

δ -Aminolävulinsäure-Synthetase in Bäckerhefe. Vergleichende Untersuchung des Enzyms in Wildstamm und Petite-Mutante*

Von

H. Tuppy und G. Wiehe

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 12. Mai 1971)

δ -Aminolevulinic Acid Synthetase in Baker's Yeast. Comparative Study of the Enzyme in Wild Type Strain and Petite Mutant

The activity of δ -aminolevulinic acid synthetase was determined using an assay, which allows low levels of the enzyme to be measured. Glucose repression has been excluded as a possible cause for the low values of enzyme activity found.

The activities of δ -aminolevulinic acid synthetase in the aerobically grown wild type and the respiration-deficient petite mutant derived therefrom were rather similar.

In the wild type cells as well as in those of the petite mutant only about 5% of the total δ -aminolevulinic acid synthetase activity was shown to reside in the mitochondrial fraction, the predominant portion of the enzyme being in the soluble fraction.

δ -Aminolävulinsäure-Synthetase wurde in *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe eines für die Messung sehr niedriger Enzymaktivitäten geeigneten Verfahrens bestimmt.

Repression durch Glucose konnte als mögliche Ursache der gefundenen niedrigen Aktivitätswerte ausgeschlossen werden.

In dem aerob gezüchteten Hefe-Wildstamm und einer aus ihm gewonnenen atmungsdefizienten Petite-Mutante war die Enzymaktivität annähernd gleich.

Sowohl in den Zellen des Wildtyps als auch in denen der Petite-Mutante wurden nur etwa 5% der gesamten zellulären Enzymaktivität in der Mitochondrien-, der überwiegende Teil in der löslichen Fraktion gefunden.

Durch cytoplasmatische Mutation erhält man aus dem Wildtyp der Bäckerhefe atmungsdefiziente Petite-Mutanten¹. Ihnen fehlen in der Regel alle mitochondrialen Cytochrome außer Cytochrom c. Das Apo-

* Herrn Prof. Dr. H. Nowotny gewidmet.

¹ P. Slonimski und B. Ephrussi, Ann. Inst. Pasteur 77, 47 (1949).

protein des Cytochroms c wird extramitochondrial synthetisiert². Man könnte nun annehmen, daß die Apoproteine der übrigen Cytochrome mitochondrialen Ursprungs und von der Petite-Mutation betroffen sind. Diese Annahme hat sich jedoch als unrichtig erwiesen. Wie in einer früheren Arbeit beschrieben worden ist, enthalten die Mitochondrien einer Petite-Mutante das Apoprotein der Cytochromoxidase³, obgleich sie keine Cytochromoxidase-Aktivität zeigen. Nach Zugabe von Cytohämin zu ultraschall-behandelten Mitochondrien der Mutante konnte Cytochrom-Aktivität nachgewiesen werden. Daher lag die Vermutung nahe, daß die fehlende Aktivität der Cytochrome in der Mutante auf einem Porphyrinmangel und nicht auf einem Defekt der Apoproteine beruht.

Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese der Porphyrine, die Bildung von δ -Aminolävulinsäure aus Glycin und Succinyl-CoA, wird von δ -Aminolävulinsäure-Synthetase katalysiert⁴⁻⁶. Dieses Enzym ist in eukaryotischen Zellen ausschließlich⁷ oder zumindest überwiegend⁸⁻¹⁰ in den Mitochondrien lokalisiert, während einige in der Biosynthesekette folgende Enzyme außerhalb der Mitochondrien wirken¹¹. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Atmungsdefizienz auf einer durch die cytoplasmatische Mutation bedingten Blockade der mitochondrialen δ -Aminolävulinsäure-Synthetase-Reaktion beruht.

Material und Methoden

Herstellung der Hefezellfraktionen

Der Wildtypstamm von *Saccharomyces cerevisiae*, D-273-10B ($\alpha P\varphi^+$, haploid), und die von ihm durch Acriflavinbehandlung erhaltene Petite-Mutante, D-273-10B-1 ($\alpha P\varphi^-$, haploid), wurden aerob 12 Std. bei 27° gezüchtet. Das Nährmedium enthielt 0.3% Difco-Hefeextrakt, 0.12% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% NaCl, 0.07% $MgCl_2$, 0.04% $CaCl_2$, 0.0005% $FeCl_3$, 0.1%

² B. Kadenbach, Europ. J. Biochem. **12**, 392 (1970).

³ H. Tuppy und G. D. Birkmayer, Europ. J. Biochem. **8**, 237 (1969).

