Das Ribonukleinsäure-Ribonuklease-System von *Saccharomyces cerevisiae*: Zur Stoffwechselregulation bei Eukaryoten

On the Metabolic Regulation in Eucaryotes: The Ribonucleic Acid-Ribonuclease
System in *Saccharomyces cerevisiae*

GERHARD F. STÄRK und LOTHAR JAENICKE

Institut für Biochemie der Universität Köln

(Z. Naturforsch. 26 b, 328—336 [1971]; eingegangen am 15. Dezember 1970)

A "latent" ribosomal ribonuclease was demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae* which was repressed by glucose parallel to the respiratory enzymes during logarithmic growth. It was induced by oxygen after consumption of glucose, and while the cells were growing on ethanol. In the growing cell, this ribonuclease was associated with the ribosomes. It hydrolyzed non-functional polynucleotide bonds only leaving untouched the integrity and functionality of the ribosomal structure. Though this ribonuclease was not integrated into the mitochondria, its synthesis depended upon the intact and coupled respiratory chain, similar to the mitochondrial enzymes proper. The function of the ribosomal ribonuclease seems to be the adaptation of the ribosomal ribonucleic acid content to the specific growth conditions together with the protein synthesis capacity of the cell. Hence, the enzyme serves the economy of the cell: when the cells grow fast during the fermentative phase only little ribonucleic acid is degraded; during the oxidative phase, when metabolic activity is low, ribonucleic acid is hydrolyzed as a saving mechanism. The switching between glycolytic and aerobic metabolism, which is brought about by alternating synthesis of the respective enzymes, is closely related to the ribonucleic acid turnover in the yeast cell and is probably regulated analogously in higher organisms.

Während die Funktion der verschiedenen Typen von Ribonukleinsäure (RNA) in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt worden ist, weiß man immer noch recht wenig über die Aufgaben und die Spezifität von RNA-abbauenden Enzymen. RNA-Depolymerasen unterschiedlicher Spezifität und Ionen-Abhängigkeit finden sich in den verschiedenen Zellkompartimenten¹. Die genaue Differenzierung dieser Enzyme wird bei tierischen und pflanzlichen Geweben durch, vom Zellalter abhängige, Aktivitätsschwankungen erschwert. Leberzellen wachsender Ratten besitzen nur etwa die Hälfte der RNA-spalten- den Aktivität von Zellen ausgewachsener Tiere²; die zelluläre RNase-Aktivität von Wurzelzellen bei *Zea mays*³ oder von Blattzellen bei *Avena*⁴ nimmt parallel zum Differenzierungsgrad mit fortschreitender Entfernung vom Meristem zu.

In allen diesen Fällen ist das Absinken der RNase-Aktivität mit einer Zunahme des zellulären RNA-Gehalts — und umgekehrt — verbunden: PILET⁵ beschrieb die Abnahme des RNA-Gehalts von alternden

Wurzelzellen, CHAUDHURI und LIEBERMANN⁶ wiesen einen RNA-Anstieg bei regenerierender Leber nach. Dies läßt somit vermuten, daß bei Pflanze und Tier ein Regulationsmechanismus ausgebildet ist, der die Zellteilungsrate mit Hilfe des zellulären RNA-Spiegels bestimmt und der RNA-Synthese und RNase-Repression (oder -Hemmung) bzw. RNA-Abbau und RNase-Synthese koordiniert.

Diese Wechselbeziehungen sind aber bei höheren Organismen mit ihrer fortgeschrittenen Zell- und Gewebedifferenzierung nur schwer zu analysieren. Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen RNA-Niveau und Wachstum ist es deshalb günstiger, mit einer Kultur von Einzellern zu arbeiten, die den gesamten Wachstumszyklus: die Verweil-, Vermehrungs- und stationäre Phase durchläuft. Als besonders günstiges Modell bietet sich für solche Studien die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* an, da dieser eukaryotische Organismus cytologisch sowohl mit pflanzlichen als auch mit tierischen Zellen vergleichbar ist.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. L. JAENICKE, Institut für Biochemie der Universität D-5000 Köln-I, An der Bottmühle 2.

¹ E. A. BARNARD, Annu. Rev. Biochem. 38, 677 [1969].

² D. J. S. ARORA u. G. DE LAMIRANDE, Arch. Biochem. Biophysics 123, 416 [1967].

³ M. MAROTI, Acta Biol. 20, 263 [1969].

⁴ N. V. WEYEN, J. UDVARDY, F. SOLYMOSY, E. MARRÈ u. G. L. FARKAS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 191, 588 [1969].

⁵ P. E. PILET, Experientia [Basel] 25, 1036 [1969].

⁶ S. CHAUDHURI u. J. LIEBERMAN, J. biol. Chemistry 243, 29 [1968].

In der vorliegenden Arbeit wird die Funktion und Regulation des RNA-RNase-Systems von *S. cerevisiae* untersucht, seine mögliche Bedeutung für den Gesamtstoffwechsel der Hefe diskutiert und mit den bei höheren Organismen gefundenen Verhältnissen verglichen.

