieben<sup>5</sup>.

NADPH-Cytochrom *c*-Reduktaseaktivität wurde spektrophotometrisch bei 550 m $\mu$  bestimmt. Das Testmedium enthielt in 3 ml 41  $\mu$ Mole Phosphatpuffer pH 7,4, 0,87  $\mu$ Mole Ferricytochrom *c* (aus Pferdeherz), 1,8  $\mu$ Mole NADPH (Boehringer & Söhne) sowie 90  $\mu$ Mole KCN. Die Vergleichsküvette enthielt ein Medium gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne NADPH. Die Reaktion wurde durch Zugabe gleicher Enzymmengen zu Test- und Vergleichsküvette gestartet. NADH-Cytochrom *c*-Reduktase, L-Lactat-Cytochrom *c*-Reduktase und Succinat-Cytochrom *c*-Reduktase wurden unter gleichen Bedingungen wie NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase gemessen, wobei jedoch NADPH jeweils durch 1,8  $\mu$ Mole NADH, 15  $\mu$ Mole Kalium-L-Lactat bzw. 10  $\mu$ Mole Kalium-succinat ersetzt wurde. NADH-Oxydase

<sup>11</sup> *G. E. Palade* und *P. Siekevitz*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 171 (1956).

wurde nach *Slater*<sup>12</sup> bestimmt. Alle enzymatischen Aktivitäten wurden bei 28° in einem Gesamtvolumen von 3 ml bestimmt. Spezif. Aktivitäten sind als  $\mu$ Mole oxydiertes Substrat pro Minute pro mg Protein definiert. Protein wurde nach *Lowry* und Mitarbeitern<sup>13</sup> bestimmt.

Für die Reinigung der neuen Hefepartikel wurde zunächst ein Homogenat normaler Bäckerhefe 90 Min. bei 40000 UpM zentrifugiert (Rotor 40 der Spinco Ultrazentrifuge). Das erhaltene Partikelsediment wurde in wenig Homogenisationsmedium resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde in einem Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt, wie es weiter oben für die Fraktionierung der Homogenate beschrieben worden ist. Die Fraktionen mit der höchsten NADPH-Cytochrom c-Reduktaseaktivität wurden durch seitliches Anstechen des Zentrifugenröhrchens isoliert und mit eiskaltem Wasser, das  $20 \cdot 10^{-3}$  m Trispuffer pH 7,4 sowie  $1 \cdot 10^{-3}$  m EDTA enthielt, 1:1 verdünnt. 3,5 ml dieser so verdünnten Suspension wurden schließlich über 1 ml einer 1,95 m Saccharoselösung geschichtet und 15 Stdn. im SW 39 Rotor bei 39000 UpM zentrifugiert, um verunreinigendes ribosomales Material zu entfernen. Nach beendeter Zentrifugation hatten sich an der Grenzfläche beider Lösungen zwei scharf voneinander abgesetzte Banden ausgebildet, deren obere die neuen Hefepartikel in gereinigter Form enthielt und die durch seitliches Anstechen des Zentrifugenröhrchens isoliert wurde.

<sup>12</sup> *E. C. Slater*, *Biochem. J.* **46**, 484 (1950).

<sup>13</sup> *O. H. Lowry*, *N. J. Rosebrough*, *A. L. Farr* und *R. J. Randall*, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).