

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie
der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, Arbeitsbereich Biochemie

Versuche zur Polyphosphat-Überkompensation in Hefezellen nach Phosphatverarmung

Von

E. LISS und P. LANGEN

(Eingegangen am 13. November 1961)

JEENER u. BRACHET fanden 1944, daß *Bäckerhefe*, welche mehrere Stunden unter Phosphatmangel kultiviert worden war, beim Überführen in ein phosphathaltiges Nährmedium so viel Phosphat aufnahm, daß der Phosphatgehalt normaler Hefezellen stark überschritten wurde. WIAME (1947) sowie SCHMIDT, HECHT u. TANNHAUSER (1946) erkannten, daß das von verarmter Hefe aufgenommene Phosphat überwiegend in Form von Polyphosphaten vorliegt. Die als Phosphat-Überkompensation bezeichnete Erscheinung wurde später auch von RAUTANEN u. MIKULEINEN (1951); HOFFMANN-OSTENHOF (1955); WINDISCH (1955) sowie LOHMANN u. LANGEN (1956) untersucht¹.

Wir haben jetzt erneut die Phosphataufnahme verarmter Hefezellen untersucht, wobei wir die Verteilung des Phosphates auf die von uns (LANGEN u. LISS 1958 a, b; LISS u. LANGEN 1959) charakterisierten vier Polyphosphatfraktionen verschiedener Kettenlänge berücksichtigten. Außerdem wurden vergleichende Untersuchungen über die Synthese- und die Abbaurate der Polyphosphate an normalen und phosphatverarmten Hefezellen durchgeführt.

Methoden

Phosphatverarmung. 5—10 g frische *Bierhefe* werden in 4 l phosphatfreier Nährlösung ca. 8 Std bei 27—28°C gut belüftet. Die Lösung enthält: m/25 (NH₄)₂SO₄; m/75 KCl; m/125 MgSO₄; m/250 CaCl₂; m/80 Bernsteinsäurepuffer vom pH 5,0 und m/15 Glucose. Die Hefe wird abzentrifugiert, abgesaugt und mehrfach mit Leitungswasser gewaschen. Unter diesen Bedingungen wächst sie etwa auf das 2,2—2,5fache an. In der verarmten Hefe ist nie mehr als 1 mg Polyphosphat je Gramm Hefe trocken, meistens wesentlich weniger nachweisbar. Die Hefe nimmt bei längerer

¹ *Anmerkung bei der Korrektur.* Die während des Verarmungsprozesses auftretenden Veränderungen im Gehalt der Hefezellen an Polyphosphaten und anderen Phosphatverbindungen werden in einer nach Abschluß dieser Arbeit erschienenen Veröffentlichung [M. EHRENBURG: Arch. Mikrobiol. 40, 126 (1961)] beschrieben. Dort werden auch ausführliche Angaben über die Aufnahme und die Verteilung von mit ³²P markiertem Phosphat durch verarmte Hefezellen unter verschiedenen Bedingungen gemacht.

Inkubation kaum noch an Masse zu; Phosphatzusatz bewirkt jedoch erneutes Wachstum.

Polyphosphatanreicherung. Die verarmte Hefe wird in einer Nährlösung suspendiert (1,5 g feucht je 50 ml), die m/35 Kaliumphosphat vom p_H 6,0, m/50 $MgCl_2$ und m/4 Glucose enthält, und bei 25°C belüftet. Zu verschiedenen Zeiten werden dem Ansatz jeweils 50 ml entnommen und mit 200 ml Eiswasser vermischt. Durch Zentrifugieren wird das extracelluläre Phosphat weitgehend entfernt und mit dem Rückstand der früher (LANGEN u. LISS 1958b; LISS u. LANGEN 1960) beschriebene Extraktionsgang durchgeführt. Die Analysen in den Extrakten erfolgen in der früher angegebenen Weise.

Polyphosphatase-Aktivität. In Anlehnung an Versuche von MATTENHELMER (1956) wurde das folgende Verfahren ausgearbeitet: Im Vacuumexsiccator bei Zimmertemperatur getrocknete Hefe wird mit drei Teilen m/5 Trispuffer vom p_H 7,4 verrührt und 2 Std bei 30°C geschüttelt. Die Suspension wird anschließend 3,5 Std gegen m/100 Trispuffer bei 0°C dialysiert. Dabei wird der größte Teil des Orthophosphats ohne Beeinträchtigung der Polyphosphatase-Aktivität entfernt. Für die Ansätze wird die komplette Suspension verwendet, da mindestens 30% der Aktivität an die festen Bestandteile gebunden sind.