Methoden

Kultur der Hefezellen: Für alle Versuche wird die diploide Bäckerhefe, Stamm A₂W₅ der Firma Wulf, Werl/Westf. benutzt. — Das Kulturmedium enthält in 1 l dest. H₂O: 6 g Hefe-Extrakt (Difco), 5 g Pepton aus Casein (Merck), 5 g Pepton aus Fleisch (Merck), 5,6 g Zitronensäure·H₂O und 10 g K₂HPO₄ sowie, je nach Versuchsansatz, zwischen 17 und 47 g Glukose. Das End-pH ist 5,2. Man läßt eine Vorkultur unter den Bedingungen des entsprechenden Hauptversuchs 12 Stdn. wachsen; die Zellen werden abzentrifugiert und gewaschen. Einen Teil dieser Zellen, die in ihrem physiologischen Zustand den Zellen des Hauptversuchs nach 12 Stdn. Wachstum entsprechen, werden bis zu einer Anfangskonzentration von 2 mg Frischgewicht/ml in 500 ml Medium suspendiert und bei 33 °C mit 100 l steriler Preßluft/Stde. und 500 ml Ansatzvolumen belüftet. Die Zellvermehrung wird nephelometrisch im Eppendorf-Photometer bei 546 nm verfolgt.

Herstellung von zellfreien Extrakten: Etwa 500 mg Hefe (Frischgewicht) werden der Kultur entnommen, 2-mal mit H₂O gewaschen, erneut abzentrifugiert, gewogen, mit Aluminiumoxyd (FPT, Martinswerk, Bergheim/Erft) aufgeschossen⁷ und in der 8-fachen Menge an 0,1 M Na-phosphatpuffer pH 6,8 aufgenommen. Der Zellaufschluß wird 45 Min. bei 30 000 g zentrifugiert (Sorvall RC-2B-Zentrifuge) und der Überstand („Rohextrakt“) für die Aktivitätsbestimmung der Enzyme benutzt. — Die Zellfraktionierung für die Untersuchung der subzellulären RNase-Verteilung wird nach Zellaufschluß mit Reflexperlen in 0,25 M Mannit, 0,02 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,001 M Komplexonat, 0,003 M MgCl₂⁸ vorgenommen. Man zentrifugiert den Aufschluß zunächst bei 1500 g, dann bei 30 000 g, schließlich bei 150 000 g (Sprinco L-50) und nimmt die Fraktionen jeweils in 0,1 M Na-phosphatpuffer, pH 6,8, auf.

Analytische Verfahren: Die Bestimmung von Äthanol und Glukose erfolgt im Kulturmedium nach Abzentrifugieren der Zellen bei 2000 g mit Alkoholdehydrogenase⁹ bzw. mit Glukoseoxydase und Peroxydase¹⁰. Die Sauerstoffaufnahme (μ l O₂/Min. $\times$ mg Hefe-Frischgewicht) bzw. der Atmungsquotient (RQ) werden in einer Warburg-Apparatur (Braun-Melsungen) bestimmt. Dazu werden 25 mg abzentrifugierte und gewa-

schene Hefezellen in 1 ml 1 : 10 mit H₂O verdünntem Glukose-Vollmedium suspendiert und der Gaswechsel bei 30 °C gemessen. Protein wird mit der Biuret-Methode, RNA wie früher⁷ beschrieben, bestimmt.

Messung der Enzymaktivitäten: NADP⁺-Glutamatedehydrogenase (EC 1.4.1.4) Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40), Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1) und NADH-Cytochrom c-Reduktase (früher: EC 1.6.2.1) werden nach CHAPMAN und BARTLEY¹¹ bestimmt. — Zur Messung der RNase-Aktivität werden 0,9 ml 0,1 M Na-phosphatpuffer, pH 6,8 mit 1 mg Hefe-RNA (Boehringer-Mannheim) und 0,1 ml Rohextrakt (etwa 0,5 mg Protein) 30 Min. bei 40 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 ml 25-proz. HClO₄ — 0,75-proz. Uranylacetat¹² gestoppt. Nach 10 Min. bei 0 °C wird abzentrifugiert, ein Aliquot des Überstandes 1 : 20 mit H₂O verdünnt und die Absorption bei 260 nm im Zeiss-Spektralphotometer M4Q2 gemessen. Die spezifische Aktivität ergibt sich aus dem durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten der freigesetzten Mononukleotide von $\epsilon = 10\,000$.

Zur *Gelelektrophorese* der RNase wird ein Rohextrakt benutzt, der zur Beseitigung einer leichten Trübung und zur Freisetzung ribosomengebundener RNase 10 Min. bei 50 °C inkubiert und vom denaturierten Protein scharf abzentrifugiert wurde. — Das Puffergemisch für die Elektrophorese (pH 8,9) wird nach DAVIS¹³, die Gellösung nach RACUSEN¹⁴ hergestellt und in Plexiglas-Röhrchen (7 mm ϕ , 100 mm Länge) polymerisiert. Die Stromstärke beträgt bei 220 V je Röhrchen 2 mA. Das von WOLF¹⁵ angegebene Verfahren zum direkten Nachweis von RNase im Gel erwies sich in unseren Händen als nicht reproduzierbar. Deshalb wurde das Gel in 3 mm dicke Scheiben zerschnitten, die in 0,5 ml 0,5 M Imidazol-HCl, pH 6,7 mit 0,5 mg Hefe-RNA für 15 Stdn. bei 30 °C inkubiert wurden. Nach Entfernen der Scheiben und Zusatz von 0,25 ml HClO₄-Uranylacetat (s. o.) wird zentrifugiert, ein Aliquot des Überstands mit H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm gemessen.

