

## Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe.

II. Über die Phosphatspeicherung in der Hefe.  
Eine Erklärung des sogenannten *Harden-Young*-Effektes.

Von

**O. Hoffmann-Ostenhof, K. Keck<sup>1</sup> und J. Kennedy<sup>2</sup>.**

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 14. Mai 1955.)

Bei der Aufstellung einer Phosphatbilanz unter den Bedingungen der anaeroben „Anreicherung“ (Gärung in einer phosphathaltigen stickstofffreien Glucoselösung) wurde festgestellt, daß der Phosphatgehalt der mit kalter oder heißer 10%iger Trichloressigsäure extrahierbaren Fraktionen in der Summe praktisch unverändert bleibt, während die gesamte Phosphatmenge, die im Verlauf des Vorganges aus der Außenlösung aufgenommen wird, im Extraktionsrückstand vorgefunden wird. Diese Fraktion, die vermutlich mit den Strukturelementen der Hefezelle identisch ist, enthält das Phosphat in einer schwer hydrolysierbaren, relativ stabilen Form.

Auf Grund dieser Befunde wird postuliert, daß der sogenannte *Harden-Young*-Effekt, das heißt die Anhäufung von Hexosediphosphaten in gärenden zellfreien Hefeextrakten nicht allein, wie seinerzeit von *Meyerhof* angenommen wurde, dadurch bedingt ist, daß diesen Extrakten ein ATP-hydrolysierendes Ferment fehlt, sondern allgemein deshalb, weil diesen Extrakten ein Mechanismus fehlt, der die Ausscheidung des energiereich gebundenen Phosphats aus dem Gärprozeß bewerkstelligt, und im besonderen deshalb, weil bei der Herstellung der Extrakte der Mechanismus zerstört wird, welcher die Phosphatübertragung auf die Strukturelemente der Zelle bewirkt.

<sup>1</sup> Derzeitige Adresse: Institute of Zoology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, U. S. A.

<sup>2</sup> Derzeitige Adresse: Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences de l'Université, Paris, Frankreich.

### Einleitung.

Vor einiger Zeit entdeckte *Meyerhof*<sup>3</sup> ein Enzym in der Hefe, welches die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) katalysiert. *Meyerhof* schrieb diesem Enzym, das er als ATPase bezeichnete, eine sehr wichtige Funktion zu: während bei der Gärung in zellfreien Hefeextrakten eine Anhäufung von Hexosephosphaten, vor allem Fructose-1,6-diphosphat, erfolgt (*Harden-Young-Effekt*), sei diese Erscheinung bei der Gärung durch lebende Hefezellen nicht zu beobachten, weil in diesen die ATPase vorhanden ist, welche bei der Bereitung der Extrakte entweder zerstört oder abgetrennt wird. Nach der Ansicht von *Meyerhof* ist die Anhäufung von Hexosephosphaten in den Extrakten darauf zurückzuführen, daß in diesem Medium kein anderer Weg zur Regeneration des für den Gärungsverlauf unbedingt erforderlichen ADP existiert als die Phosphatübertragung von ATP auf Hexose; es gelang ihm auch tatsächlich, durch Zusatz eines ATP-hydrolysierenden Fermentes zu solchen Hefeextrakten den *Harden-Young-Effekt* aufzuheben.

Trotz dieser Beweisführung erschien uns schon seit einiger Zeit die Theorie von *Meyerhof* zur Erklärung des *Harden-Young-Effektes* und seines Fehlens bei der Gärung der lebenden Hefe als wenig stichhaltig. Vor allem vom Standpunkt der Energetik aus muß es als recht unwahrscheinlich angesehen werden, daß die Hefe die während der Gärung geschaffenen „energiereichen“ Phosphatbindungen im ATP einfach durch Hydrolyse beseitigt und damit chemische Energie ungenutzt in Wärme überführt<sup>4</sup>. Die von uns als Alternativvorstellung entwickelte Hypothese, daß das bei der Gärung der lebenden Hefe organisch gebundene Phosphat im weiteren Verlauf an Metaphosphat weitergegeben wird, das als Phosphat- und Energiespeicher fungieren sollte, konnte allerdings trotz des Nachweises, daß die Hefe das für diese Funktion notwendige Ferment besitzt<sup>5</sup>, nicht verifiziert werden. Die Verhältnisse wurden in der vorhergehenden Mitteilung<sup>6</sup> eingehend beleuchtet.

