

## Untersuchungen an den freien Nucleotiden aus Hefe nach Gamma-Bestrahlung

Von

G. Stehlik und H. Altmann

Aus dem Institut für Biologie und Landwirtschaft  
des Reaktorzentrums Seibersdorf\*

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 26. September 1967)

*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* wurde  $0,3 \times 10^6$  rad  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung wurde der Einbau von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  in die freien Nucleotide untersucht. Die ausgeprägteste Veränderung gegenüber einer nichtbestrahlten Kontrolle war eine Abnahme der Menge und Radioaktivität von Adenosintriphosphat bei gleichzeitigem Anstieg von Adenosinmonophosphat. Auch bei Uridin-5'-diphosphat-N-acetylglucosamin und Uridin-5'-diphosphat-mannose ergaben sich quantitative Verschiebungen.

*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* was gamma-irradiated at a dose of  $0.3 \times 10^6$  rad  $^{60}\text{Co}$ . At different times after irradiation the incorporation of  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  into the acid-soluble nucleotides was investigated. The most noticeable change with respect to a non irradiated control was the decrease in the quantity and radioactivity of adenosine triphosphate concomitant with an increase in adenosine monophosphate. A quantitative shift in the amounts of uridine-5'-diphosphate N-acetyl-glucosamines and uridine-5'-diphosphate mannose was also observed.

In vorangegangenen Untersuchungen beobachteten wir<sup>1, 2</sup> eine Verminderung der Syntheserate von Desoxyribonucleinsäure (DNS) in Hefe-

\* Postanschrift: A-1080 Wien, Lenaug. 10.

<sup>1</sup> K. Kaindl, H. Altmann, H. Gaisch, K. Prosenz und G. Stehlik, IAEA, Technical Report 54, 177—180 (1966).

<sup>2</sup> K. Kaindl, H. Altmann, G. Stehlik und H. Gaisch, SGAE/IBL 9, 1—7 (1964).

zellen, die 300 000 rad  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung ausgesetzt waren. Welche Stoffwechselveränderungen für diese Unterdrückung der *DNS*-Synthese verantwortlich sind, ist noch weitgehend ungeklärt. Um den Hemmungsmechanismus der *DNS*-Synthese näher zu beleuchten, wurden in dieser Arbeit die Veränderungen in den Vorstufen der Nucleinsäuresynthese untersucht.

Der Pool der freien Nucleotide in der Hefe besteht hauptsächlich aus Ribonucleotiden, da hier erstens die Ribonucleinsäure (*RNS*) den Hauptanteil an der Gesamtnucleinsäure der Zelle darstellt und zweitens der überwiegende Teil der Desoxyribonucleotide nur unmittelbar vor bzw. während des *DNS*-Synthesestadiums in der Zelle aus diesen Ribonucleotiden mit Hilfe von Reduktasen gebildet wird. Diese hauptsächlich für die Nucleinsäuresynthese notwendigen Mono-, Di- und Triphosphate der Nucleoside sind ebenso wie die gruppenübertragenden freien Nucleoside und Zuckerphosphate wichtige Zwischenprodukte oder Co-Enzyme des Stoffwechsels der Zelle. Durch ihre Bestimmung kann man also einen guten Einblick in den Allgemeinzustand, in dem sich die Zelle befindet, gewinnen und somit die durch verschiedene Behandlungsmethoden erzielten Schädigungen der Zelle studieren. Man kann den Aussagewert dieser Analysen dadurch noch bedeutend erhöhen, daß man vor der Isolierung der genannten Verbindungen radioaktiv markierte Vorstufen, wie z. B.  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ , von der Zelle in diese Verbindungen einbauen läßt. Dadurch kann man in den meisten Fällen eine neu synthetisierte Verbindung von einem Um- oder Abbauprodukt einer bereits vorhandenen Substanz unterscheiden.