Bestimmung der Ribosomen-Stabilität: Nach Zellaufschluß in 0,1 M Na-phosphatpuffer-0,003 M MgCl₂, pH 6,8 mit Reflexperlen wird fraktioniert zentrifugiert. Die 30 000–150 000 g-Fraktion wird im Volumen des Überstandspuffers resuspendiert. Man inkubiert diese Ribosomen-Suspension bei 50 °C, entnimmt im Abstand von etwa 2 Min. Proben von 0,2 ml und mischt in einer 1 cm Halbmikroküvette mit 0,8 ml H₂O. Die durch ein feinverteiltes Präzipitat denaturierter Ribosomen entstandene Trübung wird bei 546 nm im Eppendorf-Photometer 1101 gemessen. Die Thermostabilität der Ribosomen wird als die Zeit (t_m) angegeben, die für halbmaximale Präzipitation unter den Versuchsbedingungen benötigt wird.

⁷ K. SCHOLZ u. L. JAENICKE, European. J. Biochem. **4**, 448 [1968].

⁸ H. TUPPY u. G. D. BIRKMEYER, European J. Biochem. **8**, 237 [1969].

⁹ R. BONNICHSEN, in: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 285, H. U. BERGMAYER ed., Verlag Chemie, Weinheim 1962.

¹⁰ A. ST. G. HUGGET u. D. A. NIXON, Biochem. J. **66**, 12p [1957].

¹¹ C. CHAPMAN u. W. BARTLEY, Biochem. J. **107**, 455 [1968].

¹² S. KIM u. W. K. PAIK, Biochem. J. **106**, 707 [1968].

¹³ B. J. DAVIS, Annu. New York Acad. Sci. **121**, 404 [1964].

¹⁴ D. RACUSEN, Nature [London] **213**, 922 [1967].

¹⁵ G. WOLF, Experientia [Basel] **24**, 890 [1968].

Ergebnisse

Diauxisches Wachstum von Hefe: Das aerobe Wachstum von belüfteter Bäckerhefe auf Zuckern ist durch die Aufeinanderfolge einer „fermentativen Phase“ (I) und einer „aeroben Phase“ (II) gekennzeichnet. Während Phase I wird der Zucker bei hoher Wachstumsrate bzw. Proteinsyntheserate zu CO_2 und Äthanol abgebaut. Dieses wird während Phase II assimiliert und bei verminderter Wachstumsgeschwindigkeit vollständig oxydiert (Abb. 1) ^{16, 17}.

Dementsprechend steigt der Atmungsquotient (RQ) während der ersten Std. der Zellvermehrung steil an, d. h. die für das Inokulum benutzten, aerob adaptierten Zellen (s. Methoden) stellen sich rasch auf einen glykolytischen Stoffwechsel um. Der RQ fällt kurz vor Ende der log-Phase wieder ab, was sich durch die mit Glukose-Verbrauch abrupt aufhörende CO_2 -Entwicklung erklärt. Die O_2 -Aufnahme wird zunächst – trotz ausreichender Belüftung – vermindert, erreicht einen von der jeweiligen Glukosekonzentration des Mediums abhängigen minimalen Wert und steigt dann im Verlauf von etwa 2 Std. bis zum Zeitpunkt des vollständigen Glukoseverbrauchs wieder auf den Ausgangswert an (Atmungsadaptation). Die Zelle erreicht also mit Ende der fermentativen Phase I ihre volle Atmungskapazität.

Das RNA-RNase-System: Von LUCAS und Mitarbeiter ¹⁸ wurde gezeigt, daß der RNA-Gehalt von Hefe in Abhängigkeit von der jeweiligen Wachstumsphase schwankt. Dies gilt auch für die RNase-Akti-

vität (Abb. 2 a). Sie fällt während Phase I entsprechend der Zunahme der Zellmasse ab, d. h. die RNase-Synthese wird reprimiert und die anfangs vorhandene Enzymmenge „verdünnt“. Der RNA-Gehalt der Zellen steigt dabei gleichzeitig um etwa 30% an (Abb. 2 b), erreicht einen von der Glukosekonzentration des Mediums unabhängigen maximalen Wert und fällt mit Glukoseverbrauch wieder ab, was

Abb. 2. a) Ribonuklease-Aktivität von aerob wachsender Bäckerhefe. $\times-\times$, 1,7%; $\bullet-\bullet$, 2,7%; $\triangle-\triangle$, 3,7%; $\square-\square$, 4,7% Glucose im Vollmedium. b) Ribonukleinsäuregehalt von aerob wachsender Bäckerhefe.

Abb. 1. Aerobes Wachstum von Bäckerhefe auf 1,7% Glucose-Vollmedium. $\bullet-\bullet$, Zellzahl; $\triangle-\triangle$, Atmungsquotient; $\triangle-\triangle$, Atmung; $\times-\times$, Äthanol; $\times-\times$, Glucose.

¹⁶ C. BECK u. H. K. V. MEYENBURG, J. Bacteriol. **96**, 479 [1968].

¹⁷ J. JAYARAMAN, C. COTMAN u. H. R. MAHLER, Arch. Biochem. Biophysics **116**, 224 [1966].

¹⁸ J. M. LUCAS, A. H. SCHUURS u. M. V. SIMPSON, Biochemistry **3**, 959 [1964].

offensichtlich mit dem Wiederanstieg der RNase-Aktivität, wie er in Abb. 2 a nachgewiesen wurde, zusammenhängt.

Um zu klären, ob die beschriebenen RNase-Aktivitätsphasen einer Enzymspezies oder mehreren RNA-depolymerisierenden Enzymen zuzuordnen sind, werden die Enzymeigenschaften in Zellen der log-Phase mit niedriger RNase-Aktivität mit denen in Zellen der stationären Phase mit hoher RNase-Aktivität verglichen.

