

# Extranukleare Desoxyribonukleinsäure in aerob und anaerob gezüchteter normaler Bäckerhefe sowie in der atmungsdefizienten „petite“-Mutante

Von

H. Tuppy, E. Haslbrunner und G. Schatz\*

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 20. August 1965)

Pankreas-*DNA*ase\*\* greift bei niedriger Temperatur die in Hefemitochondrien vorhandene *DNA* nicht merkbar an, während verunreinigende nicht-mitochondriale *DNA* zu säurelöslichen Bruchstücken abgebaut wird. Eine darauf beruhende Methode eignet sich zur selektiven Bestimmung mitochondrialer *DNA* in Mitochondrienfraktionen, die durch differentielles Zentrifugieren von Hefehomogenaten gewonnen worden und noch mit Zellkernmaterial verunreinigt sind.

In den nicht atmungsfähigen Mitochondrien der „petite“-Mutante der Bäckerhefe ist *DNA* in einer gegenüber dem Wildtyp nicht wesentlich verringerten Menge vorhanden; die extrachromosomale Mutation zum „petite“-Typ ist demnach nicht mit einem völligen Verlust mitochondrialer *DNA* zu erklären. Auch die in Homogenaten anaerob gezüchteter Zellen des Wildtyps aufgefundenen mitochondrien-ähnlichen Partikeln enthalten eine geringe Menge *DNA*.

Pancreatic *DNA*ase at low temperature fails to attack intramitochondrial *DNA*, whereas contaminating non-mitochondrial *DNA* is readily degraded to acid-soluble fragments. This makes possible a selective determination of mitochondrial *DNA* in crude

---

\* Gegenwärtige Adresse: The Public Health Research Institute of the City of New York, New York 9, U.S.A.

\*\* Verwendete Abkürzungen: *DNA* = Desoxyribonukleinsäure; *DNA*ase = Desoxyribonuklease; *EDTA* = Äthylendiamintetraessigsäure; *RNA* = Ribonukleinsäure.

particle fractions which have been obtained from yeast cell homogenates by differential centrifugation and are still contaminated by nuclear material.

The non-respiring mitochondria of the "petite" mutant of baker's yeast have been found to contain amounts of *DNA* similar to those present in wild type yeast mitochondria. This finding indicates that the extrachromosomal mutation which gives rise to respiration-deficient "petite" cells is not due to a complete loss of mitochondrial *DNA*. The mitochondria-like particles occurring in homogenates of wild type yeast grown under anaerobic conditions have also been found to contain small amounts of *DNA*.

Wie früher berichtet<sup>1, 2</sup>, zeigten analytische Untersuchungen, die wir an hochgereinigten Mitochondrien aus aerob gezüchteter Bäckerhefe sowie aus Zellen verschiedener Säugetiergewebe vornahmen, daß diese Zellorganellen geringe, jedoch signifikante *DNA*-Mengen enthalten. Auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen an einer großen Zahl verschiedener Zelltypen gelangten *Nass* und *Nass*<sup>3, 4</sup> zur gleichen Schlußfolgerung. Diese Befunde über das Vorkommen von *DNA* in Mitochondrien wurden inzwischen durch zahlreiche biochemische und cytologische Arbeiten bestätigt und wesentlich erweitert<sup>5-11</sup>. Es kann nunmehr als erwiesen gelten, daß Mitochondrien eine hochmolekulare *DNA* besitzen, die sich in ihrer Basenzusammensetzung von der im Zellkern lokalisierten *DNA* unterscheidet.

Die Funktion der mitochondrialen *DNA* ist noch nicht mit Sicherheit bekannt. In Anbetracht zahlreicher Beobachtungen, die für eine teilweise genetische Autonomie der Mitochondrien sprechen, ist es jedoch wahrscheinlich, daß ihr eine Aufgabe als Träger genetischer Information zukommt. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß isolierte

<sup>1</sup> G. Schatz, E. Haslbrunner und H. Tuppy, Biochem. Biophys. Res. Comm. **15**, 127 (1964).

<sup>2</sup> G. Schatz, E. Haslbrunner und H. Tuppy, Mh. Chem. **95**, 1135 (1964).

<sup>3</sup> S. Nass und M. M. K. Nass, J. Cell Biol. **19**, 613 (1963); J. Natl. Cancer Inst. **33**, 777 (1964).

<sup>4</sup> M. M. K. Nass, S. Nass und B. A. Afzelius, Exper. Cell Res. **37**, 516 (1965).

<sup>5</sup> D. J. L. Luck und E. Reich, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. **52**, 931 (1964).

<sup>6</sup> P. R. Bell und K. Mühlethaler, J. Mol. Biol. **8**, 853 (1964).