Ein Ansatz enthält: 1 ml Fermentsuspension (mit 12,5 mg Trockenhefe); 0,5 ml m/10 $MgSO_4$; 0,5 ml m/2,5 Trispuffer vom p_H 7,4 und 1 ml Substratlösung (aus Hefe isolierte Polyphosphatfraktion 2, 3 oder 4 mit 6 mg P_2O_5). Die Ansätze werden 10–40 min bei 25°C geschüttelt, mit 5 ml 1%iger Trichloressigsäure abgestoppt und die Zunahme an Orthophosphat im Vergleich mit einem Nullwert gemessen.

Verhältnis des synthetisierten Polyphosphats zum insgesamt in Bindung überführten Orthophosphat. Eine Suspension von 0,75–3,0 g verarmerter Hefe in 90 ml Lösung mit m/30 Succinatpuffer vom p_H 4,75, m/20 KH_2PO_4 und m/300 $MgSO_4$ wird im verschlossenen Kolben im Thermostaten bei 25°C geschüttelt und ein CO_2 -freier Stickstoffstrom hindurchgeleitet. Nach Zusatz von 10 ml 25%iger Glucoselösung wird der Stickstoffstrom zur Absorption des gebildeten CO_2 durch drei hintereinander geschaltete Waschflaschen mit n/100 $Ba(OH)_2$ -Lösung geleitet. Zum Ende der Versuchszeit wird der Kolben mit der Suspension in Eiswasser gestellt und weitere 20 min Stickstoff durchgeleitet, um das gebildete CO_2 quantitativ zu überführen. Die Suspension wird dann zentrifugiert und extrahiert. In den Extrakten wird das gebildete Polyphosphat bestimmt. In den $Ba(OH)_2$ -Lösungen wird durch Titration die insgesamt gebildete CO_2 -Menge bestimmt. Für anaerobe Bedingungen gilt: 1 freigesetztes CO_2 entspricht 1 gebundenem Orthophosphat.

Bestimmung der Polyphosphat-Syntheserate normaler Hefezellen. 12 g Hefe werden 20 min bei 25°C in 150 ml Nährlösung inkubiert. Die Lösung ist m/75 an Kaliumphosphat vom p_H 5,5, m/50 an $MgSO_4$ und m/4 an Glucose. Durch diese Vorinkubation wird die in ruhender Hefe nicht vorkommende (LANGEN u. LISS 1958a) Fraktion 4 aufgebaut, damit ihre spezifische Aktivität bei der Inkubation mit ^{32}P nicht zu schnell die spezifische Aktivität des ATP erreicht. Die Suspension wird mit 150 ml Eiswasser vermischt, abzentrifugiert und einmal mit Eiswasser mit 1% Glucose gewaschen, um das inaktive Phosphat weitestgehend zu entfernen. Die Hefe wird dann 10 min bei 25°C in einer Lösung inkubiert, die Glucose und Magnesium wie oben und außerdem 25 μC ^{32}P enthält. Dann wird die Suspension wieder mit Eiswasser vermischt und abzentrifugiert, um das nicht aufgenommene ^{32}P zu entfernen. Die Entfernung des ^{32}P wird vorgenommen, damit die spezifische Aktivität des ATP während der Hauptinkubation keine großen Änderungen durch weiteres Eindringen von ^{32}P in die Zelle erfährt. Der Rückstand wird in 200 ml Nährlösung aufgenommen, die Phosphat, Magnesium und Glucose wie oben enthält, und bei 25°C geschüttelt. In Abständen von 10 min werden Proben von 50 ml mit 200 ml Eiswasser vermischt

und abzentrifugiert. Mit den Rückständen wird der früher beschriebene (LANGEN u. LISS 1958b; LISS u. LANGEN 1960) Extraktionsgang durchgeführt. Der Extrakt der Fraktion 4 wird durch Aktivkohle von geringen Nucleinsäureanteilen befreit. Dann werden Gehalt an Polyphosphat und an ^{32}P bestimmt. Im Trichloressigsäureextrakt wird das ATP mit Barium gefällt und in der früher beschriebenen (LANGEN u. LISS 1960) Art die spezifische Aktivität der Phosphatendgruppe bestimmt.