## Experimenteller Teil

### *Anzucht, Bestrahlung und Charakterisierung des Wachstumsstadiums der Hefezellen*

Um eine möglichst homogene Population zu bekommen, wurde unser Untersuchungsmaterial aus einer diploiden Einzelzelle des äußerst radioresistenten Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* in einem halbsynthet. Nährmedium<sup>3</sup> herangezogen. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden aliquote Mengen (je 20 g Hefefeuchtgewicht), in 200 ml frischem Nährmedium suspendiert und 0,3 Mrad einer  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung ausgesetzt („Gammacell 200“; 76 krad/Stde.). Anschließend wurde mit halbsynthet. Nährmedium auf 3,0 l verdünnt und bei 24° C geschüttelt. Gleichzeitig wurde auch bei dieser Temp. an einem aliquoten Teil dieser Hefesuspension in einem Apparat nach *Warburg* die  $\text{CO}_2$ -Produktion gemessen (Meßdauer jeweils 10 Min.; Schüttelamplitude 20 mm; Schüttelfrequenz 90/Min.; Kolbenvolumen 16 ml; Volumen der Hefekultur 6 ml; Gasatmosphäre:  $\text{N}_2$ ). Die logarithmische Darstellung dieser  $\text{CO}_2$ -Produktion in Ab-

<sup>3</sup> G. Stehlik und K. Kaindl, Food Irradiation, STI/PUB/127, IAEA, Vienna 299 (1966).

hängigkeit von der Zeit ergibt eine Gerade, deren Anstieg ein Maß für die Vermehrung der Hefe und deren Ordinatenabschnitt ein Maß für die Gärungsintensität ist<sup>4</sup>.

Für die Untersuchungen an den freien Nucleotiden wurden zu verschiedenen Zeiten, die in Abb. 2 durch Pfeile gekennzeichnet sind, die Hefezellen durch Zentrifugation abgetrennt.

#### *Einfluß von Gammastrahlung auf das Überleben von Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus*

3 ml Portionen der Hefesuspension in logarithmischer Wachstumsphase (etwa  $0,9 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in gut belüfteten Glasgefäßen von 5 ml Inhalt verschiedenen Dosen einer <sup>60</sup>Co-Gammastrahlung (Dosis  $0,8 \times 10^6$  rad/Stde.) bei Raumtemp. ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben mit Ringerlösung verdünnt, je 0,4 ml-Portionen auf Agarplatten aufgebracht und bei 28° C bebrütet, wobei ebenfalls das halbsynthet. Nährsubstrat verwendet wurde. Nach 36 Stdn. wurden die gebildeten Kolonien gezählt. In Abb. 1 wurde der Bruchteil der überlebenden Hefezellen  $N/N_0$  gegen die Gammastrahlendosis aufgetragen.

#### *Einbau von radioaktivem Phosphat in die Zellen*

Proben zu je 20 g Feuchtgewicht wurden in 250 ml frischem Nährmedium suspendiert (entspricht etwa  $8 \times 10^8$  Zellen pro ml) und bei 24° C während 30 Min. in einer Flasche von 1250 ml Inhalt geschüttelt. Nach Zugabe einer Lösung von 50 µc <sup>32</sup>P als  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (100 mc/M) wurde während 20 Min. heftig geschüttelt. Nach Beendigung dieses Phosphateinbaues fügte man zur Blockierung und Entschäumung 5 Tropfen *n*-Octanol zu und zentrifugierte die Hefezellen schnell mit Hilfe einer kontinuierlichen Durchflußzentrifuge in der Kälte ab. Zur Entfernung des adsorptiv gebundenen  $\text{PO}_4^{3-}$  wurden die Zellen in Waschwasser (enthaltend 5% Maltose und 0,045% inaktives  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) suspendiert und sofort rezentrifugiert.