<sup>7</sup> E. Guttes und S. Guttes, Science [New York] **145**, 1057 (1964).

<sup>8</sup> G. F. Kalf, Biochemistry **3**, 1702 (1964).

<sup>9</sup> S. Nass, M. M. K. Nass und U. Hennix, Biochim. Biophys. Acta **95**, 426 (1965).

<sup>10</sup> Y. Yotsuyanagi und C. Guerrier, C. R. hebdomad. Sé. Acad. Sci. **260**, 2344 (1965).

<sup>11</sup> M. Rabinowitz, J. Sinclair, L. DeSalle, R. Haselkorn und H. H. Swift, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **53**, 1126 (1965).

Mitochondrien zur Synthese von *RNA* und von Protein befähigt<sup>5, 12-18</sup> und diese synthetischen Prozesse *DNA*-abhängig sind<sup>5, 8, 15-17</sup>. Diese Befunde deuten an, auf welche Weise die in den Mitochondrien nachgewiesene *DNA* wirksam wird.

Struktur und Enzymgehalt der Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* können durch eine extrachromosomale Mutation<sup>19-22</sup> oder auch durch anaerobe Züchtung der Zellen<sup>23, 24</sup> weitgehend verändert werden; damit geht ein Verlust zahlreicher Mitochondrienfunktionen einher. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob die genannten Veränderungen durch einen Verlust der *DNA*-Komponente der Mitochondrien bedingt sind.

### Ergebnisse

Für die quantitativen *DNA*-Bestimmungen wurde die kolorimetrische Indolmethode von *Cerioti*<sup>25</sup> in einer abgewandelten Ausführungsform verwendet. Das im experimentellen Teil beschriebene Verfahren gibt zwar eine um ungefähr 20% geringere Farbausbeute als die ursprüngliche Methode, ist jedoch besser reproduzierbar und leichter in kleinen Flüssigkeitsmengen durchführbar. *DNA*-Mengen zwischen 2,5 und 12,5 µg lassen sich — in einem nach Zusatz der Reagentien, Indol und Salzsäure, 1,0 ml betragenden Volumen — bequem ermitteln, wobei zwischen eingesetzter *DNA*-Menge und Lichtabsorption bei 490 mµ Proportionalität gewährleistet ist (Abb. 1). Die mit der modifizierten Indolmethode bestimmten Werte wurden öfters mit den Methoden von *Dische*<sup>26</sup> und *Burton*<sup>27</sup> überprüft, wobei sich gute Übereinstimmung ergab.

<sup>12</sup> *J. R. McLean, G. L. Cohn, I. K. Brandt* und *M. V. Simpson*, *J. Biol. Chem.* **233**, 657 (1958).

<sup>13</sup> *D. E. S. Truman* und *A. Korner*, *Biochem. J.* **85**, 154 (1962).

<sup>14</sup> *D. B. Roodyn, P. J. Reis* und *T. S. Work*, *Biochem. J.* **80**, 9 (1961).

<sup>15</sup> *E. Wintersberger*, *Z. physiol. Chem.* **336**, 285 (1964); *Biochem. Z.* **341**, 409 (1965).

<sup>16</sup> *E. Wintersberger* und *H. Tuppy*, *Biochem. Z.* **341**, 399 (1965).

<sup>17</sup> *A. M. Kroon*, *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 391 (1963).

<sup>18</sup> *D. Neubert* und *H. Helge*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 600 (1965).

<sup>19</sup> *B. Ephrussi*, *Naturwiss.* **43**, 505 (1956).

<sup>20</sup> *A. W. Linnane* und *J. L. Still*, *Austral. J. Sci.* **18**, 165 (1956).

<sup>21</sup> *Y. Yotsuyanagi*, *J. Ultrastruct. Res.* **7**, 141 (1962).

<sup>22</sup> *G. Schatz, H. Tuppy* und *J. Klima*, *Z. Naturforsch.* **18 b**, 145 (1963).

<sup>23</sup> *P. P. Slonimski*, »La formation des enzymes respiratoires chez la levure«, Masson, Paris (1953).

<sup>24</sup> *G. Schatz*, *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 342 (1965).

<sup>25</sup> *G. Cerioti*, *J. Biol. Chem.* **198**, 297 (1952).

<sup>26</sup> *Z. Dische*, *Mikrochemie [2]* **2** (= **8**), 4 (1930).

<sup>27</sup> *K. Burton*, *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).