Aus diesen Untersuchungen<sup>6</sup> geht aber auch ziemlich klar hervor, daß die Theorie von *Meyerhof* ebensowenig richtig sein kann wie unsere seinerzeitige Arbeitshypothese. Bei der von *Meyerhof* postulierten Hydrolyse müßte naturgemäß Orthophosphat freigesetzt werden, das entweder an das Medium abgegeben werden sollte oder in der Hefezelle

<sup>3</sup> O. Meyerhof, J. Biol. Chem. **157**, 105 (1945); **180**, 575 (1949). — O. Meyerhof und P. Ohlmeyer, ibid. **195**, 11 (1952).

<sup>4</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, Abstr. VIIth Internat. Congr. Cell Biol., Yale Univ., Newhaven 1950, S. 37. — O. Hoffmann-Ostenhof und W. Weigert, Naturwiss. **39**, 303 (1952).

<sup>5</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, J. Kenedy, K. Keck, O. Gabriel und H. W. Schönfelling, Biochim. Biophys. Acta **11**, 285 (1954).

<sup>6</sup> O. Hoffmann-Ostenhof, A. Klíma †, J. Kenedy und K. Keck, Mh. Chem. **86**, 604 (1955).

wiedergefunden werden könnte. Eine Abgabe an das Medium ist, wie wir schon in der I. Mitteilung begründet haben, wohl sehr unwahrscheinlich, da lebende Hefe nur unter ganz besonderen Umständen (schwere Vergiftung) Orthophosphat wieder abgibt. Bei unseren Experimenten über die anaerobe „Anreicherung“, die ja eine Gärung in einem phosphathaltigen Medium darstellt, konnte aber, wie Abb. 3 der vorhergehenden Mitteilung zeigt, nicht etwa eine Zunahme, sondern vielmehr eine sehr deutliche Abnahme des freien Orthophosphats beobachtet werden.

Um dieses Problem zu klären, haben wir eine Phosphatbilanz aufgestellt, die uns über das Schicksal des Phosphats in der Hefezelle Aufschluß geben soll.

#### Methodik.

Die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitsmethoden waren vollständig mit denjenigen identisch, welche wir in der I. Mitteilung dieser Reihe<sup>6</sup> beschrieben hatten.

#### Ergebnisse und Diskussion.

Zur Aufstellung einer möglichst vollständigen Phosphatbilanz wurde Hefe in gleicher Weise, wie in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben wurde, der anaeroben „Anreicherung“ unterzogen. Zu Beginn und nach 3stündiger Versuchsdauer wurden Proben entnommen und eine Fraktionierung vorgenommen. Außerdem bestimmten wir in gesondert entnommenen Proben den Totalphosphorgehalt der intakten Hefe. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Versuch über den Phosphatgehalt der intakten Hefe und der einzelnen Fraktionen bei der anaeroben „Anreicherung“. Die Zahlen bedeuten  $\mu\text{g}$  Phosphor pro g Hefe Frischgewicht.

Fraktion	0 Minuten	180 Minuten
„Leichtlösliche Fraktion“:		
Totalphosphat .....	1540	1943
Orthophosphat .....	490	352
7-Minuten-Phosphat .....	385	800
180-Minuten-Phosphat .....	150	110
„Schwerlösliche Fraktion“:		
Totalphosphat .....	1509	1150
7-Minuten-Phosphat .....	375	525
180-Minuten-Phosphat .....	537	37
Lipoidphosphat .....	265	350
Extraktionsrückstand („Zellreste“) .....	1720	3075
Intakte Hefe (Totalphosphat) .....	5750	7150

Aus Tabelle 1 geht vor allem hervor, daß weder in der „leichtlöslichen“ noch in der „schwerlöslichen Fraktion“ wesentliche Mengen Phosphat

enthalten sind, welche nicht bei der Fraktionierung aufscheinen. Die Werte der Totalphosphatbestimmung sind wohl durchschnittlich 35% höher als die Summe der Einzelfraktionen; dies ist aber auf die bekannte Tatsache zurückzuführen, daß die Hydrolyse in 7 bzw. 180 Min. nicht bei allen Anteilen dieser Fraktionen komplett verläuft.