#### *Isolierung, Auftrennung und Identifizierung der freien Nucleotide*

Das abzentrifugierte Zellmaterial wurde in flüssigen  $\text{N}_2$  eingebracht und anschließend mit 150 ml 0,6*n*- $\text{HClO}_4$  (PCA) 4 Min. in einem Mixer homogenisiert, wobei man die Temp. nie über 4° C ansteigen ließ. Nach Zentrifugieren wurde der Rückstand erneut in flüssigen  $\text{N}_2$  eingebracht und mit weiteren 150 ml dieser PCA homogenisiert. Die vereinigten überstehenden Lösungen wurden nach Filtration in der Kälte sofort mit 5*n*-KOH auf pH 7,0 gebracht, das ausgefällte  $\text{KClO}_4$  nach einigen Stdn. in der Kälte abfiltriert und mit 60proz. Äthanol nachgewaschen. Um das  $\text{KClO}_4$  möglichst vollständig entfernen zu können, wurden Extrakt und Waschkohol (Gesamtvolumen etwa 600 ml) bei 4° C im Vak. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers auf etwa 60 ml eingengt. Nach Filtration und Nachwaschen mit 60proz. Äthanol wurde der die freien Nucleotide enthaltende Extrakt mit 5proz.  $\text{NH}_3$ -Lösung auf pH 8 gebracht, alle sauren Verbindungen an einer formiatbeladenen Anionenaustauschersäule (DOWEX 1  $\times$  10; 0,74 cm<sup>2</sup>  $\times$  40 cm) adsorbiert und mit 20 ml schwach ammoniakal. Wasser nachgewaschen. Die Fraktionierung der freien Nucleotide und Zuckerphosphate erfolgte nach der Methode von Cohn<sup>5</sup> in

<sup>4</sup> H. Gaisch und K. Kaindl, Z. Naturforsch. **18 b**, 1070 (1963).

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

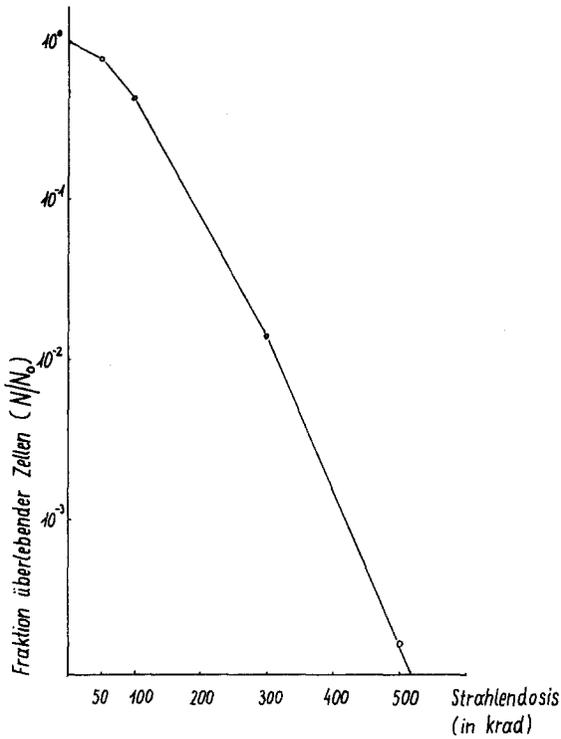


Abb. 1. Einfluß von  $\gamma$ -Bestrahlung auf das Überleben von *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*

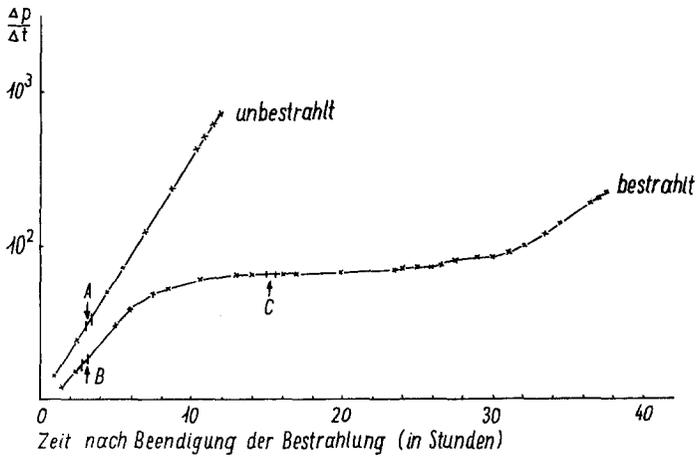


Abb. 2. Vermehrung von unbestrahltem und bestrahltem (0,3 Mrad  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung) *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (gemessen in einem Warburgapparat bei 25° C)

der „gradient elution“-Modifikation von *Hurlbert et al.*<sup>6</sup>. In der Mischflasche befanden sich 300 ml Wasser, in der Vorratsflasche wurde das Elutionsmittel nach folgendem Schema gewechselt:

I: 1,0*n*-HCOOH (Fraktion Nr. 1—20)

