

Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung von Metabolitgehalten in Hefezellen

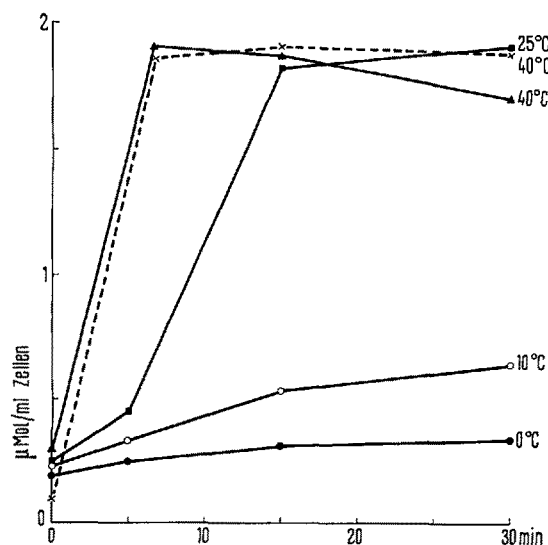
Die Messung der Veränderungen von Metabolitkonzentrationen in Hefezellen in Übergangs- und Stationärphasen ist für die Klärung von Regulationsprozessen von grosser Bedeutung¹⁻⁴. Die Verfolgung der Metabolitkinetik gelingt nur dann exakt, wenn 1. mit der Zugabe des Fällungsmittels zur Hefesuspension der Zellstoffwechsel sofort ohne grössere Zeitverzögerung abgestoppt wird, 2. die Denaturierung aller Enzyme so schnell erfolgt, dass die durch verschiedene Enzymsysteme eingestellten Metabolitgleichgewichte durch den Fällvorgang selbst nicht messbar verändert werden und 3. der gewonnene Extrakt die Metabolite der Zelle tatsächlich quantitativ enthält. Für die Fällung und Extraktion der Hefezellen wird vor allem Trichloressigsäure oder Perchlorsäure empfohlen. Erstere schien unter Einhaltung bestimmter Bedingungen den oben genannten Kriterien am ehesten standzuhalten⁵, während Perchlorsäure, unter gleichen Fällungsbedingungen wie Trichloressigsäure eingesetzt, häufig beträchtlich abweichende, meist zu niedrige Werte lieferte⁶. Die Fällung mit Trichloressigsäure hat jedoch den Nachteil, dass die enzymatische Bestimmung von z.B. G-6-P, ATP und NADP nicht unmittelbar im Extrakt möglich ist, weil Trichloracetat die für die Bestimmung verwendeten Enzyme hemmt. Diese Schwierigkeiten entfallen bei der Fällung der Zellen mit Perchlorsäure.

Wir fanden, dass der Gehalt an Metaboliten in Säureextrakten aus Hefezellen in hohem Masse von der Nachbehandlung der Zellsuspension nach der Zugabe des Fällungsmittels abhängt.

Die Figur zeigt die Abhängigkeit des ATP-Gehaltes eines zellfreien Extraktes von Zeit und Temperatur der Nachbehandlung der gefällten Zellsuspension. Die Perchlorsäurefällung liefert nur unter bestimmten Bedingungen gleiche Resultate wie die Trichloressigsäurefällung unter optimalen Bedingungen⁵; es besteht jedoch auch bei der Fällung mit Trichloressigsäure eine Abhängigkeit der Konzentration des gelösten ATP im Zell-extrakt von Zeit und Temperatur. Ähnliche Verhältnisse wurden auch für andere Metabolite gefunden. Die Extraktion von Metaboliten in Hefezellen vereinfacht sich jedoch erheblich, wenn die mit Perchlorsäure unter Standardbedingungen gefällten Zellen durch mehrmaliges Frieren und Tauen «aufgeschlossen» werden (vergleiche auch⁷). Diese Methode liefert, wie zahlreiche Versuche im Vergleich mit anderen «optimalen» Verfahren zeigen (Tabelle), eine gute Übereinstimmung für eine Reihe von Zwischenstoffen. Das Gefrierverfahren hat überdies den Vorteil eines schonenden Aufschlusses, bei dem die Hydrolyse säurelabiler Verbindungen geringer ist als bei

der Wärmebehandlung. Die Geschwindigkeit der Unterbrechung des Stoffwechsels der Hefe durch Trichloressigsäure und Perchlorsäure bei Zimmertemperatur unterscheidet sich nicht messbar und liegt in beiden Fällen unterhalb einer Sekunde. Wir bestimmten den Glucoseverbrauch und die 2-Desoxy-D-glucose-Phosphorylie-