Wenn wir nun die Unterschiede zwischen den Anfangs- und Endwerten betrachten, so sehen wir, daß die Änderungen der Werte für den totalen Gehalt an Phosphat in der „leichtlöslichen“ Fraktion und in der „schwerlöslichen Fraktion“ nur geringfügig sind und sich gegenseitig fast aufheben. Auch die Zunahme des Lipoidphosphats ist vergleichsweise recht unbedeutend. Hingegen findet sich ein bemerkenswerter Anstieg des Phosphats im Extraktionsrückstand. Diese Verhältnisse sind in Tabelle 2 illustriert.

Tabelle 2. Veränderungen des Phosphatgehaltes der einzelnen Fraktionen und der intakten Hefe während der „anaeroben Anreicherung“. Die Zahlen bedeuten  $\mu\text{g}$  Phosphor pro g Hefe Frischgewicht.

Fraktion	Differenz
„Leichtlösliche Fraktion“.....	+ 403
„Schwerlösliche Fraktion“.....	- 359
Lipoidphosphat.....	+ 85
Extraktionsrückstand („Zellreste“) .....	+ 1355
Gesamtphosphat der Hefe (berechnet) ....	+ 1484
Gesamtphosphat in der Hefe (bestimmt)...	+ 1400

Aus diesen Daten ergibt sich der sehr interessante Befund, daß praktisch die gesamte Phosphatmenge, die während der anaeroben „Anreicherung“ von der Hefe aufgenommen wird, im Rückstand nach der Extraktion mit Trichloressigsäure und Alkohol-Äther vorgefunden wird. Es handelt sich hier offenbar um einen bisher unbekannten Speichermechanismus für Phosphat.

Über die Bindungsform des Phosphats in dem Extraktionsrückstand können wir bisher auf Grund vorläufiger Versuche nur aussagen, daß es sich hier um relativ stabile Phosphatverbindungen handeln muß. Nach 3ständiger Hydrolyse mit n HCl wird nur ein geringer Teil des Gesamtgehaltes an Phosphat als Orthophosphat freigesetzt. Die Möglichkeit, daß es sich bei dem „Zellreste“-Phosphat um polymeres Metaphosphat handelt, das an Strukturelemente der Hefezelle gebunden ist, kann deshalb und auch, weil die Toluidinblaufärbung der „Zellreste“ keine Spur von metachromatischem Material zeigt, mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die oben berichtete Beobachtung, daß praktisch das gesamte von der Zelle während der anaeroben „Anreicherung“ aufgenommene Phosphat

im Extraktionsrückstand zu finden ist, während die Veränderungen in den extrahierbaren Fraktionen sich gegenseitig aufheben, veranlaßte uns, den zeitlichen Verlauf der Phosphataufnahme der Hefezellen und der Konzentration des Phosphats in den „Zellresten“ (Extraktionsrückstand) zu verfolgen. Zu diesem Zweck wurden im Verlauf eines 6stündigen Versuchs mit der anaeroben „Anreicherung“ ständig Proben entnommen und der Totalphosphatgehalt der Hefe sowie der Phosphatgehalt der Extraktionsrückstände bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben.

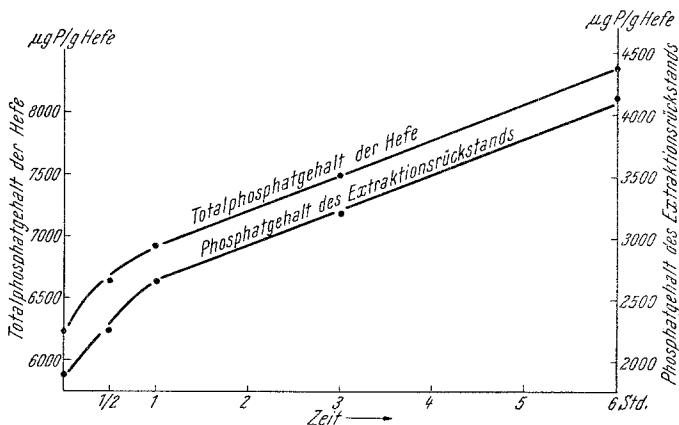


Abb. 1. Veränderungen des Total-Phosphatgehalts der Hefe und des Phosphatgehalts der Extraktionsrückstände bei der anaeroben „Anreicherung“.

Wie man aus der graphischen Darstellung ersieht, besteht trotz unterschiedlicher Absolutwerte eine überraschende Parallelität der beiden Kurven. Im Gegensatz zu den Kurven für den Phosphatgehalt der einzelnen Anteile der „leichtlöslichen“ und der „schwerlöslichen Fraktionen“ unter denselben Bedingungen (vgl. die Abb. 3 und 4 der 1. Mitt.<sup>6</sup>) wird hier selbst nach 6stündiger Gärung keine Verflachung der Kurven beobachtet, vielmehr ist auch noch nach dieser Zeit ein linearer Anstieg des Phosphatgehaltes in beiden Kurven erkennbar.