Frühere Experimente hatten ergeben, daß in den Mitochondrien neben säurefällbarer *DNA* auch beträchtliche Mengen säurelöslicher, desoxyribose-haltiger Verbindungen vorkommen<sup>1</sup>. Vor den *DNA*-Bestimmungen wurden daher alle untersuchten subzellulären Fraktionen zur Entfernung säurelöslichen Materials in der Kälte mit alkoholischer Perchlorsäure behandelt. Hochmolekulare *DNA* wird, wie Kontrollversuche zeigten, aus eiweißhaltigen Lösungen durch alkoholische Perchlorsäure zu mindestens 80% präzipitiert und bei der nachfolgenden

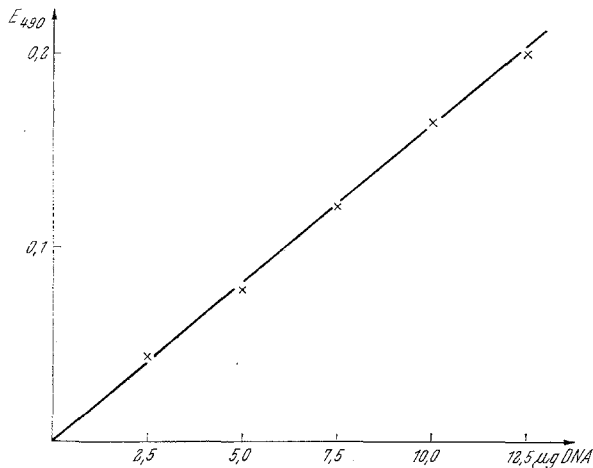


Abb. 1. Modifizierte Indolmethode: Proportionalität zwischen *DNA*-Menge und Extinktion bei 490 m $\mu$ .

Bestimmung erfaßt. Da außerdem beobachtet worden war, daß Mitochondrienlipide die *DNA*-Analysen stören und zu niedrige Werte vortäuschen können, wurden die Partikelfraktionen vor Anwendung der Indolmethode stets auch noch durch Extraktion mit einer Alkohol—Äther-Mischung entfettet.

Die bereits beschriebene Flotation subzellulärer Partikeln in einem „Urografin“-Dichtegradienten<sup>1</sup> ermöglicht eine scharfe Trennung der Mitochondrien von anderen Zellbestandteilen; Verunreinigungen mit Zellkern-*DNA* werden auf diese Weise weitgehend ausgeschlossen. Die Methode der Flotation in der Ultrazentrifuge wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit zur Reinigung sowohl der atmenden normalen Hefemitochondrien als auch der mitochondrien-ähnlichen Partikeln aus anaerob gezüchteter Bäckerhefe herangezogen (Abb. 2).

*DNA*-Bestimmungen in flotierten normalen Hefemitochondrien, die von Lipiden und säurelöslichem Material zuvor befreit worden waren, ergaben in drei verschiedenen Versuchen Werte von 4,3, 3,9 und 3,7  $\mu\text{g DNA/mg Protein}$ . In den mitochondrien-ähnlichen Partikeln der anaerob

gezüchteten Bäckerhefe konnte ebenfalls *DNA* nachgewiesen werden, wenn auch in einer geringeren Menge als in normalen Hefemitochondrien: In zwei Versuchen wurden *DNA*-Gehalte von 0,5 bzw. 0,9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Mitochondrien-Eiweiß gefunden.

Wenn durch Flotation gereinigte normale Hefemitochondrien 2 Stunden bei  $26^\circ$  und pH 6,6 in stark hypotoner Lösung mit *DNA*ase inkubiert wurden, erlitt die mitochondriale *DNA* einen weitgehenden

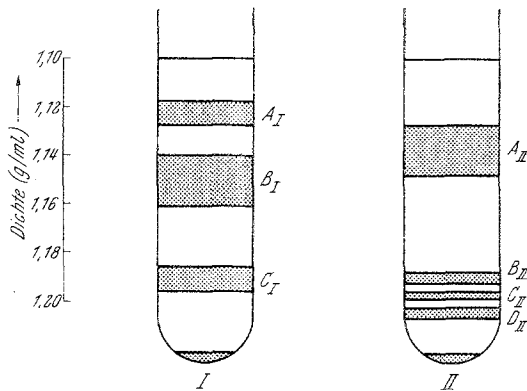


Abb. 2. Flotation in einem Urografin-Dichtegradienten: Aufspaltung subzellulärer Fraktionen in Partikelbanden (Schematische Darstellung).

(I) Auftrennung der durch differentielles Zentrifugieren gewonnenen Mitochondrien-Rohfraktion aus aerob gezüchteter normaler Bäckerhefe.

(II) Auftrennung der durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnenen Teilchenfraktion aus anaerob gezüchteter normaler Bäckerhefe.