- ¹ F. LYNEN, Colloquium Ges. physiol. Chemie 8, 155 (1958).
- ² H. HOLZER und R. FREYTAG-HILF, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 316, 7 (1959).
- ³ F. A. HOMMES, Archs Biochem. Biophys. 108, 36 (1964).
- ⁴ B. HESS, Wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, Rottach-Egern 1962; Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle (Springer-Verlag, Berlin 1963), p. 163.
- ⁵ G. KOPPERSCHLÄGER und E. HOFMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 90 (1964).
- ⁶ Unveröffentlichte Beobachtungen.
- ⁷ E. S. POLAKIS und W. BARTLEY, Biochem. J. 99, 521 (1966).



Abhängigkeit des ATP-Gehaltes eines Hefeextraktes von Temperatur und Inkubationszeit nach der Fällung. 2 ml Suspension (Zellgehalt 25%) mit 1 ml Perchlorsäure (22,5 g/100 ml) bei Zimmertemperatur gefällt, bei wechselnden Zeiten und Temperaturen inkubiert, gekühlt und zentrifugiert. Bestimmung des ATP im neutralisierten Perchlorsäure-Extrakt enzymatisch⁷ (ausgezogene Kurven). Fällung mit Trichloressigsäure (gestrichelte Kurve) analog der Perchlorsäurefällung (Endkonzentration der Säure 7,5 g/100 ml). Abtrennung des ATP durch Bariumacetat-Alkohol-Fällung nach LE PAGE, wie unter⁵ beschrieben.

Vergleich der Gehalte verschiedener Zwischenstoffe unter verschiedenen Fällungs- und Extraktionsbedingungen im zentrifugierten Zelleextrakt

Aufschlussbedingungen	ATP	ADP	AMP	FDP	Triose-phosphate	G-6-P	NAD
Tauen und Frieren in PCS	1,70	0,22	0,21	1,25	0,50	0,92	0,49
Tauen und Frieren in TES	1,68	0,24	0,20	1,21	0,50	0,90	0,48
30 min Inkubation bei 20°C in PCS	1,65	0,29	0,23	1,28	0,47	0,95	—
15 min Inkubation bei 40°C in TES	1,64	0,28	0,22	1,24	0,44	0,91	0,48

Hefezellen wie in der Figur mit Perchlorsäure (PCS) oder Trichloressigsäure (TES) behandelt oder durch dreimaliges Frieren (— 70°C und Tauen «aufgeschlossen». Enzymatische Bestimmung der Metabolite⁷, Zahlenangaben in µMol/ml Zellen.

rung nach gleichzeitiger Zugabe des Fällungsmittels und der Monosaccharide. Bei einer Initialgeschwindigkeit des Glucoseschwundes bzw. der Desoxy-D-glucose-6-phosphatbildung von $0,5 \mu\text{Mol/ml Zellen} \cdot \text{Sekunde}$ (30°C)^{5,8} ergaben die «Blindwerte» bei gleichzeitigem Zusatz von Trichloressigsäure bzw. Perchlorsäure und der Monosaccharide in beiden Fällen ohne Unterschied scheinbare Umsätze von weniger als $0,10 \mu\text{Mol}$, was einer Zeit bis zur Unterbrechung des Zellstoffwechsels von etwa 200 msec entsprechen würde. Auf Grund unserer Ergebnisse muss bei Hefezellen eine Fällung mit Perchlorsäure und nachfolgendem Aufschluss durch dreifaches Frieren und Tauen als die für die quantitative Bestimmung verschiedener Metabolite am besten geeignete Methode angesehen werden.

Summary. The exact assay of metabolites like NAD, ATP and other glycolytic substances in intact yeast cells

greatly depends on the method of cell extraction. Reproducible and high levels can be obtained after prolonged incubation at high temperatures or by freezing and thawing of the denatured cellular material in perchloric acid, thus eliminating possible errors due to different recoveries in the cell-free extracts.