Ergebnisse

Zunächst untersuchten wir den zeitlichen Verlauf des Phosphat-einbaues in die vier Polyphosphatfraktionen. Tab.1 zeigt einen charakteristischen Versuch. Beim Vergleich mit der in normaler Hefe vorliegenden Verteilung der Polyphosphate fällt die sehr unterschiedliche

Tabelle 1. *Zeitlicher Verlauf des Phosphateinbaues in die Polyphosphatfraktionen* (Phosphatverarmte Hefe in Nährlösung mit Glucose, Kaliumphosphat und MgCl_2) (Angaben in Milligramm P_2O_5 je Gramm Hefe trocken)

Zeit in min	0	10	20	30	40	60	80	100	120
Fraktion 1 (Tri-Hepta-Phosphat)	0	0	0	0,9	1,3	2,8	4,5	4,7	7,1
Fraktion 2 (20 Phosphatgruppen je Molekül)	0	2,7	4,5	5,3	8,4	12,0	16,5	21,1	25,1
Fraktion 3 (55 Phosphatgruppen je Molekül)	0	2,7	7,2	12,6	18,5	27,2	36,7	44,7	52,0
Fraktion 4 (260 Phosphatgruppen je Molekül)	0	1,9	5,6	8,8	11,7	16,5	18,3	20,3	19,9
Summe	0	7,3	17,3	27,6	39,9	58,5	76,0	90,8	104,1

Tabelle 2

Vergleich der Verteilung der Polyphosphate in normalen und angereicherten Hefezellen
Milligramm $\text{P}_2\text{O}_5/\text{g}$ Hefe trocken

	normale Hefe	verarmte Hefe nach 2stündiger Anreicherung	relative Zunahme
Fraktion 1	2,0	7,1	3,5 fach
Fraktion 2	8,0	25,1	3,1 fach
Fraktion 3	1,5	52,0	35 fach
Fraktion 4	2,0	19,9	10 fach

relative Zunahme der einzelnen Fraktionen auf. Das kommt am stärksten bei der Fraktion 3 mit der mittleren Kettenlänge von 55 Phosphatgruppen je Molekül zum Ausdruck, die in normaler Hefe die kleinste, in angereicherter Hefe die größte Phosphatmenge enthält (Tab.2).

Die Gesamtmenge an Polyphosphat hat bei unseren Versuchen eine außerordentliche Größe erreicht. Der Tab.1 ist zu entnehmen, daß nach

2 Std die Hefe 104 mg Polyphosphat (als P_2O_5) je Gramm Trocken- gewicht enthält. In anderen Versuchen, die nicht der Untersuchung des Zeitverlaufes dienten, fanden wir eine Polyphosphatbildung bis zu 142 mg in 2 Std. Nimmt man an, daß die Polyphosphatketten aus KPO_3 -Ein- heiten bestehen, so bestehen im letzterwähnten Fall über 23% der Trockensubstanz der Hefe aus Polyphosphat. Wir führen die besonders starke Phosphatanreicherung, die unseres Wissens bisher nicht beob- achtet wurde, auf unsere speziellen Versuchsbedingungen zurück, nach denen die Verarmung etwa bis zu dem Zeitpunkt durchgeführt wird, an dem das Polyphosphat verbraucht ist. Das Maximum der Poly- phosphatbildung wurde mit Hefezellen erzielt, die 8–10 Std verarmt wurden. Längere Verarmungszeiten führten (auch bei Erneuerung des Nährmediums) zu verminderter Polyphosphatsynthese bei der an- schließenden Phosphatinkubation.