⁴ S. Granick und G. Urata, J. Biol. Chem. **238**, 821 (1963).

⁵ S. Granick, J. Biol. Chem. **241**, 1359 (1966).

⁶ H. S. Marver, A. Collins, D. P. Tschudy und M. Rechigl, jr., J. Biol. Chem. **241**, 4323 (1966).

⁷ E. A. Irving und W. H. Elliott, Proc. Austral. Biochem. Soc., 13th Annual Meeting, Univ. Adelaide, 1969, p. 85.

⁸ P. L. Scholnick, L. E. Hammaker und H. S. Marver, Proc. Natl. Acad. Sci. US **63**, 65 (1969).

⁹ N. Hayashi, B. Yoda und G. Kikuchi, Arch. Biochem. Biophys. **131**, 83 (1969).

¹⁰ D. S. Beattie und R. N. Stuchell, Arch. Biochem. Biophys. **139**, 291 (1970).

¹¹ A. Kappas und S. Granick, J. Biol. Chem. **243**, 346 (1968).

KH_2PO_4 und 2% einer Hexose (Glucose oder Galactose) als hauptsächliche Kohlenstoffquelle. Die Zellen wurden mechanisch, durch Schütteln mit Glasperlen (20 Sek.) im Merckenschlager-Homogenisator¹², aufgebrochen. Nach der Abtrennung größerer Zelltrümmer durch Zentrifugation bei $4000 \times g$ wurden aus dem Homogenat durch Zentrifugation bei $38\,000 \times g$ eine Mitochondrien- und eine lösliche Fraktion gewonnen. Die Mitochondrien-Fraktion wurde anschließend noch 2mal mit dem Homogenisationsmedium (0.25M-Mannit, 0.02M-*Tris*-HCl, pH 7.4, und 1 mM *EDTA*, pH 7.4) gewaschen.

Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase

Die Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase wurde durch Inkubieren der Proben mit ^{14}C -Succinat, CoA, Succinyl-CoA-Synthetase und Glycin und Messung der entstandenen ^{14}C - δ -Aminolävulinsäure ermittelt. Die Durchführung der Inkubation und die Abtrennung der gebildeten ^{14}C - δ -Aminolävulinsäure von überschüssigem ^{14}C -Succinat mittels Dowex-50-Säulenchromatographie erfolgte nach einer von *Irving* und *Elliott*¹³ beschriebenen Methode. Zur vollständigen Trennung der δ -Aminolävulinsäure von sämtlichen im Laufe der Inkubation aus ^{14}C -Succinat entstandenen Verbindungen wurde das folgende Verfahren ausgearbeitet.

Die ^{14}C - δ -Aminolävulinsäure enthaltenden Eluate der Dowex-50-Säulen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft und die Rückstände mit je 0.3 ml Methanol versetzt. Jeweils ein Drittel dieser Lösungen wurde auf ein Whatman 3 MM Papier aufgetragen und anschließend 45 Min. einer Hochspannungselektrophorese in 0.55M-HCOOH, pH 2, bei 56 V/cm unterzogen. Nach dem Trocknen des Papierstreifens bei 120° wurde die δ -Aminolävulinsäure durch Besprühen mit Ninhydrin (1proz. Lösung in *n*-Butanol) und nochmaliges Trocknen sichtbar gemacht. Die gelben, von δ -Aminolävulinsäure stammenden Flecken wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität unter Verwendung von Toluolszintillator in einem Packard-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Sowohl in der Mitochondrien- als auch in der löslichen Fraktion des Wildtypstammes und der *Petite*-Mutante wurde die Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase gemessen. Da in Bäckerhefe eine nur geringe Aktivität dieses Enzyms nachweisbar ist, war eine äußerst empfindliche Bestimmungsmethode erforderlich. Ein von *Irving* und *Elliott*¹³ beschriebenes Verfahren, das eine Inkubation der Proben mit ^{14}C -Succinat, CoA, Succinyl-CoA-Synthetase und Glycin, eine Abtrennung der gebildeten δ -Aminolävulinsäure von überschüssigem ^{14}C -Succinat mittels Dowex-50 (H^+)-Säulenchromatographie, eine Zyklisierung der δ -Aminolävulinsäure zu einem Pyrrolderivat und dessen Extraktion in ein organisches Lösungsmittel umfaßt, erwies sich bei der Anwendung

¹² *M. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, Biochem. Z.* **329**, 332 (1951).