II: 4,0*n*-HCOOH (Fraktion Nr. 21—130)

III: 4,0*n*-HCOOH + 0,2*m*-HCOONH<sub>4</sub> (Fraktion Nr. 131—190)

IV: 4,0*n*-HCOOH + 0,4*m*-HCOONH<sub>4</sub> (Fraktion Nr. 191—320)

V: 4,0*n*-HCOOH + 0,8*m*-HCOONH<sub>4</sub> (Fraktion Nr. 321—465)

Mit Hilfe von LKB-Fraktionskollektoren wurden Fraktionen zu je 5,5 ml genommen, in einem Zeiss PMQ II Spektralphotometer die Extinktionen bei 260 und 280 nm für 1 cm Schichtdicke gemessen und nach Eindampfen aliquoter Teile in Aluminiumschälchen die <sup>32</sup>P-Aktivität mit einem 2π-Methandurchflußzähler bestimmt. Zur Identifizierung der Nucleotide diente das Verhältnis der Extinktionen bei 280 und 260 nm. Bei Substanzgemischen wurden die Fraktionen eines peaks nach der Extinktionsmessung zusammengefaßt, gefriergetrocknet, das Ammonformiat im Hochvak. bei etwa 30° C wegsublimiert und die Nucleotide durch Papierchromatographie weiter aufgetrennt. Als Lösungsmittel wurden dabei für die erste Dimension *t*-Butanol : Ameisensäure : Wasser (8 : 3 : 4), für die zweite Dimension *n*-Propanol : 25proz. NH<sub>3</sub> : Wasser (6 : 3 : 1) verwendet. Mit Hilfe des Photoprint-Verfahrens von *Markham* und *Smith*<sup>7</sup> wurde im UV-Bereich die Lage der Nucleotidspots festgestellt. Nach Elution mit 0,1*n*-HCl wurden zur Charakterisierung die UV-Spektren für verschiedene pH-Werte aufgenommen.

### Ergebnisse und Diskussion

Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß nach einer Bestrahlung mit 300 000 rad nur ein relativ kleiner Prozentsatz der Hefezellen noch zu einer Kolonienbildung auf Agar-Platten befähigt ist; jedoch sind die meisten der enzymatisch bedingten Reaktionen der Zelle viel strahlenresistenter.

Die Abb. 2 zeigt, daß die Vermehrung in den ersten 5 Stunden nach der Bestrahlung annähernd mit der unbestrahlten Probe parallel verläuft. Zwischen der 10. und 30. Stunde nach Beendigung der Bestrahlung wird ein Plateau durchlaufen, in dem praktisch keine Hefevermehrung stattfindet; anschließend daran kommt die Hefe wieder in eine logarithmische Wachstumsphase.

In den Abb. 3—5 sind die säulenchromatographischen Auftrennungen der aus *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* isolierten freien Nucleotide eingezeichnet.

Auf der Abszisse ist die Fraktionszahl angegeben, auf der Ordinate links die Extinktion, gemessen bei 260 nm für 1 cm Schichtdicke, und

<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*, Biochem. J. **45**, 294 (1949).