In einer Reihe von Kontrollversuchen haben wir uns davon über- zeugt, daß die starke Polyphosphatanreicherung nur nach vorheriger Phosphatverarmung beobachtet werden kann. Wird normale Hefe in das gleiche Nährmedium gebracht, in dem die verarmte Hefe optimal Polyphosphat aufbaut, so wird auch bei mehrstündiger Inkubation höchstens so viel Phosphat aufgenommen, daß der Polyphosphatgehalt 22 mg P_2O_5 pro Gramm Hefe trocken nicht übersteigt. Dies entspricht bei normaler Bierhefe einer Zunahme von 50–60%.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Polyphosphatanreicherung geprüft. Dabei ergab sich, daß unter aeroben Bedingungen ebensoviel Polyphosphat aufgebaut wird wie unter anaeroben Bedingungen. Der Zusatz von Ammoniumionen führte

Tabelle 3. *Einfluß von Mg-Ionen auf die Polyphosphatsynthese verarmter Hefezellen* (Inkubation von 1 g Hefe trocken in 120 ml Phosphat-Glucose-Lösung)

Konz. an Mg^{++} im Nährmedium in Mol/l	—	$1 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$
Gebildetes Polyphosphat nach 2 Std in Milligramm P_2O_5 /g Hefe trocken	42,7	53,4	74,0	102,6	103,7

zu keiner signifikanten Veränderung der Polyphosphatbildung. Hin- gegen wurde die Polyphosphatbildung vermindert, wenn im Inkubations- medium das Magnesium fehlte. Die Abhängigkeit der Polyphosphat- bildung von der Magnesiumkonzentration im Medium zeigt Tab.3. Bei 10^{-3} Mol/l ist die optimale Mg^{++} -Konzentration erreicht. Unter Be- rücksichtigung der Volumenverhältnisse im Ansatz ergibt sich für 1 g Hefe trocken, daß die Gegenwart von 120 μ Mol Magnesium im Medium die zusätzliche Bildung von Polyphosphat aus 845 μ Mol Phosphat

ermöglicht. Magnesiumbestimmungen ergaben, daß der Gehalt normaler Hefezellen bei der Verarmung von 103 $\mu\text{Mol/g}$ Hefe trocken auf 49 $\mu\text{Mol/g}$ Hefe trocken absinkt. Bei der Phosphatanreicherung in Gegenwart von Mg^{++} steigt er über den normalen Wert hinaus auf 180 $\mu\text{Mol/g}$ Hefe trocken.

Durch weitere Versuche sollte geklärt werden, ob die starke Anhäufung von Polyphosphat nach Phosphatverarmung durch eine gesteigerte Syntheserate oder durch eine verminderte Abbaurate bei unveränderter Syntheserate verursacht wird. Nach unseren früheren Untersuchungen (LANGEN u. LISS 1958 b) geht der Umsatz der Polyphosphate so vor sich, daß die höchstmolekulare Fraktion 4 auf bisher unbekannte Weise als erste Polyphosphatfraktion aus Orthophosphat über ATP gebildet wird. Der sukzessive Abbau zu den niedermolekularen Fraktionen erfolgt in der Reihenfolge Fraktion 4 (260 Phosphatgruppen je Molekül, siehe S. 391) \rightarrow Fraktion 3 (55 Phosphatgruppen je Molekül, LISS u. LANGEN 1959) \rightarrow Fraktion 2 (20 Phosphatgruppen je Molekül, LISS u. LANGEN 1959) \rightarrow Fraktion 1 (Tri- bis Heptaphosphat, LOHMANN u. LANGEN 1956). Die besonders starke relative Zunahme der Fraktionen 4 und 3 (Tab.2) legte die Annahme nahe, daß ein Aufstau infolge verminderter Polyphosphatase-Aktivität vorliegt. In diesem Zusammenhang sind Befunde von KRISHNAN u. BAJAJ (1953) bemerkenswert, die feststellten, daß bei *Asp. niger* einem niedrigen Polyphosphatgehalt eine niedrige Polyphosphatase-Aktivität entspricht und umgekehrt. Es wurde daher versucht, Unterschiede in der Polyphosphatase-Aktivität normaler und verarmter Hefezellen festzustellen. Nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren fanden wir für normale Hefe folgende Durchschnittswerte: 52 mg Orthophosphat/g Trockenhefe je Stunde für Fraktion 2 als Substrat, 29 mg Orthophosphat/g Trockenhefe je Stunde für Fraktion 3 als Substrat und 25 mg Orthophosphat/g Trockenhefe je Stunde für Fraktion 4 als Substrat.