Die Flotation wurde durch drei- (I) bzw. eifstündiges (II) Zentrifugieren bei 25 000 UpM im Rotor SW 25 der Spinco-Ultrazentrifuge erzielt. Die Bande  $B_I$  besteht aus normalen Hefemitochondrien<sup>1</sup>,  $A_{II}$  aus den in anaerober Hefe vorkommenden mitochondrien-ähnlichen Partikeln<sup>2,4</sup>

Abbau. So fiel in einem typischen Verdauungsversuch der Gehalt an säurefällbarer *DNA* von 4,3 auf 2,1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein. Dieses Ergebnis zeigt, daß das mit der Indolmethode erfaßte, säurefällbare Material tatsächlich *DNA* ist und daß von außen einwirkende *DNA*ase unter bestimmten Bedingungen die mitochondriale *DNA* abzubauen vermag. Wurden jedoch die flotierten Hefemitochondrien mit dem Enzym bei  $4^\circ$ , neutralem pH und in 0,25 *m*-Mannitlösung inkubiert, erwies sich die mitochondriale *DNA* als *DNA*ase-resistent; unter diesen schonenden Bedingungen der Inkubation kann das von außen zugeführte Enzym zur *DNA* offenbar nicht vordringen. Eine ähnliche Resistenz gegenüber *DNA*ase bei tiefer Temperatur ist von Luck und Reich<sup>5</sup> auch an Mitochondrienfraktionen aus *Neurospora crassa* beobachtet worden. Diese biochemischen Resultate sprechen ebenso wie elektronenmikroskopische Befunde<sup>3, 4, 10</sup> für eine *intramitochondriale* Lokalisation der in hochgereinigten Mitochondrien gefundenen *DNA*.

Die schwere Zugänglichkeit der intramitochondrialen *DNA* für *DNA*ase ermöglichte es, die in rohen Mitochondrienfraktionen als Verunreinigung vorhandene Zellkern-*DNA* durch dieses Ferment selektiv abzubauen und entfernen zu lassen. Wenn Mitochondrien, die durch differentielles Zentrifugieren eines Homogenates normaler aerober Bäckerhefe isoliert und nicht weiter gereinigt worden waren und noch ungefähr

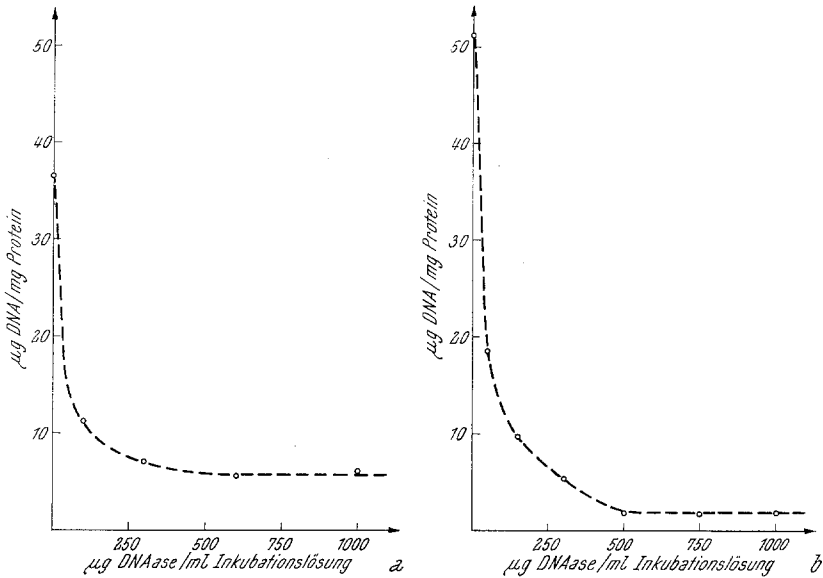


Abb. 3. *DNA* in Mitochondrienfraktionen nach Inkubation mit steigenden *DNA*ase-Mengen bei 4°  
 (a) Rohe Mitochondrienfraktion aus aerob gezüchteter normaler Bäckerhefe (2,7 mg Partikelprotein/ml Inkubationsmedium).  
 (b) Rohe Mitochondrienfraktion aus der „petite“-Mutante (0,75 mg Partikelprotein/ml Inkubationsmedium).

40 µg *DNA*/mg Protein enthielten, eine Stunde bei 4° mit steigenden *DNA*ase-Mengen inkubiert wurden, so gingen steigende *DNA*-Mengen in säurelösliche Form über. Eine bestimmte, konstante *DNA*-Menge widerstand jedoch, offenbar durch ihre intramitochondriale Lage geschützt, selbst den höchsten angewandten *DNA*ase-Konzentrationen. Sie betrug in zwei Versuchen 4,0 bzw. 6,0 µg *DNA*/mg Protein (Abb. 3 a). Der Mittelwert von 5 µg *DNA*/mg Protein steht in befriedigender Übereinstimmung mit dem durchschnittlichen *DNA*-Gehalt hochgereinigter, flotierter Hefemitochondrien, der in diesen und früheren Untersuchungen<sup>1</sup> zu 4 µg/mg Protein ermittelt worden ist.