Wir wenden uns nun zu unserer ursprünglichen Fragestellung, dem Problem, warum in der intakten Hefezelle keine Anhäufung von Hexosephosphaten, das heißt kein *Harden-Young-Effekt*, zu beobachten ist. Wir glauben auf Grund der geschilderten Befunde zu dem Schluß berechtigt zu sein, daß die Hefezelle in den Strukturelementen, die in unseren Versuchen als Extraktionsrückstand anfallen, einen Mechanismus besitzt, welcher ihr erlaubt, Phosphat in gebundener Form unbeschränkt zu speichern. Das bedeutet, daß die Zelle, wenn ein Überschuß von organisch gebundenem Phosphat vorliegt, das nicht durch andere Dephosphy-

lierungsreaktionen verbraucht wird, dieses nicht hydrolysiert, sondern an die Strukturelemente abgibt, wo es in einer noch unbekannten Form gebunden wird. Ohne Zweifel kann dieses Phosphat im Bedarfsfall wieder mobilisiert werden. Dazu ist allerdings zu bemerken, daß das Phosphat in den Zellelementen kaum als „energiereich gebunden“ anzusehen ist, da es ja schwer hydrolysierbar ist, während alle anderen bisher gefundenen „energiereichen“ Phosphatbindungen leicht hydrolyzierbar sind. Das Fehlen der Strukturelemente mit dem Speicherungsmechanismus ist somit der wahrscheinlich am meisten ins Gewicht fallende Grund für das Auftreten des *Harden-Young*-Effektes in den gärfähigen Hefeeextrakten.

Über die Fermente, welche bei der Speicherung des Phosphats an den Zellelementen beteiligt sind, können wir naturgemäß noch keine Aussage machen. Immerhin ist es wahrscheinlich, daß es ein Enzym oder Enzymsystem gibt, welches die Übertragung von Phosphatresten von ATP auf die Strukturelemente der Zelle bewirkt.

Wir möchten in diesem Zusammenhang eine Vermutung äußern, die zur Zeit noch sehr spekulativen Charakter trägt, aber unserer Meinung nach einige Wahrscheinlichkeit für sich hat: Wie in so vielen Fällen von Fermenten mit hydrolysierender Wirkung ist auch für diejenigen Enzyme, welche ATP hydrolyserieren, in den wenigsten Fällen eine plausible biologische Funktion gefunden worden. Es wäre nun denkbar, daß diese Fermente *in vivo* außer ihrer hydrolysierenden Wirkung auch eine übertragende Wirkung ausüben, was dadurch unterstützt werden könnte, daß sich das Akzeptorsubstrat innerhalb der Zelle durch deren strukturellen Aufbau in der Nähe des Wirkungsortes des Fermentes befindet. Damit bestünde die biologische Funktion derartiger Enzyme in der Übertragung von Phosphat auf ein noch unbekanntes, vielleicht strukturgebundenes Akzeptorsubstrat; bei der Abtrennung der Fermente aus der Zelle ginge diese räumliche Nähe des Akzeptorsubstrats verloren und in Versuchen *in vitro* wäre dann nur mehr die hydrolysierende Wirkung zu beobachten. Eine solche Funktion wäre z. B. für die sogenannte ATPase der Hefe von *Meyerhof*<sup>3</sup> sehr gut vorstellbar; dieses Enzym ist strukturell in den Zellelementen verankert und kann aus diesen nur mit Hilfe von Ultraschall abgetrennt werden. Es wäre somit denkbar, daß dieses Enzym *in vivo* die Übertragung der Phosphatreste von ATP auf das noch unbekannte Akzeptorsubstrat der Zellelemente katalysiert. Für unsere Vermutung spricht übrigens auch, daß besonders in den letzten Jahren zahlreiche Beispiele dafür bekannt geworden sind, daß Fermente, die man bisher als typische Hydrolasen aufgefaßt hatte, auch imstande sind, Übertragungsreaktionen zu bewirken<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> Vgl. dazu z. B. K. Wallenfels, in „Biologie und Wirkung der Fermente“, Koll. Ges. physiol. Chem., S. 160. Berlin. 1953.