Lokalisation und Eigenschaften der RNase: Die Fraktionierung des Hefe-Rohextrakts ergibt, daß etwa zwei Drittel der gesamten RNase-Aktivität in der Ribosomen-Fraktion, der Rest im 150 000 g-Überstand und in der Mitochondrien-Fraktion lokalisiert ist, wie aus Tab. 1 hervorgeht. Das Verhältnis beider

Imidazol- puffer, pH 6,7 M	Ribonuclease-Aktivität [%] in			
	Roh- extrakt	Mito- chondrien	Ribo- somen	150 000 g Überstand
0,015	100	5	61	34
0,050	100	4	55	41
0,100	100	5	46	49

Tab. 1. Subzelluläre Verteilung der Ribonuklease nach Aufschluß von Hefezellen mit Reflexperlen, ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität.

Aktivitäten zueinander ist jedoch von der Pufferkonzentration abhängig. Fraktioniert man nämlich die aufgeschlossenen Zellen in Imidazolpuffern, pH 7,3 (+ 0,002 M MgCl_2) steigender Konzentration, sinkt das Verhältnis: ribosomale RNase/cytoplasmatische RNase von 1,78 bei 0,015 M Imidazol bis 0,94 bei 0,1 M Imidazol ab (Tab. 1). Die RNase wird somit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Milieus von den Ribosomen abdissoziiert. Das gleiche ist auch nach Abb. 3 durch Hitzebehandlung der Ribo-

Abb. 3. Freisetzung „latenter“ Ribonuklease bei 50 °C in 0,015 M Imidazol-HCl/0,002 M MgCl_2 , pH 7,3. Zu den angegebenen Zeiten wird ein Aliquot von 0,1 ml entnommen und im gleichen Puffer auf Ribonuklease-Aktivität geprüft. ●—●, Überstandsfaktoren; x—x, Ribosomenfraktion.

somen möglich. Hierdurch kann die RNase-Aktivität in der Ribosomen-Fraktion auf etwa das $2^{1/2}$ -fache erhöht werden, während diejenige der Überstand-Fraktion unverändert bleibt. Bei diesem Versuch muß die Hitzebehandlung und die anschließende Aktivitätsbestimmung bei niedriger Ionenstärke vorgenommen werden, da sonst die gesamte gebundene RNase freigesetzt würde. Ein Teil der RNase kann daher als „latentes“, durch Milieuveränderungen (Ionenstärke, Temperatur usw.) freierwerdendes Enzym, wie es auch von OHTAKA¹⁹ beschrieben wurde, angesehen werden.

Durch verschiedene Salze, wie KCl, Imidazol (Abb. 4), Na-phosphat, MgCl_2 und sogar Guanidin-HCl wird aber auch die RNase-Aktivität selbst erhöht. Dies trifft für das Ribosomen-gebundene

Abb. 4. Abhängigkeit der Ribonuklease-Aktivität von der Ionenstärke. x—x, Überstandsfraktion; ●—●, Ribosomenfraktion nach 3 Stdn. Wachstum; ▲—▲, Überstandsfraktion; ■—■, Ribosomenfraktion nach 9 Stdn. Wachstum der Zellen auf 1,7% Glucose-Vollmedium.

Enzym ebenso wie für die RNase des Überstands zu. Die Freisetzung und Aktivierung des Enzyms sind somit zwei verschiedene Wirkungen einer erhöhten Salzkonzentration. Diese Messungen wurden in Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen und Phosphat vorgenommen. Das Enzym kann daher keine Polynucleotid-Phosphorylase (EC 2.7.7.8) sein. Weiter wurde festgestellt, daß das pH-Optimum (pH 6,7 in 0,1 M Phosphatpuffer), die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, schließlich auch die Hitzestabilität (50% Restaktivität nach 10 Min. bei 56 °C) des Enzyms in beiden Fraktionen übereinstimmen. Da dies für die RNase von Phase I und von Phase II gilt, kann gefolgert werden, daß der in Abb. 2 a ge-

¹⁹ Y. OHTAKA, K. UCHIDA u. T. SAKAI, J. Biochemistry [Tokio] **54**, 322 [1963].

zeigte Aktivitätsverlauf einer und derselben Ribonuklease zuzuschreiben ist.

RNase-Aktivität und Ribosomen-Stabilität: Der Hauptanteil der zellulären RNA ist rRNA. Ihr Abbau durch RNase in vivo führt zu einer in vitro nachweisbaren Senkung der Thermostabilität der Ribosomen.

Abb. 5 gibt den zeitlichen Verlauf der Hitze-denaturierung von Ribosomen aus den verschiedenen Wachstumsphasen wieder. Danach sind Riboso-

Abb. 5. Thermostabilität der Ribosomen aus verschiedenen Wachstumsphasen. Die Zellen werden nach den angegebenen Zeiten geerntet, mit Reflexperlen aufgeschlossen und die Ribosomen in 0,015 M Imidazol-HCl + 0,002 M $MgCl_2$, pH 7,3, bei 50 °C inkubiert.

men von Zellen der log-Phase mit niedriger RNase-Aktivität (nach 4,5 Stdn. Wachstum) bedeutend stabiler als Ribosomen aus Zellen der stationären Phase mit hoher RNase-Aktivität (nach 12 Stdn. Wachstum). Wie Abb. 6 zeigt, verändern sich der zelluläre RNA-Gehalt und t_m , d. i. die Zeit, die für halb-

Abb. 6. Aerobes Wachstum von Hefe auf 1,7% Glucose-Vollmedium. ●-●, Ribonukleinsäure; ▲-▲, Ribonuklease; ×-×, Ribosomenstabilität (t_m).

maximale Denaturierung der Ribosomen benötigt wird, parallel zueinander. Die Thermostabilität der Ribosomen hängt demnach mit deren RNA-Gehalt, dieser wiederum mit der jeweiligen RNase-Aktivität zusammen. Zur Deutung des sigmoiden Verlaufs der Denaturierungsprofile in Abb. 5 kann man annehmen, daß die ribosomale RNase zunächst leicht zugängliche, für die Struktur-Integrität irrelevante RNA, dann erst strukturstabilisierende Interstrangbindungen hydrolysiert. Dabei denaturieren die Ribosomen – und zwar um so schneller, je weniger RNA sie enthalten.