Zahlreiche Versuche, die Mitochondrien der cytoplasmatischen, atmungsdefizienten „petite“-Mutante durch Flotation im „Urografin“-Dichtegradienten zu reinigen, erwiesen sich als vergeblich. Der Mißerfolg

dürfte der bereits früher beobachteten Fragilität<sup>20, 22</sup> dieser Organellen zuzuschreiben sein. Auch der Einsatz verschiedener anderer Dichtegradienten führte nicht zum Ziel. Der *DNA*-Gehalt der Mitochondrien der „petite“-Mutante wurde deshalb nach Vorbehandlung der rohen Mitochondrienfraktion mit *DNA*ase bestimmt. Es zeigte sich, daß bei 4° ein großer Teil der in den ungereinigten Mitochondrienfraktionen anwesenden *DNA* enzymatisch abgebaut wurde. Ebenso wie bei den aus aerober normaler Bäckerhefe gewonnenen Mitochondrien erwies sich jedoch auch hier eine kleine *DNA*-Menge selbst gegenüber höchsten *DNA*ase-Konzentrationen als widerstandsfähig (Abb. 3b). Der Gehalt der „petite“-Mitochondrien an *DNA*ase-resistenter *DNA* betrug ungefähr 2 µg/mg Protein.

### Diskussion

Obwohl in zunehmendem Maße klar geworden ist, daß extrachromosomalen Mutationen — zumindest bei grünen Pflanzen und Mikroorganismen — eine beträchtliche Bedeutung zukommt, weiß man über ihren Mechanismus nur wenig. Zu den genetisch und biochemisch am besten untersuchten extrachromosomalen Mutationen gehört jene, die bei *Saccharomyces cerevisiae* in irreversibler Weise zum Auftreten von atemungsdefizienten „petite colonie“-Stämmen führt, deren Mitochondrien die Fähigkeit zur Atmung eingebüßt haben<sup>19, 23</sup>. Diese Mutation beansprucht allgemeines Interesse, da sie eine extrachromosomale genetische Steuerung von Zellorganellen, die in allen höher entwickelten atmenden Zellen anzutreffen sind, offenbart.

Die Natur der extrachromosomalen genetischen Faktoren, die von der „petite“-Mutation betroffen werden, ist nicht bekannt. Der Nachweis von *DNA* in den Mitochondrien der normalen atmenden Bäckerhefe ließ jedoch vermuten, daß die unbekannt genen genetischen Determinanten in der mitochondrialen *DNA* zu suchen sind. Die cytoplasmatische „petite“-Mutation der Bäckerhefe könnte demnach auf einem Verlust oder auf einer Modifikation der mitochondrialen *DNA* beruhen. Diese Hypothese zeichnet sich dadurch aus, daß sie mit derzeit zur Verfügung stehenden Methoden experimentell geprüft werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen sprechen dafür, daß auch die zur Atmung nicht befähigten Mitochondrien der „petite“-Mutante *DNA* enthalten. Da die Mitochondrienfraktion der Mutante sich in der Ultrazentrifuge durch Flotation in Dichtegradienten nicht reinigen ließ, konnte der Nachweis intramitochondrialer *DNA* erst nach einem selektiven Abbau nichtmitochondrialer *DNA* durch *DNA*ase geführt werden. Mit dieser indirekten Methode zur Bestimmung von Mitochondrien-*DNA* waren für Mitochondrien normaler Bäcker-

hefe *DNA*-Werte erhalten worden, die mit den durch direkte Analyse von durch Flotation gereinigten Mitochondrien ermittelten *DNA*-Werten gut übereinstimmen.

Auf Grund der hier berichteten Resultate, die allerdings noch der Bestätigung durch eine Isolierung und Charakterisierung der in den Mitochondrien der „petite“-Mutante anwesenden *DNA* bedürfen, ist es sehr wahrscheinlich, daß die „petite“-Mutation nicht auf einen vollständigen Verlust der mitochondrialen *DNA* zurückgeht. Die Frage bleibt offen, ob sie auf einem teilweisen Verlust oder auf einer Modifikation der in normalen Hefemitochondrien vorhandenen *DNA* beruht.