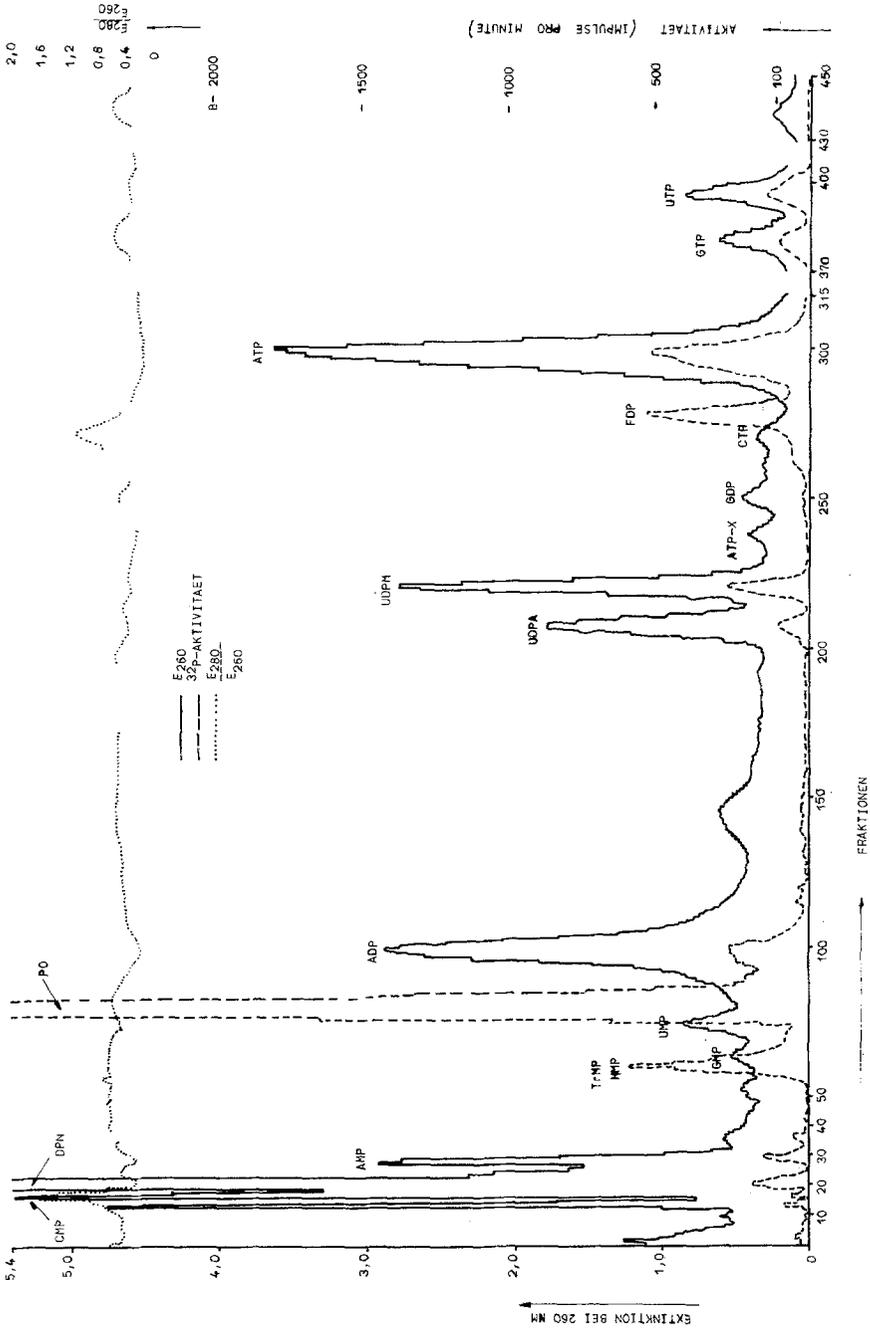


Abb. 3. Auftrennung der freien Nucleotide aus Hefe in logarithmischer Vermehrungsphase (s. Punkt A in Abb. 2) nach Einbau von <sup>32</sup>P<sub>04</sub><sup>3-</sup> an Dowex 1 × 10; (0,74 cm<sup>2</sup> × 40 cm)