Jedoch bewirkt der 6-fache Anstieg der RNase-Aktivität in Phase II einen Abfall der zellulären RNA von nur 30 Prozent. Demnach ist ein beträchtlicher Teil der rRNA vor dem hydrolytischen Angriff der RNase geschützt. Nach Zusatz steigender Mengen von Pankreas-RNase oder nach Erhöhung der Ionenstärke im Denaturierungsversuch – wodurch, wie gezeigt, die „latente“ rRNase aktiviert wird (Abb. 4) – erfolgt Abbau auch dieser „kryptischen“ rRNA, was aus Abb. 7 zu entnehmen ist.

Abb. 7. Thermostabilität von Ribosomen bei 50 °C, a) in Imidazol-HCl + 0,002 M $MgCl_2$ -Puffern, pH 7,3 verschiedener Ionenstärke; b) in 0,015 M Imidazol-HCl + 0,002 M $MgCl_2$ -Puffer, pH 7,3 bei Zusatz steigender Mengen Pankreas-Ribonuklease.

Die in Abb. 2 a und 2 b gezeigte enge Beziehung zwischen zellulärem RNA-Gehalt und RNase-Aktivität sowie der Nachweis, daß Ribosomen-Stabilität und RNase-Aktivität einander bedingen (vgl. Abbn. 5–7), legen die Vermutung nahe, daß die in vivo-Funktion der RNase der Abbau von ribosomaler RNA ist. Wird der Anstieg der RNase-Aktivität durch Neusynthese von Enzymprotein bedingt, müßte

er durch Zugabe von Hemmstoffen der Proteinsynthese verhindert werden können; der zelluläre RNA-Gehalt sowie die Thermostabilität der Ribosomen sollten dagegen unverändert bleiben. Wie Abb. 8 belegt, ist dies tatsächlich der Fall: Zugabe von Cycloheximid (Actidion) zum Kulturmedium gegen Ende der log-Phase (nach 4,5 Stdn.) verhindert den

Abb. 8. Ribonuklease-Aktivität und Ribonukleinsäure-Gehalt von Hefe nach Zusatz von 25 μg Cycloheximid/ml bei $\downarrow$ zu 1,7% Glucose-Vollmedium. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, Ribonukleinsäure; $\bullet$ — $\bullet$, Ribonuklease; $\triangle$ — $\triangle$ bzw. $\circ$ — $\circ$, zugehörige Kontrollen ohne Hemmstoff.

Aktivitätsanstieg der RNase vollständig. Dieser ist also mit der Proteinsynthese verknüpft. Das bedeutet zwar für sich allein stehend nicht notwendig zugleich auch die Neubildung von ribosomaler RNase; jedoch erfordert die in Abb. 2 a demonstrierte und als Folge einer *Enzymrepression* diskutierte gleichmäßige Aktivitätsabnahme der rRNase in Phase I eine *Neusynthese* in Phase II. Die Hemmung des RNA-Abbaus beweist, daß die „latente“ rRNase in vivo rRNA abbaut und macht wahrscheinlich, daß sie auch in der intakten Zelle mit den Ribosomen assoziiert ist.

Regulation der Synthese von Glykolyse- und Atmungsenzymen während des Zellwachstums: Mit den Phasen I und II, die sich auf Grund des RQ, des zellulären RNA-Gehalts sowie der Wachstumsgeschwindigkeit beschreiben lassen (s. o.), ist zugleich eine alternierende Synthese von Enzymen des Gärungs- oder des Atmungsstoffwechsels verbunden. Während nämlich in Phase I die cytoplasmatischen Enzyme, wie die NADP⁺-abhängige Glutamatdehydrogenase, die Pyruvatkinase und die Pyruvat-

decarboxylase synthetisiert werden, und zwar im stärkeren Umfang als der Zellteilungsrate entspricht, was am Anstieg der spezifischen Aktivitäten während der ersten Stdn. des Wachstums zu erkennen ist, wie die Abbn. 9 a und 9 b zeigen, wird die mito-

Abb. 9. Enzymaktivitäten in wachsender Bäckerhefe. $\bullet$ — $\bullet$, in 1,7% Glucose-Vollmedium; $\times$ — $\times$, in 4,7% Glucose-Vollmedium. Glucoseverbrauch bei $\downarrow$. a) NADP⁺-abhängige Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.4), b) oben: Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40); unten: Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1); c) NADH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.1).

chondriale NADH-Cytochrom c-Reduktase reprimiert (Abb. 9 c). Mit Verbrauch der Glukose im Medium und dem dadurch bestimmten Beginn der Phase II werden die NADP⁺-Glutamatdehydrogenase, die Pyruvatkinase und die Pyruvatdecarboxylase reprimiert; die NADH-Cytochrom c-Reduktase jedoch deprimiert. Somit wird die Synthese der beiden Enzymgruppen in engem Zusammenhang mit der RNA-Synthese gegensinnig, jedoch koordiniert gesteuert.