¹³ *E. A. Irving und W. H. Elliott, J. Biol. Chem.* **244**, 60 (1969).

auf Hefezellfraktionen als unspezifisch; es zeigte sich, daß in den zur Messung gelangenden Proben neben ^{14}C - δ -Aminolävulinsäure noch beträchtliche Mengen anderer radioaktiver Verbindungen enthalten waren. Daher wurde zur quantitativen Isolierung der markierten δ -Aminolävulinsäure ein elektrophoretisches Verfahren entwickelt, das die Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase nicht nur in Hefezellen, sondern auch in anderen Organismen mit niedrigem Enzym Spiegel ermöglicht*.

Tabelle 1. Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase in der Mitochondrien- und der löslichen Fraktion von Hefezellen

Die Inkubationsgemische enthielten (in Mikromolen, wenn nicht anders angegeben): Glycin, 50; nicht markiertes Succinat, 5; $1.4\text{-}^{14}\text{C}$ -Bernsteinsäure, 0.122 (2.5 μC); MgCl_2 , 10; Glutathion, 1; Pyridoxal-5-phosphat, 0.5; ATP, 12.5; CoA, 0.212; Antimycin A, 2.5 μg ; Natrium-L-malat, 2.5; Natrium-malonat, 5; Natriumarsenit, 2.5; *Tris*-HCl-Puffer, pH 7.4, 25; 0.15 ml einer Lösung von Succinyl-CoA-Synthetase* (1.1 Enzymeinheiten pro ml); 0.15 ml der Mitochondrien- oder der löslichen Zellfraktion (darin waren jeweils 0.5 bis 1.0 mg Protein enthalten, wie mit der Methode nach Lowry et al.¹⁵ bestimmt wurde) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml. Inkubiert wurde 60 Min. bei 37°. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 0.3M-Trichloressigsäure gestoppt. Die Messung der gebildeten $1\text{-}^{14}\text{C}$ - δ -Aminolävulinsäure ist im Text beschrieben.

Hefestamm	Kohlenstoffquelle im Zuchtmedium	Enzymaktivität** in der		Spezif. Aktivität*** der	
		Mitochondrien- fraktion	löslichen Fraktion	Mitochondrien- fraktion	löslichen Fraktion
Wildtyp	Glucose	14,8	190	4,6	8,3
	Galactose	10,1	197	3,0	7,5
Petite-Mutante	Glucose	7,9	230	5,1	10,2
	Galactose	10,8	245	5,3	9,5

* Das Enzym wurde nach Ramaley et al.¹⁴ aus *E. coli* (Crookes-Stamm) isoliert und bis zur Stufe der ersten Elution von DEAE-Sephadex gereinigt.

** μMole δ -Aminolävulinsäure, die in der Mitochondrien- bzw. löslichen Fraktion pro g Hefezellen (Feuchtgewicht) gebildet wurden.

*** μMole δ -Aminolävulinsäure, die pro mg Protein gebildet wurden.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, war nach Züchtung der Hefe in glucosehaltigem Nährmedium die spezif. Aktivität der δ -Aminolävulin-

* Die eingehende Beschreibung dieser Methode und ihrer Anwendung ist einer gesonderten Arbeit vorbehalten.

¹⁴ R. F. Ramaley, W. A. Bridger, R. W. Moyer und P. D. Boyer, J. Biol. Chem. **242**, 4287 (1967).

¹⁵ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. R. Farr und R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).

säure-Synthetase in den Mitochondrienfraktionen der Petite-Mutante und des Wildtypstammes fast gleich. In der löslichen Zellfraktion beider Stämme unterschied sie sich um weniger als 25%.