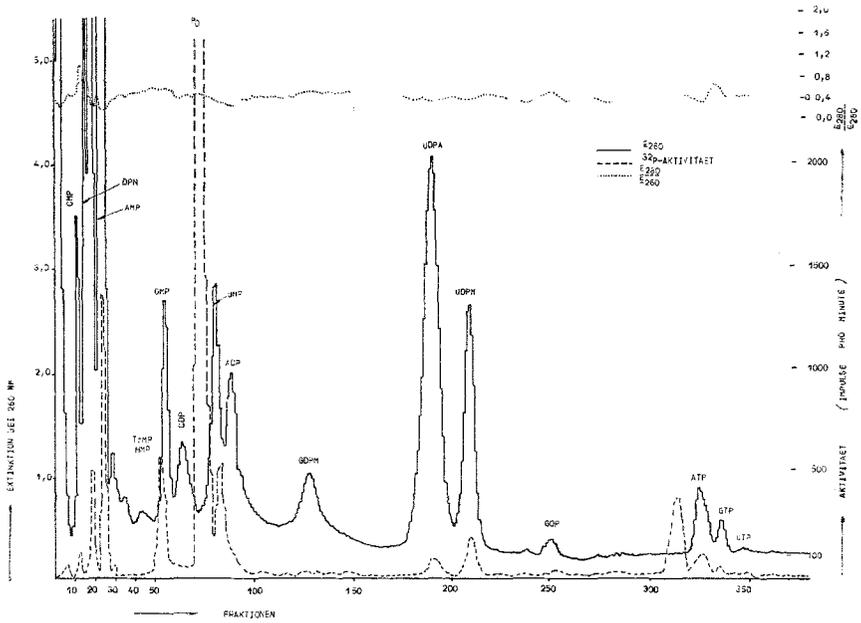


Abb. 4. Auftrennung der freien Nucleotide aus Hefe, 3 Std. nach Bestrahlung mit  $0,3 \times 10^6$  rad  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung (s. Punkt B in Abb. 2), nach Einbau von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  an Dowex  $1 \times 10$  ( $0,74 \text{ cm}^2 \times 40 \text{ cm}$ )

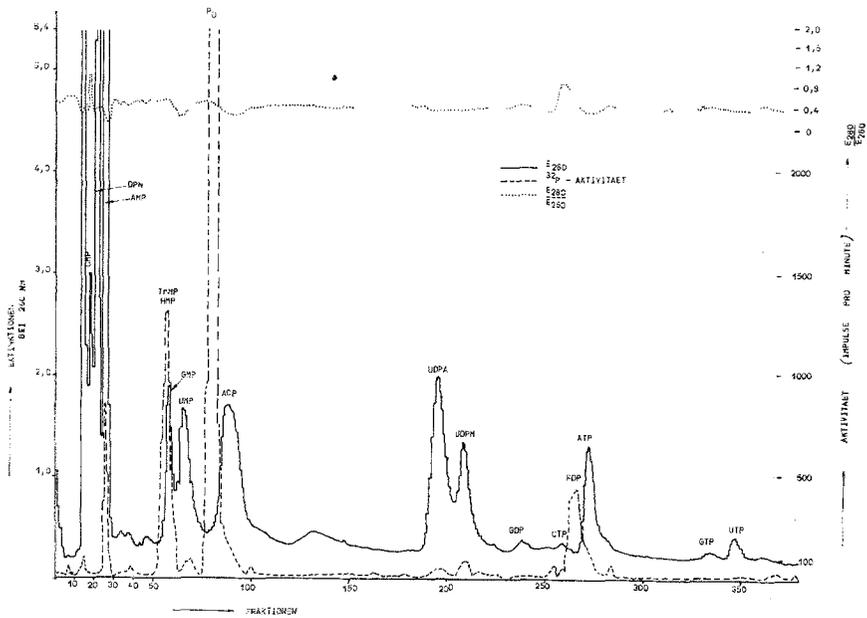


Abb. 5. Auftrennung der freien Nucleotide aus Hefe, 15 Std. nach der Bestrahlung mit  $0,3 \times 10^6$  rad  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung (s. Punkt C in Abb. 2), nach Einbau von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  an Dowex  $1 \times 10$  ( $0,74 \text{ cm}^2 \times 40 \text{ cm}$ )

rechts unten die gefundene Radioaktivität in Impulsen pro Minute. Rechts oben wurde zur Charakterisierung der einzelnen Nucleotidpeaks der Quotient der Extinktion bei 280 nm zu der bei 260 nm angegeben. Die in diesen Abbildungen verwendeten Abkürzungen sind in Tab. 1 erklärt.

Tabelle 1. Für die freien Nucleotide verwendete Abkürzungen

---

<i>CMP</i>	Cytidin-5'-monophosphat
<i>DPN</i>	Diphosphopyridinnucleotid
<i>AMP</i>	Adenosin-5'-monophosphat
<i>TrMP</i>	Triosemonophosphat
<i>HMP</i>	Hexosemonophosphat
<i>GMP</i>	Guanosin-5'-monophosphat
<i>UMP</i>	Uridin-5'-monophosphat
<i>P<sub>o</sub></i>	anorgan. Phosphat
<i>ADP</i>	Adenosin-5'-diphosphat
<i>GDPM</i>	Guanosin-5'-diphosphat-mannose
<i>UDPA</i>	Uridin-5'-diphosphat-N-acetylglucosamin
<i>UDPM</i>	Uridin-5'-diphosphat-mannose
<i>UDP</i>	Uridin-5'-diphosphat
<i>ATP-X</i>	Adenosin-2'-monophosphat-5'-diphosphat-ribose
<i>GDP</i>	Guanosin-5'-diphosphat
<i>CTP</i>	Cytidin-5'-triphosphat
<i>FDP</i>	Fructose-1,6-diphosphat
<i>ATP</i>	Adenosin-5'-triphosphat
<i>GTP</i>	Guanosin-5'-triphosphat
<i>UTP</i>	Uridin-5'-triphosphat