G. KOPPERSCHLÄGER und H. W. AUGUSTIN

Physiologisch-Chemisches Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg (DDR), 30. Januar 1967.

⁸ H. W. AUGUSTIN und E. HOFMANN, *Acta biol. med. germ.* 11, 628 (1963).

The Distribution of Quinone Pigments in Echinoderms

A characteristic feature of echinoderms is the occurrence of a variety of quinone pigments in their calcareous skeleta (spinochromes) and in parts of their viscera (echinochromes)¹. Neither the biogenesis nor the function of these compounds is known at present, but some interesting aspects of their distribution have come to light in the course of our work.

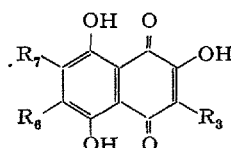
Of the 5 classes in the phylum *Echinodermata* (echinoids, holothurians, asteroids, ophiuroids, and crinoids) the echinoids (sea urchins) have received the closest attention. As a result of our work^{2,3} and of research in other laboratories¹ it appears that this class of animals synthesizes predominantly (we have found a single benzoquinone²) polyhydroxynaphthoquinones, the hydroxy groups of which are not methylated and which frequently bear a single two-carbon side chain¹⁻³. It is of biogenetic interest that no pigment with a one-carbon side chain, a prevalent feature of naphthoquinone pigments derived from higher plants and fungi, has ever been found among the naphthoquinone pigments of echinoderms.

All echinoids which had been examined up to very recently were representatives of the subclass *Euechinoidea*. We have now investigated 3 species of the more primitive subclass *Perischoechnoidea* and have found that these animals produce naphthoquinones of identical type. From the spines and tests (shells) of *Chondrocidaris gigantea* Agassiz and of *Prionocidaris* (*Stephanocidaris*) *hawaiiensis* Agassiz and Clark we have isolated and identified by direct comparison with authentic specimens spinochromes A, C, and D as the principal pigments. Similarly, we have demonstrated the presence of spinochromes A and C and of 2,7-dihydroxynaphthazarin in *Eucidaris metularia* Lamarck.

While none of the polyhydroxyquinones which have been isolated from echinoids possesses an alkylated hydroxy group, the holothurian (sea cucumber) *Polycheria rufescens* Brandt produces as its principal pigment nama-kochrome (I), which is the monomethyl ether of spinochrome E⁴. The structures of compound I and of all other naphthopurpurin derivatives described in this report are shown in the Table.

We have now examined for the first time representatives of 2 classes of echinoderms, the asteroids (sea stars) and the ophiuroids (brittlestars). From the spines of the asteroid *Acanthaster planci* Linn. we have isolated by previously described procedures² 2,6-dihydroxy-3,7-dimethoxynaphthazarin (II), m.p. $252-254^\circ\text{C}$, and 2,7-dihydroxy-3,6-dimethoxynaphthazarin (III), m.p. $218-219^\circ\text{C}$, in yields of 0.002 and 0.005%. The structures of II and III were rigorously established by comparison with authentic samples, by hydrolysis to spinochrome E, and by methylation to 2,3,6,7-tetramethoxynaphtha-

Naphthopurpurin derivatives from echinoderms



	R ₃	R ₆	R ₇
I	OH	OH	OCH ₃
II	OCH ₃	OH	OCH ₃
III	OCH ₃	OCH ₃	OH
IV	C ₂ H ₅	H	H
V	COCH ₃	H	H
VI	H	C ₂ H ₅	H
VII	COCH ₃	H	OH
VIII	COCH ₃	H	OCH ₃
IX	C ₂ H ₅	H	OH
X	OH	OH	C ₂ H ₅

¹ R. H. THOMSON, in *Comparative Biochemistry* (Ed. M. FLORKIN and H. S. MASON; Academic Press, New York 1962), vol. 3, p. 631.

² R. E. MOORE, H. SINGH and P. J. SCHEUER, *J. org. Chem.* 31, 3645 (1966).

³ C. W. J. CHANG, R. E. MOORE and P. J. SCHEUER, *Tetrahedron Lett.* 3557 (1964).

⁴ M. YAMAGUCHI, T. MUKAI and T. TSUMAKI, *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. C*, 4, 193 (1961).