Regulation der RNase: Der Anstieg der RNase-Aktivität in Phase II beruht, wie Abb. 8 erkennen ließ, auf Enzym-Neusynthese. Ihr Umfang ist, nach Aussage von Tab. 2 vom Grad der Belüftung des Kulturmediums, also von der Sättigung des At-

Belüftungsstärke (l/Stde. je 500 ml Medium)	40	80	150	150 *
Spez. Aktivität der Ribonuklease ($\mu\text{Mol/min} \cdot \text{mg Protein}$)	0,015	0,021	0,026	0,006
Spez. Aktivität der NADH-Cytochrom c-Reduktase ($\Delta E_{550 \text{ nm}}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$)	0,25	0,35	0,42	0,11
Zellausbeute (mg Frischgewicht)	28	38	47	36

Tab. 2. Belüftungsstärke und aerober Stoffwechsel. Nach 12 Stdn. Wachstum auf 3,7% Glucose-Vollmedium werden die Enzymaktivitäten und die Zellausbeute bestimmt (s. Methoden). * Nach 4,5 Stdn. wurde das Kulturmedium 0,25 M an 2,4-Dinitrophenol gemacht.

mungssystems der Zellen mit Sauerstoff abhängig. So kann durch Erhöhung der Belüftungsstärke von 40 l/Stde. je 500 ml Medium auf 150 l/Stde. je 500 ml Medium der zelluläre RNase-Gehalt bis zum Versuchsende nach 12 Stdn. auf etwa das Doppelte erhöht werden. Gleiches gilt für die NADH-Cytochrom c-Reduktase. Die RNase wird also, wie die Enzyme des Atmungsstoffwechsels, durch Sauerstoff „induziert“²⁰. Dabei steigt die Zellausbeute im gleichen Maß wie die Synthese der RNase und der NADH-Cytochrom c-Reduktase an. Durch Zugabe von 0,25 mM des Entkopplers 2,4-Dinitrophenol bei Beginn der Enzymderepression, 4,5 Stdn. nach Versuchsbeginn, wird dagegen der anabolische Atmungsstoffwechsel verhindert (Tab. 2).

Diskussion

Unsere Ergebnisse weisen nach, daß bei *wachsenden* Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* die Synthese von rRNA mit der Repression einer RNase verknüpft ist. Diese RNase wird nach Glukoseverbrauch und Wachstumsrückgang dereprimiert und ein Teil der vorhandenen rRNA abgebaut. Die Hemmung der Enzymsynthese durch Cycloheximid (Abb. 8), das auch den enzymatischen RNA-Abbau verhindert sowie der Befund, daß die Thermostabilität der Ribosomen in vitro von ihrem jeweiligen Gehalt an RNA in vivo abhängt (Abb. 5 und 6), zeigen, daß die untersuchte RNase nicht nur nach Aufschluß der

Zellen^{1, 2}, sondern auch in der intakten Zelle mit den Ribosomen assoziiert ist. Diese ribosomale RNase (rRNase) unterscheidet sich im pH-Optimum (pH 6,7 gegenüber pH 7,5) und der Hitzedenaturierung (50% Restaktivität nach 10 Min. bei 56 °C gegenüber 62 °C) von der durch OHTAKA und Mitarbb.¹⁹ aus *S. cerevisiae*-Rohextrakten angereicherten RNase, stimmt jedoch bezüglich seiner leichten Abtrennbarkeit von den Ribosomen bei erhöhter Temperatur und Ionenstärke mit der von denselben Autoren²¹ erwähnten „ribosomalen“ RNase überein. Die Repression des Enzyms durch Glukose (Abb. 2 a) sowie die Abhängigkeit seiner Synthese von Sauerstoff (Tab. 2), erlauben seine Zuordnung zu den in gleicher Weise regulierten Enzymen des Atmungsstoffwechsels^{10, 16, 17, 20}.

Im Gegensatz zu diesen wird jedoch die RNase nach der Synthese an den cytoplasmatischen Ribosomen nicht in die Mitochondrien integriert²², sondern verbleibt am Syntheseort. Hier allerdings verhindert sie, durch Abbau der rRNA, die weitere Synthese von Enzymen der Endoxydation, wie z.B. der NADH-Cytochrom c-Reduktase, nicht. Im Gegenteil, diese Enzyme und die RNase werden in gleichem Verhältnis zueinander, in Abhängigkeit von der Belüftungsstärke (Tab. 2) gebildet. Durch Zugabe von 0,25 mM 2,4-Dinitrophenol werden der Enzymanstieg und die weitere Zunahme der Zellmasse verhindert (Tab. 2). Daraus muß man schließen, daß die cytoplasmatische Synthese der beiden Enzyme von der intakten Atmungskettenphosphorylierung abhängig ist. In dieses Bild paßt der, auch von anderer Seite^{16, 17} gemachte, aber bisher nicht eingeordnete Befund, wonach die Atmungsadaptation, als Ausdruck des Übergangs von Promitochondrien zu atmenden und phosphorylierenden Mitochondrien^{22, 23}, der Derepression der Atmungsenzyme vorausgeht (Abb. 1 und 9 a).

Es folgt aus den beschriebenen Beobachtungen, daß der teilweise Abbau der Ribosomen während der aeroben Phase allenfalls zur Senkung, nicht aber zur völligen Hemmung der Translation durch das einzelne Ribosom führt. Diese Hypothese wird gestützt durch die Ergebnisse von SIMPSON und Mitarbb.¹⁸, die nachwiesen, daß der in vitro-Einbau von

²⁰ W. L. CHEN u. F. C. CHARALAMPOUS, J. biol. Chemistry **244**, 2767 [1969].