Der Befund, daß auch die mitochondrien-ähnlichen, Succinatdehydrogenase tragenden Partikeln der unter Ausschluß von Sauerstoff kultivierten Hefe *DNA* enthalten, bekräftigt die in einer früheren Mitteilung<sup>24</sup> geäußerte Vermutung, daß sie „Promitochondrien“ sind, die bei Belüftung der anaerob gezüchteten Zellen adaptiv in typische, voll funktionfähige Mitochondrien umgewandelt werden. Nach dieser Hypothese wäre zu erwarten, daß die in den „Promitochondrien“ der anaeroben Hefe anwesende *DNA* eine gleiche oder sehr ähnliche Basenzusammensetzung besitzt wie die *DNA* normaler Hefemitochondrien. Eine experimentelle Verifizierung dieser Voraussage wäre im Hinblick auf die noch unbewiesene Rolle extranuklearer *DNA* bei der Entwicklung der Hefemitochondrien von besonderem Interesse.

### Material und Methoden

Das Röntgenkontrastmittel „Urografin“ (eine Mischung des Natrium- und Methylglucaminsalzes der N,N'-Diacetyl-3,5-diamino-2,4,6-trijodbenzoesäure im Verhältnis von 10:66) wurde von der Firma Schering in Form einer 76proz. sterilen Lösung (Dichte 1,42 g/ml), die außerdem noch 0,04% *EDTA* und 0,32% Natriumcitrat enthielt, bezogen. Urografinlösungen der Dichte 1,10 (18%) und 1,20 (38%), die zur Herstellung von Dichtegradienten dienten, wurden durch entsprechende Verdünnung der 76proz. Lösung mit „*MTE*“-Medium (0,25 *m*-Mannit, 20 *mm* Tris-Puffer, pH 7,4, 1 *mm* *EDTA*) erhalten. Pankreas-*DNA*ase stammte von der Fa. Fluka A.G., Buchs, Lachssperma-*DNA* von der California Corp. for Biochem. Research. Das zur kolorimetrischen Bestimmung der *DNA* verwendete Indol war ein Präparat der Mann Research Laboratories; es wurde durch Umkristallisieren aus Petroläther gereinigt.

Normale Bäckerhefe (Stamm W<sup>22</sup>) wurde in einem ursprünglich von *Ephrussi* und *Slonimski*<sup>28</sup> beschriebenen Medium gezüchtet, das jedoch für die hier durchgeführten Versuche geringfügig modifiziert wurde: Es enthält im Liter 8 g Glucose, 3 g Hefeextrakt (Difco), 0,7 g MgCl<sub>2</sub>, 0,4 g CaCl<sub>2</sub>, 0,5 g NaCl, 0,5 ml 1proz. FeCl<sub>3</sub>-Lösung, 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie 2 Tropfen einer Antischaumemulsion auf Siliconbasis (Wacker-Chemie). Die Hefezellen wurden zunächst in 100 ml-Kölbchen in 30 ml Medium über Nacht bei 28° unter Schütteln vorgezüchtet. Die gesamte Vorkultur wurde sodann

<sup>28</sup> B. *Ephrussi* und P. P. *Slonimski*, Biochim. Biophys. Acta 6, 256 (1950).



unter sterilen Bedingungen in 6 l frisches Medium eingetragen. Die weitere Züchtung erfolgte bei 28° unter dauerndem Schütteln und starker Durchströmung mit durch Watte gefilterter Preßluft. Das Wachstum der Kultur wurde an steril entnommenen Proben durch Nephelometrie verfolgt. Sobald die stationäre Wachstumsphase erreicht war (gewöhnlich nach 14 bis 17 Stdn.), wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet und zweimal mit dest. Wasser sowie schließlich mit kaltem *MTE*-Medium gewaschen.

Für die *anaerobe Züchtung* der Hefezellen wurde das oben angegebene Medium verwendet, das jedoch zusätzlich je Liter 92 g Glucose sowie 3 ml einer Ergosterinlösung, zu deren Herstellung 200 mg Ergosterin und 44 ml Tween-80 mit 95proz. Äthanol auf ein Volumen von 100 ml gebracht wurden, enthielt. Während der ersten 3 Stdn. der Züchtung wurden die mit einem Gärrohr versehenen Zuchtkolben kontinuierlich mit Reinststickstoff begast. Dann wurde jegliche Gaszufuhr von außen unterbrochen; für den weiteren Verlauf der Züchtung gewährleistete das durch die intensive Gärung gebildete CO<sub>2</sub> eine befriedigende Anaerobiose. Die Züchtung erfolgte im übrigen auf gleiche Weise wie die der normalen aeroben Hefezellen. Sobald die stationäre Phase (nach etwa 25 Stdn.) erreicht war, wurde auch das Gärrohr verschlossen und der Inhalt des dicht geschlossenen Zuchtkolbens auf 0° abgekühlt, um eine Sauerstoffadaptation der Zellen nach Öffnung des Kolbens zu vermeiden. Die Zellen wurden dann bei 0 bis 5° möglichst schnell durch Zentrifugieren isoliert, zweimal mit dest. Wasser und einmal mit *MTE*-Medium gewaschen und sofort homogenisiert.