Unerwartete Resultate ergaben sich bei der Untersuchung der Verteilung der Enzym-Aktivität auf die einzelnen Zellfraktionen. Bei den Hefezellen fanden wir lediglich etwa 5% der Gesamtaktivität in der Mitochondrienfraktion. Demgegenüber beträgt, wie jüngste Untersuchungen zeigten, bei porphyrischer Rattenleber der mitochondriale Anteil an der gesamten Aktivität des Enzyms etwa 65%. Glucose-Repression¹⁶ konnte als mögliche Ursache der niedrigen mitochondrialen Enzymaktivität ausgeschlossen werden, da der Ersatz von Glucose durch Galactose im Nährmedium der Hefezellen keinen Anstieg der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase-Aktivität zur Folge hatte. Eine beschränkte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran für essentielle Bestandteile des bei der Bestimmung der mitochondrialen δ -Aminolävulinsäure-Synthetase verwendeten Inkubationsgemisches, insbesondere auch für Succinyl-CoA-Synthetase, waren gleichfalls nicht für die niedrigen Enzymaktivitäten verantwortlich. Dies konnte durch folgendes Experiment gezeigt werden: Mitochondrien wurden unter Bedingungen, die die Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran sicher gewährleisten, mit Ultraschall behandelt und ihre δ -Aminolävulinsäure-Synthetase-Aktivität vor und nach der Beschallung gemessen. Wie man aus Tab. 2 ersieht, bewirkte die Zerstörung der Mitochondrienmembran keinen Anstieg, sondern eher ein Absinken der Enzymaktivität, u. zw. unabhängig davon, ob die Inkubation ohne oder mit zugesetzter Succinyl-CoA-Synthetase durchgeführt wurde. Die Verdünnung des radioaktiven Succinats durch endogenes Succinat, eine weitere mögliche Ursache des niedrigen Enzymspiegels, wurde durch Zugabe hoher Succinatkonzentrationen auf ein Minimum beschränkt. Schließlich wäre denkbar, daß die einseitige Verteilung des Enzyms auf lösliche und mitochondriale Fraktion durch den Verlust des Enzyms aus der mitochondrialen Matrix im Zuge der Zellhomogenisation und Fraktionierung zustande kommt; Experimente mit Rattenleber lassen darauf schließen, daß die in der mitochondrialen Matrix lokalisierte δ -Aminolävulinsäure-Synthetase bei osmotischer Belastung und anschließender Beschallung in die extramitochondriale lösliche Fraktion abgegeben wird^{17, 18}. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bei der Präparation der Hefemitochondrien darauf Bedacht genommen, eine Zerstörung der

¹⁶ E. S. Polakis und W. Bartley, *Biochem. J.* **97**, 284 (1965).

¹⁷ R. McKay, R. Druyan, G. S. Getz und M. Rabinowitz, *Biochem. J.* **114**, 455 (1969).

¹⁸ F. M. J. Zuyderhoudt, P. Borst und F. Huijing, *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 408 (1969).

Organellen soweit als möglich zu vermeiden. Die Dauer des Schüttelns mit Glasperlen zur Zellhomogenisation wurde auf 20 Sek. beschränkt und jegliche Abweichung des Mediums von der Isotonie vermieden. Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Mitochondrien während der Präparation größere Verluste an δ -Aminolävulinsäure-Synthetase-Aktivität erlitten.

Tabelle 2. Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase in Hefemitochondrien vor und nach Ultraschallbehandlung

Hefe-Wildstamm-Mitochondrien wurden im Homogenisationsmedium suspendiert (25 mg Protein pro ml) und unter intensiver Eiskühlung 10mal je 60 Sek. in Abständen von je 1 Min. in einem Ultraschall-Desintegrator (Fa. Measuring and Scientific Equipment Ltd.) bei maximaler Leistung des Gerätes beschallt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte, wie in der Legende zu Tab. 1 beschrieben, mit dem Unterschied, daß ein Teil der Experimente ohne Zugabe von Succinyl-CoA-Synthetase zum Inkubationsgemisch, der andere Teil mit Zusatz von 0.4 Enzym-Einheiten durchgeführt wurde

	Zugabe von Succinyl-CoA-Synthetase	Spezifische* Aktivität
Mitochondrien vor der Beschallung	—	3,8
	+	4,6
Mitochondrien nach der Beschallung	—	2,7
	+	3,2

* μ Mole δ -Aminolävulinsäure, die pro mg Protein gebildet wurden.

Das überwiegende Vorkommen der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase außerhalb der Mitochondrien spricht dagegen, daß dieses Enzym vom mitochondrialen proteinsynthetisierenden System erzeugt wird. Es ist vielmehr sehr wahrscheinlich, daß es von den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums stammt und zum Teil in die Mitochondrien eingeschleust wird, wie dies im übrigen auch für das Enzym der Rattenleber vorgeschlagen worden ist⁸⁻¹⁰.

Da die Aktivität der mitochondrialen δ -Aminolävulinsäure-Synthetase im Wildtyp und in der atlungsdefizienten Petite-Mutante keinen wesentlichen Unterschied zeigt, ist es jedenfalls nicht dieses Enzym, das für ein Fehlen der Cytochrome a und b in der Petite-Mutante verantwortlich ist.

Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sind wir für Unterstützung zu größtem Dank verpflichtet. (Projekt Nr. 1210.)