²¹ Y. OHTAKA u. K. UCHIDA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **76**, 94 [1963].

²² B. KADENBACH, in: Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria, S. 415, E. C. SLATER et al. eds., Adriatica Editrice, Bari 1968.

²³ G. SCHATZ, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **96**, 342 [1965].

Aminosäuren durch Hefe-Ribosomen im Verlauf der stationären Wachstumsphase zwar absinkt, aber nicht völlig verlorengelassen. Auch andere Autoren beobachteten nach RNase-Behandlung von Ribosomen eine nur teilweise verringerte Einbaurrate^{21, 24, 25}. Dies wird dadurch verständlich, daß, wie aus den Abb. 5, 6 und 7 hervorgeht, die Zerfallszeit (t_m) der Ribosomen während der stationären Phase, trotz steigender ribosomaler RNase-Aktivität, nur bis zu einem Grenzwert von ca. 15 min absinkt. Erst nach Zusatz von externer (Pankreas)-RNase zerfällt die ribosomale Grundstruktur rasch, und t_m sinkt bis auf 3 Minuten. Ähnliches wird auch von *E. coli*-Ribosomen berichtet, deren Proteinanteil fest mit – wahrscheinlich helicalen – Abschnitten der rRNA assoziiert ist und diese so vor Abbau schützen soll²⁶. Die Abb. 7 a und 7 b lassen einen exponentiellen Zusammenhang zwischen der Konzentration an RNase bzw. der Salzkonzentration des Milieus und der Ribosomenstabilität erkennen, was wir in der Weise deuten möchten, daß die Geschwindigkeit des Ribosomen-Abbaus mit fortschreitender RNA-Hydrolyse kooperativ zunimmt. Suspendiert man Zellen mit derartig abgebauten Ribosomen in einem Glukose-Medium, das rasche Zellvermehrung zuläßt, erfolgt eine schnelle Zunahme des zellulären Gehalts an rRNA (Abb. 2 a). Gleichzeitig tritt eine, relativ zur Zellteilungsgeschwindigkeit beschleunigte, Synthese der NADP⁺-abhängigen Glutamatdehydrogenase ein und zwar unabhängig von der eingesetzten Glukosekonzentration des Mediums (1,7% und 3,7%), also auch unabhängig von der „Induktor“-Konzentration. Dieser Befund bestätigt erneut, daß der Ribosomengehalt der Bakterienzelle²⁷, aber hier auch der Hefezelle, deren maximal mögliche Translationsrate bestimmt.

Bei Wachstum der Hefe auf Äthanol, das nur eine langsame Zellproliferation zuläßt²⁸, werden die während des raschen Wachstums auf Glukose synthetisierten Ribosomen nicht mehr voll für die Protein-

synthese benötigt. Der Abbau der rRNA während des aeroben Wachstums auf Äthanol ist damit ein Abbau überschüssiger Proteinsynthesekapazität. Die Funktion der rRNase bestünde dann, im Sinn zell-ökonomischer Substratverwertung, darin, einen Teil der an den Ribosomen fixierten rRNA für den aeroben Stoffwechsel zu mobilisieren und in wachstumsfördernde und -essentielle Metaboliten umzuwandeln (Tab. 2).

Zwischen dem beobachteten Verhalten des RNA-RNase-Systems bei Hefe und bei höheren Organismen¹⁻⁶ bestehen offensichtliche Parallelen. Hier wie dort erfolgt RNA-Synthese und RNase-Repression während rascher Zellvermehrung, d. h. hoher Proteinsyntheserate; RNase-Derepression und RNA-Abbau bei verlangsamtem Wachstum oder Wachstumsstillstand. Weiter sind alle rasch wachsenden Zellen durch einen weitgehend glykolytischen Stoffwechsel gekennzeichnet: Pflanzliche Meristeme häufen, trotz ausreichender Versorgung mit Sauerstoff, bei einem hohen RQ und niedriger Atmung Äthanol an, das von dem ausdifferenzierenden Gewebe bei einem niedrigen RQ und erhöhter O₂-Aufnahme verbraucht wird²⁹. Auf Grund der Aktivität von mitochondrialen Markierungsenzymen und der Atmungsaktivität bei Gerstenkeimlingen³⁰ wird angenommen, daß dieser Übergang mit der Bildung von intakten Mitochondrien aus den „Promitochondrien“ einhergeht.

Die starke aerobe Glykolyse von wachsenden Tumoren wies WARBURG³¹ in seinen grundlegenden Arbeiten nach. Sie ist jedoch nicht auf malignes Gewebe beschränkt, sondern für alle Zellen mit hoher Teilungsrates, wie z. B. auch für embryonales Gewebe³², charakteristisch. Auch dieses zeigt im Lauf seiner Entwicklung typische Schwankungen der Aktivitäten von Enzymen der Elektronentransportkette³³. So steigen die spezifischen Aktivitäten der Cytochrom c-Reduktasen mit NADH, NADPH und Succinat sowie der Cytochrom-Oxydase von Leber-

²⁴ F. CAHN, E. M. SCHACHTER u. A. RICH, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **209**, 512 [1970].

²⁵ N. DELIHAS, *Biochim. biophysic. Res. Commun.* **39**, 905 [1970].

²⁶ W. MÖLLER, R. AMONS, J. C. GROENE, R. A. GARRETT u. C. P. TERHORST, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **190**, 381 [1969].

²⁷ A. N. BELOZERSKY u. A. S. SPIRIN, in: *The Nucleic Acids*, Bd. III, S. 152, E. CHARGAFF u. J. N. DAVIDSON, eds., Academic Press, London-New York 1960.