Bei der Untersuchung verarmter Hefe ergaben sich jedoch aus bisher ungeklärten Gründen Schwankungen. Die Aktivitäten lagen teilweise über, teilweise unter den Aktivitäten normaler Hefe. Eine signifikante Verminderung war auf jeden Fall nicht feststellbar.

Es wurden daher Versuche zur Bestimmung der Syntheserate der Polyphosphate normaler Hefezellen durchgeführt, um diese mit der Syntheserate verarmter Hefezellen vergleichen zu können. Da sich die Polyphosphate gärender Hefezellen in einem ständigen Umsatz befinden, stellt die Bestimmung der Syntheserate mit ^{32}P die zuverlässigste Methode dar. Aus einer Reihe von Versuchen, über die in anderem Zusammenhang ausführlich berichtet werden soll, erwähnen wir hier nur die Messung der Bildung von Fraktion 4 aus ATP, da die Fraktion 4 die primär entstehende Polyphosphatfraktion darstellt, aus der die

übrigen Fraktionen durch Abbau hervorgehen. Eine direkte Synthese der Fraktionen 3, 2 und 1 aus ATP würde, falls sie stattfände, nur von unbedeutendem Ausmaß sein, was daraus folgt, daß die spezifischen Aktivitäten der Fraktionen 3, 2 und 1 wesentlich kleiner sind als die spezifische Aktivität der Fraktion 4 (LANGEN u. LISS 1958b)¹.

Für die Berechnung des in der Zeiteinheit synthetisierten Polyphosphats wurde von folgender Gleichung ausgegangen:

$$\left(\begin{array}{l} \text{Von der Fraktion 4} \\ \text{aufgenommenes } ^{32}\text{P} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{l} \text{Von der Fraktion 4} \\ \text{abgegebenes } ^{32}\text{P} \end{array} \right) = \frac{\text{Änderung im } ^{32}\text{P-Gehalt}}{\text{der Fraktion 4.}}$$

Die auf der rechten Seite der Gleichung stehende Größe wird gemessen. Die unbekanntes ³²P-Mengen auf der linken Seite der Gleichung werden durch die Produkte aus Phosphatmenge (³¹P + ³²P) und der zugehörigen spezifischen Aktivität ersetzt:

$$\left(\begin{array}{l} \text{Menge} \times \text{spez. Akt. des} \\ \text{aufgenommenen Phosphats} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{l} \text{Menge} \times \text{spez. Akt. des} \\ \text{abgegebenen Phosphats} \end{array} \right) = \frac{\text{Änderung im}}{^{32}\text{P-Gehalt.}}$$

Für die spezifische Aktivität des aufgenommenen Phosphats wird die mittlere spezifische Aktivität der terminalen Phosphatgruppe des ATP als der Vorstufe der Fraktion 4 eingesetzt, für die spezifische Aktivität des abgegebenen Phosphats die mittlere spezifische Aktivität der Fraktion 4. Dabei wurden vereinfachend die aus Anfangs- und Endwert berechneten Mittelwerte verwendet. Von den beiden Phosphatmengen ist nur eine unbekannt, die andere ergibt sich aus der ersteren bei Berücksichtigung der während der Beobachtungszeit auftretenden Mengenänderung der Fraktion 4. Damit läßt sich die obige Gleichung nach Einsetzen der Meßwerte auflösen. In Tab. 4 sind die Meßwerte eines Versuches und die daraus errechnete Syntheserate angegeben. Auf 1 Std umgerechnet ergibt sich ein Wert von 3,3 mg/g Hefe trocken. Damit ist nachgewiesen, daß die bei der Polyphosphatanreicherung beobachtete Ansammlung von maximal 70 mg/Std/g Hefe trocken nicht durch einen gehemmten Abbau beim Umsatz der Polyphosphate zustandekommt, sondern durch eine auf über das 20fache gesteigerte Syntheserate verursacht wird. Dieses Ergebnis veranlaßte uns, auch den relativen Anteil zu bestimmen, den die Synthese des energiereichen Polyphosphats an der Menge des insgesamt in Bindung überführten Orthophosphats hat. Da, wie oben erwähnt, das Ausmaß der Polyphosphat-Syntheserate unter anaeroben Bedingungen ebenso hoch ist wie unter aeroben, konnte