In Abb. 3 sind die Kontrollwerte für die unbestrahlten freien Nucleotide der Hefe in ihrer logarithmischen Wachstumsphase (s. Punkt A in Abb. 2) wiedergegeben. In Abb. 4 wird eine Auftrennung der Nucleotide gezeigt, die 3 Stunden nach der Bestrahlung aus der Hefe extrahiert worden waren (s. Punkt B in Abb. 2), die sich zu diesem Zeitpunkt in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befand. Für Abb. 5 sind die freien Nucleotide 15 Stunden nach der Bestrahlung (s. Punkt C in Abb. 2) extrahiert worden. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Hefe in einer stationären Phase. Einzelne Aktivitätspeaks, die nicht mit den UV-peaks korrespondieren, sind Zuckerphosphat bzw. anorganischem Phosphat zuzuschreiben. Die charakteristischste Veränderung in Abb. 4 und 5 war die *ATP*-Abnahme bei gleichzeitigem *AMP*-Anstieg. Auch die gruppenübertragenden Co-Fermente *UDPA* und *UDPM* zeigten eine quantitative Verschiebung. Bei den Nucleosidphosphaten, die 5 Stunden nach der Bestrahlung markiert und extrahiert wurden, zeigt sich für *CMP* eine mengenmäßig geringe Abnahme gegenüber der Kontrolle, dagegen steigt für das *AMP* sowohl die Gesamtmenge als auch die Aktivität stark an. Ebenso erfolgt ein deutlicher Anstieg in der Menge von *GMP* und *UMP*. Für die 15 Stunden nach der Bestrahlung isolierten Nucleotide blieb bei

sämtlichen Monophosphaten sowohl Aktivität als auch Gesamtkonzentration weitgehend denjenigen gleich, welche in Abb. 4 wiedergegeben sind. Bei *ADP* ist sowohl 5 als auch 15 Stunden nach der Bestrahlung eine mengen- und aktivitätsmäßige Abnahme feststellbar. Die gruppen-übertragenden Co-Enzyme *UDPA* und *UDPM* zeigen eine Umkehrung in ihren Konzentrationen nach der Bestrahlung bei einer geringfügigen Abnahme ihrer Radioaktivität. Die stärkste Veränderung zeigen die Nucleosidtriphosphate, besonders charakterisiert durch den starken Abfall von *ATP* nach der Bestrahlung. Bei den Zuckerphosphaten zeigte sich in allen bestrahlten Proben ein Anstieg in dem Peak für Triose- und Hexosemonophosphate. Da keine weitere Trennung dieser Zuckerphosphate erfolgte, kann man in diesem Falle nicht entscheiden, an welcher Stelle eine strahlenbedingte Blockierung eintritt.

Abschließend kann gesagt werden, daß in der Hefe durch  $\gamma$ -Bestrahlung mit  $0,3 \times 10^6$  rad die Bildung von energiereichen Phosphatbindungen, besonders von *ATP*, stark vermindert wird. Das am Zellwandaufbau beteiligte *UDPA* sammelt sich nach der Bestrahlung im pool der freien Nucleotide in der Zelle an und dürfte ein Abbauprodukt der Zellwand darstellen. Bei der Schädigung der Zelle durch Bestrahlung spielen naturgemäß sehr viele Faktoren eine Rolle, wobei aber dem stark verminderten *ATP* eine Schlüsselstellung zuzuschreiben ist.

Für eine Subvention zur Durchführung dieser Arbeiten danken wir dem Bundesministerium für Handel, Gewerbe und Industrie, Sektion IV, Abteilung 30.