²⁸ E. SCHWEIZER u. H. O. HALVORSON, *Exp. Cell Res.* **56**, 239 [1969].

²⁹ A. BETZ, in: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. XII/2, S. 88, W. RUHLAND, ed., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960.

³⁰ R. G. MCDANIEL u. B. G. GRIMWOOD, *Federat. Proc.* **29**, 904 [1970].

³¹ O. WARBURG, *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, J. Springer, Berlin 1926.

³² F. SEELICH, in: *Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen*, H. BRAUNSTEINER ed., G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1959.

³³ C. A. LANG, *Biochem. J.* **95**, 365 [1965].

und Herzgewebe während der späten Entwicklung des Rattenfötus stark an.

Der Lebenszyklus einer Zelle durchläuft somit offensichtlich bei Mikroorganismen, bei Pflanzen und bei Tieren eine glykolytische und eine aerobe Stoffwechselphase, die durch die alternierende Synthese bzw. Repression der Enzyme des Gärungs- oder Atmungsstoffwechsel geprägt sind. Im Umbruch einge-

fügt: Es ist möglich, daß die Steuerung dieser gleichsinnigen differentiellen Enzymsynthese in allen Fällen durch das gleiche regulierende Agens, vermutlich 3',5'-cyclo-AMP, erfolgt^{34, 35}.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, und dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt/M., danken wir für Unterstützung dieser Arbeit.

³⁴ G. ZUBAY, D. SCHWARTZ u. J. BECKWITH, Proc. nat. Acad. Sci. USA **66**, 104 [1970].

³⁵ M. EMMER, B. DE CROMBRUGGHE, I. PASTAN u. R. PERLMAN, ebd. **66**, 480 [1970].

Pilzpigmente, VI¹

Helveticon, ein Benzochinon-Derivat vom Bovinon-Typ aus *Chroogomphus helveticus* und *Ch. rutilus*

Pigments of Fungi, VI¹

Helveticone, a Bovinone Type Benzoquinone Derivative from *Chroogomphus helveticus* and *Ch. rutilus*

W. STEGLICH, F. ESSER und I. PILS

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München

(Z. Naturforsch. **26 b**, 336—338 [1971]; eingegangen am 7. Januar 1971)

Helveticone, the characteristic pigment from *Chroogomphus helveticus* and *Ch. rutilus* sporophores has been identified as 2,4-Dihydroxy-3-farnesyl-1,4-benzoquinone (**1**). Minor pigments are bovine (**2**) and xerocomic acid, already known from the *Boletaceae*.

Das Fleisch der Fruchtkörper von *Chroogomphus helveticus* (Sing.) Mos. und *Ch. rutilus* (Schff. ex Fr.) O. K. Miller verfärbt sich bei Verletzung oder beim Kochen in Wasser von orange nach karminrot. Mit Äthanol tritt die Farbänderung bereits in der Kälte ein.

Zur Isolierung des Pigments² extrahierten wir 1,2 kg Fruchtkörper von *Ch. helveticus* mit Äthanol. Der Farbstoff wurde der tiefroten Lösung als Bleisalz entzogen und durch Chromatographie an acetyliertem Polyamid und mehrfaches Umkristallisieren aus Petroläther gereinigt. Wir erhielten 5,5 g (ca. 0,5%) eines in orangegelben Nadeln kristallisierenden Pigments, das Helveticon **1** genannt wurde. Eine in geringer Menge von der Säule eluierte polarere gelbe Verbindung erwies sich als Xerocomsäure³. **1** wurde auch aus *Ch. rutilus* in 0,15% Ausbeute isoliert.

1, Schmp. 98—100°, besitzt ausgeprägte lipophile Eigenschaften und löst sich in alkoholischen Laugen mit rotvioletter Farbe. In seinem chemischen und spektroskopischen Verhalten stimmt es weitgehend mit dem kürzlich von BEAUMONT und EDWARDS⁴ auf *Suillus bovinus* (L. ex Fr.) O. Kuntze isolierten Bovinon (**2**) überein. Beide Verbindun-

gen sind durch Dünnschichtchromatographie, UV- und IR-Spektren kaum zu unterscheiden, und selbst der Misch-Schmp. zeigt keine Erniedrigung⁵. Der Unterschied ergibt sich aber klar aus den NMR- und Massenspektren.

Die NMR-Spektren von **1** und **2** (Tab. 1) gleichen sich in Lage und Form der Signale, unterschei-

Sonderdruckanforderungen an Dr. WOLFGANG STEGLICH, Wissenschaftlicher Rat, Organ.-Chem. Institut d. T. U. D-8000 München 2, Arcisstr. 21.

¹ 5. Mitt.: W. STEGLICH, W. FURTNER u. A. PROX, Z. Naturforsch. **25 b**, 557 [1970].

² E. BACHMANN wies in *Gomphidius viscidus* L. (= *Ch. rutilus*) ein rotes amorphes Pigment nach (Programm des Gymnasiums in Plauen 1886, S. 17).

³ W. STEGLICH, W. FURTNER u. A. PROX, Z. Naturforsch. **23 b**, 1044 [1968]; **24 b**, 941 [1969].

⁴ P. C. BEAUMONT u. R. L. EDWARDS, J. chem. Soc. [London], **C 1969**, 2398.

⁵ Das zum Vergleich benötigte Bovinon wurde nach I. c. ⁴ aus *Suillus bovinus* isoliert. Ausbeute nach Chromatographie an acetyliertem Polyamid und zweimaligem Umkristallisieren aus Eisessig 0,04 Prozent.