¹ Für die Bestimmung der Syntheserate sind die in der zitierten Arbeit wiedergegebenen Daten nicht geeignet, da seinerzeit die Fraktion 4 noch nicht in ausreichender Reinheit isoliert wurde, und weil — wie wir später fanden (LANGEN u. LISS 1960) — die spezifische Aktivität des Orthophosphates mit der der terminalen Phosphatgruppe des ATP nicht übereinstimmt und deshalb nicht zur Berechnung der Umsatzrate verwandt werden kann.

diese Bestimmung unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden, unter denen die Menge des von der Zelle in energiereiche Bindung überführten Orthophosphats leicht festzustellen ist (LYNEN u. KOENIGSBERGER 1951). Mit der im methodischen Teil beschriebenen Versuchsanordnung

Tabelle 4. *Daten zur Berechnung der Polyphosphat-Syntheserate normaler Hefezellen*
 Angaben für ^{32}P in Imp/min/g Hefe trocken, für ($^{31}\text{P} + ^{32}\text{P}$) in Milligramm $\text{P}_2\text{O}_5/\text{g}$
 Hefe trocken, für spez. Aktivitäten in Imp/min/mg P_2O_5

Zeit in min	0	10	20
Spez. Aktivität der Phosphatendgruppe des ATP	336 000	346 000	356 000
Mittlere spez. Aktivität des von Fraktion 4 aufgenommenen Phosphats		341 000	351 000
Spez. Aktivität der Fraktion 4	112 000	146 000	176 000
Mittlere spez. Aktivität des von Fraktion 4 abgegebenen Phosphats		129 000	161 000
Phosphatmenge ($^{31}\text{P} + ^{32}\text{P}$) in Fraktion 4	3,25	3,55	3,45
Δ Phosphat in Fraktion 4		+0,3	-0,1
^{32}P in Fraktion 4	364 000	517 000	607 000
Δ ^{32}P in Fraktion 4		+153 000	+90 000
Syntheserate Milligramm $\text{P}_2\text{O}_5/\text{g}$ Hefe trocken		0,54	0,56

Tabelle 5. *Verhältnis des von verarmter Hefe synthetisierten Polyphosphats zum insgesamt in Bindung überführten Orthophosphat*

Hefemenge in g feucht	Inkubationsdauer in min	μMol freigesetztes $\text{CO}_2 = \mu\text{Mol}$ in Bindung überführtes Orthophosphat	μMol synthetisiertes Polyphosphat	Anteil des synthetisierten Polyphosphats an dem in Bindung überführten Orthophosphat in %
0,75	10	305	33	10,8
3,0	10	1212	130	10,7
0,75	50	1465	166	11,3

wurde gefunden, daß während der ersten 50 min der Polyphosphat-synthese nach Phosphatverarmung mindestens 10% des bei der Glucosevergärung in gebundenes Phosphat überführten Orthophosphats für die Polyphosphatsynthese verwandt werden (Tab. 5).

Diskussion

Durch die vorliegenden Versuche wird als Ursache für die starke Polyphosphatansammlung bei der Inkubation phosphatverarmter Hefe mit Phosphat eine vielfach verstärkte Polyphosphatsynthese erkannt. Eine als Folge der Verarmung eintretende Verminderung des Abbaus durch eine Verringerung der Polyphosphatase-Aktivität hätte nur dann zu der beobachteten Polyphosphatansammlung bis zu 70 mg P_2O_5 pro Gramm Hefe trocken pro Stunde führen können, wenn die Syntheserate normaler Hefezellen in der gleichen Größenordnung läge. Sie liegt aber, wie die Versuche mit ^{32}P ergeben haben, bei 3,3 mg P_2O_5 je Gramm Hefe trocken und Stunde. Das bedeutet, daß von verarmter Hefe im Vergleich mit normaler Hefe etwa die 20fache Menge an Polyphosphat synthetisiert wird. Eine Verminderung der Abbaurate wäre unter diesen Umständen von untergeordneter Bedeutung. Berücksichtigt man die in den Fraktionen 3, 2 und 1 auftretenden Polyphosphatmengen, so erkennt man, daß sogar ein verstärkter Abbau vorliegt, da diese Fraktionen bereits Abbaustufen darstellen. Der verstärkte Abbau beruht in diesem Fall zweifellos auf den gegenüber normaler Hefe stark erhöhten Substratkonzentrationen (Tab. 2). Wie die Bestimmungen der Polyphosphatase-Aktivitäten zeigen, ist die Kapazität durchaus vorhanden, mehr als 3,3 mg P_2O_5 je Gramm Hefe trocken und Stunde (entsprechend der Syntheserate) abzubauen. Der große Unterschied zwischen den *in vitro* gemessenen und den *in vivo* vorliegenden Abbauraten kann verschiedene Ursachen haben. Neben Unterschieden im pH -Wert, der Mg-Konzentration und der Substratkonzentration dürfte besonders die Lokalisation von Ferment und Substrat eine wichtige Rolle spielen. Das ergibt sich schon daraus, daß die in ruhender Hefe vorhandenen, beträchtlichen Polyphosphatmengen fast keinem Abbau unterliegen.