Die Züchtung der „*petite*“-Mutante erfolgte auf die gleiche Art wie die der normalen Hefezellen.

Die *Homogenisationsbedingungen* waren wie folgt: Die gewaschenen und in *MTE*-Medium suspendierten Hefezellen wurden in einem gekühlten *Merkenschlager*-Homogenisator<sup>29</sup> (Fa. Braun, Melsungen) mit Glasperlen (0,45 bis 0,50 mm Durchmesser) 20 Sek. bei 4000 Perioden/Min. geschüttelt. Diese kurze Homogenisierung brach ungefähr ein Drittel der Hefezellen auf. Die trübe Suspension wurde von den Glasperlen durch Dekantieren getrennt. Alle folgenden Aufbereitungsschritte wurden bei einer Temp. von 0 bis 5° ausgeführt.

*Isolierung roher subzellulärer Fraktionen durch differentiellles Zentrifugieren.* Die Homogenate wurden zunächst zweimal je 10 Min. bei 1500 × g zentrifugiert, um unversehrt geliebene Zellen sowie größere Zelltrümmer zu entfernen. Die Homogenate aerob gezüchteter normaler Hefezellen wurden sodann 30 Min. bei 20000 UpM im Rotor Nr. 40 der Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert und die so erhaltenen Mitochondriensedimente zweimal durch Wiederaufnahmen in *MTE*-Medium und neuerliches Zentrifugieren gewaschen. Die Isolierung der mitochondrien-ähnlichen Partikeln aus anaerob gezüchteter Bäckerhefe<sup>24</sup> erforderte ein 90 Min. langes Zentrifugieren der Homogenate dieser Zellen bei 40000 UpM im Rotor Nr. 40; das Sediment wurde in *MTE*-Medium wieder suspendiert und 60 Min. bei 40000 UpM neuerlich zentrifugiert. Die Homogenate der „*petite*“-Mutante wurden 10 Min. bei 10000 UpM im Rotor Nr. 40 zentrifugiert und die dabei sedimentierten rohen Mitochondrienfraktionen durch zweimalige Wiederholung der Zentrifugation in *MTE*-Medium gewaschen.

*Reinigung der rohen Partikel fraktionen durch isopyknische Flotation.* Die durch differentiellles Zentrifugieren gewonnenen unreinen Teilchenfraktionen

<sup>29</sup> M. M. Merckenschlager, K. Schloßmann und W. Kurz, *Biochem. Z.* **329**, 332 (1957).

wurden in möglichst wenig *MTE*-Medium suspendiert. Durch Zusatz einer 76proz. Urografinlösung wurde das spezif. Gewicht dieser Suspension sodann auf 1,23—1,25 g/ml gebracht. Je 5 ml dieser Suspension wurden in Plastik-Zentrifugenröhrchen, die in den Spinco-Ausschwingrotor SW 25 paßten, mit einem linearen Urografin-Dichtegradienten<sup>1</sup> überschichtet. Das Volumen des Dichtegradienten, der durch Mischen einer 18proz. (spezif. Gew. 1,10 g/ml) und einer 38proz. (spezif. Gew. 1,20 g/ml) Urografinlösung in der von Bock und Ling<sup>30</sup> beschriebenen Apparatur erhalten wurde, betrug 25 ml. Die für die Flotation erforderliche Zentrifugierdauer belief sich bei 25000 UpM je nach dem zu trennenden Teilchengemisch auf 3 bis 16 Stdn. Nach Ende der Flotation wurden die Partikelbanden von oben her mit Hilfe einer Injektions-spritze, deren Kanüle eine rechtwinkelig abgebogene Spitze besaß, entnommen. Die aus den drei Zentrifugenbechern des Rotors SW 25 isolierten Fraktionen gleichen spezif. Gewichts wurden sodann vereinigt, mit *MTE*-Medium auf mindestens das vierfache Volumen verdünnt und eine Stde. bei 30000 UpM im Rotor Nr. 30 oder 20 Min. bei 38000 UpM im Rotor Nr. 40 zentrifugiert. Die sedimentierten Partikel wurden durch Aufnehmen in *MTE*-Medium und neuerliches Zentrifugieren mindestens zweimal gewaschen, dann in einem geringen Volumen Wasser suspendiert und auf ihren *DNA*- und Eiweißgehalt untersucht.