Die Frage nach dem Grund für die ungewöhnliche Steigerung der Polyphosphat-Syntheserate nach vorheriger Verarmung der Hefezellen muß zunächst offen bleiben. Ehe weitere Ergebnisse vorliegen, lassen sich nur Vermutungen anstellen. Es wäre z. B. denkbar, daß durch die Züchtung unter Phosphatmangel phosphatverbrauchende Synthesereaktionen in irgendeiner Weise geschädigt werden. Hält diese Schädigung bei der Überführung in ein phosphathaltiges Medium noch eine Weile an, so könnte das Überangebot an Phosphat zu einer verstärkten Polyphosphatsynthese führen, für die dann — wie die Versuche zeigen — etwa 10% des bei der Gärung in Bindung überführten Orthophosphats verbraucht werden.

Anhang

Neue Bestimmungen der Kettenlänge der Fraktion 4. Die starke Anreicherung der Polyphosphate in den beschriebenen Versuchen bot die Möglichkeit, die präparative Isolierung der Fraktion 4 zum Zweck der Kettenlängentitration unter wesentlich

günstigeren Bedingungen erneut durchzuführen. Da sich zum Beispiel im Extrakt der Fraktion 4 bei phosphatangereicherter Hefe etwa zehnmal soviel Polyphosphat befindet als bei der früher verwendeten normalen Hefe, kann die Aufarbeitung mit viel weniger Hefe durchgeführt werden, und das Verhältnis von zu entfernenden Begleitsubstanzen zum Polyphosphat ist stark verringert.

Folgende Abänderungen wurden gegenüber der früher beschriebenen (LISS u. LANGEN 1960) Methode vorgenommen: Für einen Ansatz wurden 25 g verarmte Hefe 150 min mit Phosphat, Magnesium und Glucose inkubiert und anschließend die normale Extraktion bis einschließlich Fraktion 3 durchgeführt. Danach wurde zweimal mit 96%igem Alkohol und einmal mit Äther extrahiert, wodurch die Menge

Tabelle 6. Bestimmung der Kettenlänge der Fraktion 4

	Phosphatmenge ($\mu\text{Mol P}$)	Verbrauch an n/100 Ba(OH)_2 von pH 4,5–8	Kettenlänge
1. Präparat	1197	0,94	255
2. Präparat	461	0,35	263

der im folgenden Extrakt auftretenden Begleitsubstanzen verringert wird. Bei der Extraktion der Fraktion 4 wurden der Dodecylsulfatlösung 0,5% Äthylendiaminotetraacetat zugesetzt, um schon an dieser Stelle die depolymerisierenden Kationen zu binden. Für die Behandlung mit Aktivkohle sind nur noch 2,5 g erforderlich, die Eiweiß und Nucleinsäuren restlos entfernen. Auf die präparative Elektrophorese konnte verzichtet werden, was eine wesentliche Vereinfachung bedeutet.

An gereinigten Präparaten wurde eine Kettenlänge von 260 Phosphatgruppen je Molekül festgestellt (Tab. 6), wodurch die früher bestimmte Zahl (LISS u. LANGEN 1960) von 165 wesentlich überschritten wird. Das Molekulargewicht dieses Polyphosphats beträgt über 30000. Eventuell hat bei der früheren Darstellung der Präparate bereits ein Abbau stattgefunden.

Auch bei der angereicherten Hefe werden von der Fraktion 4 mit Dodecylsulfat nur etwa 75% extrahiert. Die Charakterisierung der restlichen 25% steht noch aus.

Zusammenfassung

1. Es wurden Versuche über die Polyphosphatsynthese phosphatverarmerter Hefezellen durchgeführt. Die Verteilung des Phosphats auf die vier Polyphosphatfraktionen verschiedenen Molekulargewichtes weicht erheblich von der in normaler Hefe beobachteten Verteilung ab.

2. Die stärkste Polyphosphatsynthese fand nach vorangehender acht- bis zehnstündiger Verarmung statt. Magnesiumionen fördern die Synthese erheblich. Ammoniumionen sind ohne Einfluß. Die Synthese ist unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen gleich groß.

3. Unter optimalen Bedingungen werden in 2 Std bis zu 142 mg Polyphosphat (als P_2O_5) je 1 g Hefe trocken synthetisiert. Die Trockensubstanz soweit angereicherter Hefe besteht dann zu 23% aus Polyphosphat [auf $(\text{KPO}_3)_n \cdot \text{K}_2\text{O}$ bezogen].

4. Die Polyphosphat-Syntheserate normaler Hefe wurde mit Hilfe von ^{32}P bestimmt. Da sie nur 3,3 mg P_2O_5 je Gramm Hefe trocken und Stunde beträgt, beruht die Ansammlung von bis zu 70 mg P_2O_5 je Gramm

Hefe trocken und Stunde bei verarmter Hefe auf einer außerordentlich gesteigerten Syntheserate. Eine verminderte Abbaurate wäre von untergeordneter Bedeutung.

5. 10⁰/₀ des von verarmter Hefe bei der Gärung in Bindung überführten Orthophosphats werden für die Polyphosphatsynthese verbraucht.

6. Die mit Dodecylsulfatlösung extrahierbaren 75⁰/₀ der Fraktion 4 haben eine mittlere Kettenlänge von 260 Phosphatgruppen pro Molekül. Beim Vorliegen von KPO₃-Einheiten entspricht dies einem Molekulargewicht von etwa 30000.

Die Durchführung der Untersuchungen wurde von Herrn Prof. Dr. K. LOHMANN durch wertvolle Hinweise sehr gefördert.

Frl. K. ENGELMANN, Herrn H.-J. GROBE und Herrn H. HÖPFNER danken wir für gewissenhafte Hilfe.

Literatur

- HOFFMANN-OSTENHOF, O., A. KLIMA, J. KENEDY u. K. KECK: *Mh. Chem. (Wien)* **86**, 604 (1955).
- JEENER, R., u. J. BRACHET: *Enzymologia* **11**, 223 (1944).
- KRISHNAN, P. S., and V. BAJAJ: *Arch. Biochem.* **47**, 39 (1953).
- LANGEN, P., u. E. LISS: *Naturwissenschaften* **45**, 191 (1958 a).
- LANGEN, P., u. E. LISS: *Biochem. Z.* **330**, 445 (1958 b); **332**, 403 (1960).
- LISS, E., u. P. LANGEN: *Naturwissenschaften* **46**, 151 (1959).
- LISS, E., u. P. LANGEN: *Biochem. Z.* **333**, 113 (1960).
- LOHMANN, K., u. P. LANGEN: *Festschrift z. 10jährigen Bestehen der DAW*, S. 297. Berlin: Akademie-Verlag 1956.
- LYNEN, F., u. R. KOENIGSBERGER: *Ann. Chem.* **573**, 60 (1951).
- MATTENHEIMER, M.: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **303**, 107 (1956).
- RAUTANEN, N., u. P. MIKKULAINEN: *Acta chem. scand.* **5**, 89 (1951).
- SCHMIDT, G., L. HECHT and S. J. THANNHAUSER: *J. biol. Chem.* **166**, 775 (1946).
- WIAME, J. W.: *Biochim. biophys. Acta* **1**, 234 (1947).
- WINDISCH, F., St. HINKELMANN u. D. STIERAND: *Experientia (Basel)* **11**, 307 (1955).

Dr. E. LISS

Isotopenabteilung der I. Med. Klinik der Freien Universität
im Städt. Krankenhaus Westend, Berlin-Charlottenburg