*DNA-Bestimmung nach der modifizierten Indolmethode.* Die zu untersuchende Probe wurde in 5proz. (0,84 *m*) Perchlorsäure 20 Min. bei 70° hydrolysiert. Aliquote des Hydrolysates (je 0,5 ml mit einem *DNA*-Gehalt von 2,5 bis 12,5 µg) wurden mit 0,25 ml 0,04proz. wäßr. Indollösung und 0,25 ml konz. HCl gemischt und 18 Stdn. bei 37° inkubiert. Das Gemisch wurde sodann dreimal mit je 1 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert, um störendes gefärbtes Material zu entfernen. Das zur Extraktion verwendete CHCl<sub>3</sub> war zuvor von begleitendem Äthanol durch Behandeln mit wasserfreiem CaCl<sub>2</sub> und nachfolgende Destillation gereinigt worden. Die Extinktion der nunmehr braungelb gefärbten wäßr. Phase wurde sodann in 0,5 ml-Küvetten (Schichtdicke 1 cm) bei 490 mµ gemessen. Als optischer Vergleich diente eine *DNA*-freie Probe, die auf genau gleiche Weise wie die *DNA* enthaltenden Proben aufgearbeitet worden war.

*DNA-Bestimmung in subzellulären Partikeln.* Suspensionen der gewaschenen subzellulären Teilchen wurden zunächst in der Kälte mit einem gleichen Volumen alkohol. Perchlorsäure (10% HClO<sub>4</sub> in 70proz. Äthanol) versetzt. Das ausgefällte Material wurde in einer gekühlten Zentrifuge bei 1500 × *g* abzentrifugiert und mit 5proz. Perchlorsäure in 50proz. Äthanol, sodann mit 70proz. Äthanol gewaschen, um Desoxyribose enthaltende säurelösliche Verbindungen zu eliminieren. Zur Entfernung störender Lipide wurde der säureunlösliche Rückstand hierauf noch mit einer Äthanol—Äther-Mischung (3:1) bei Zimmertemp. extrahiert. Die Hydrolyse mit 5proz. Perchlorsäure bei 70° sowie die kolorimetrische *DNA*-Bestimmung nach der modifizierten Indolmethode erfolgten sodann auf die oben beschriebene Weise. Der *DNA*-Gehalt der subzellulären Fraktionen wurde stets in µg *DNA*/mg Partikelprotein ausgedrückt. Die Bestimmung des Proteins nach der Methode von Lowry et al.<sup>31</sup> wurde in Gegenwart von 0,5% Desoxycholat ausgeführt, um partikelgebundenes Eiweiß zu solubilisieren; die Methode wurde mit kristallisiertem Rinderserumalbumin geeicht.

<sup>30</sup> R. M. Bock und N. S. Ling, Anal. Chem. **26**, 1543 (1954).

<sup>31</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).

*Abbau mitochondrialer DNA durch DNAase bei 26°.* Durch Flotation gereinigte normale Hefemitochondrien (mit einem Proteingehalt von etwa 4 mg und einem DNA-Gehalt von etwa 15  $\mu$ g) wurden in 2 ml 8 mm-Acetatpuffer (pH 6,6), der 50 mm MgCl<sub>2</sub> und 0,05% Gelatine enthielt, suspendiert und 2 Stdn. bei 26° mit 0,3 mg DNAase inkubiert. Als Kontrolle diente eine unter gleichen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von DNAase inkubierte Mitochondrienprobe.

*Selektiver Abbau extramitochondrialer DNA in rohen Mitochondrienfraktionen durch DNAase bei 4°.* Aliquote einer aus normaler oder aus atemungsdefizienter Bäckerhefe durch differentielles Zentrifugieren gewonnenen Mitochondrienfraktion wurden mit unterschiedlichen DNAase-Mengen versetzt und eine Stde. bei 4° inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt 0,25 m Mannit, 20 mm Tris-Puffer (pH 7,4), 50 mm MgCl<sub>2</sub> und 0,1% Gelatine. Nach der Inkubation wurden die Proben mit kaltem MTE-Medium verdünnt und 15 Min. im Spinco-Rotor Nr. 30 bei 29000 UpM zentrifugiert. Nachdem die sedimentierten Teilchen durch neuerliches Zentrifugieren in MTE-Medium gewaschen und sodann von säurelöslichem Material und von Lipiden befreit worden waren, wurde ihr Gehalt an Protein und DNA auf die oben angegebene Weise ermittelt.

Diese Arbeit erfolgte mit Unterstützung des U.S. Public Health Service (Grants No. 11225-01 und 11225-02 aus dem National Institute of General Medical Sciences).

Die Autoren sind Herrn Dr. O. Klose (Fa. Schering, Wien) für die Überlassung wertvoller Urografen-Mengen zu großem Dank verpflichtet.