

LOKALISATION UND FUNKTION  
=====

VON POLYPHOSPHAT  
=====

IN HEFE  
=====

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

eines

Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

C H R I S T O P H   K O N R A D   U R E C H

Diplomierter Naturwissenschaftler ETH

geboren am 11. Mai 1949

von Hallwil, Kt. AG

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Ph. Matile, Referent

Prof. Dr. R. Hütter, Korreferent

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Arbeit befasst sich mit der subzellulären Lokalisation, mit Funktion und Stoffwechsel des Polyphosphats (PP) in Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*).

Das in Protoplasten enthaltene PP kann nach schonendem Aufschluss der Protoplasten (durch DEAE-Dextran induzierte isotonische Lyse) praktisch vollständig in einer partikulären Fraktion gesammelt werden. Diese Fraktion enthält fast alle Vakuolen, nebst den Mitochondrien und Zellkernen. Durch osmotischen Schock kann das PP aus der partikulären in die lösliche Form übergeführt werden. Bei der Reinigung der Vakuolen wird das PP im selben Ausmass angereichert wie die Marker für Vakuolenmembranen ( $\alpha$ -Mannosidase) und Vakuolensaft (Arginin). Die Menge PP pro Vakuole ist vergleichbar mit der Menge PP pro Protoplast. Das PP ist weitgehend, wenn nicht gar ausschliesslich in den Vakuolen der Hefeprotoplasten lokalisiert.

Die Möglichkeit eines zusätzlichen Aufenthaltsortes von PP in der Zellwand wurde geprüft. Im Verlauf der Zellwandverdauung durch Helicase nimmt der PP-Gehalt der Zellen um 20 % ab. Dabei erscheint kein PP im Medium. Es werden jedoch zur PP-Abnahme äquivalente Mengen von Orthophosphat (PO) ins Medium entlassen. Es ist nicht gelungen, die Existenz einer extrazellulären Polyphosphatase, die für den Abbau von extrazellulärem PP verantwortlich sein könnte, nachzuweisen. Zudem geschieht dieser PP-Abbau auch ohne Zugabe von zellwandabbauenden Enzymen. Möglicherweise wird ein Teil des intrazellulären PP unter den Bedingungen der Protoplastenherstellung abgebaut.

PP funktioniert in den Vakuolen als ein Kationentauscher. Dies konnte durch folgende Experimente nachgewiesen werden. Isolierte und gereinigte Vakuolen enthalten den grössten Teil des Arg von Zellen, die auf  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Stickstoffquelle gewachsen sind. Das Arg wird in den isolierten Vakuolen zurückgehalten, obwohl eine Permease vorhanden ist, welche die erleichterte Diffusion von Arg durch den Tonoplasten katalysiert. In Zellen, die auf Arg als einziger Stickstoffquelle wachsen, enthalten die Vakuolen einen Ueberschuss an Arginin gegenüber den Phosphatäquivalenten des PP's. Dieser Ueberschuss

von Arg und auch der grösste Teil der übrigen vakuolären Aminosäuren fliesst während der Isolation der Vakuolen ins Medium aus. In der Gleichgewichtsdialyse sowohl mit synthetischem PP als auch mit Vakuolenextrakten konnte gezeigt werden, dass PP tatsächlich Arg binden kann.

Während einer PP-Ueberkompensation in Anwesenheit von exogenem Arg wird Arg in äquivalenten Mengen zum synthetisierten PP angehäuft. Dies zeigt, dass auch *in vivo* eine enge Verknüpfung von PP- und Arg-Akkumulation besteht.

Die Versorgung der Zelle mit Stickstoff spielt eine wichtige Rolle für die Synthese von PP. So enthalten Zellen, die auf Arg als einziger Stickstoffquelle wachsen, ungefähr dreimal mehr PP als solche, die auf  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wachsen. Werden Zellen gleichzeitig an Phosphat und Stickstoff ausgehungert, so unterbleibt die PP-Ueberkompensation als Reaktion auf die Phosphatzugabe. Die für diese Phänomene verantwortlichen Regulationsmechanismen sind unbekannt.

Das vakuoläre PP kann durch die ebenfalls vakuolären Endo- und ExoPPasen katabolisiert werden. Die ExoPPase wurde näher charakterisiert. Sie besitzt einen spezifischen Aktivator, der im Zellsaft gelöst ist. Ueber die Natur dieses Aktivators wurden einige vorläufige Hinweise gewonnen. Er ist wasserlöslich, hitzestabil, an der Grenze der Dialysierbarkeit, säurelabil, unempfindlich gegenüber Subtilisin, RNase und saurer Pase und zum Teil negativ geladen.

Dieser Aktivator ist für die katalytische Wirkung der ExoPPase von Vakuolenmembranen unbedingt erforderlich. Aus diesem Grunde eigneten sich isolierte Vakuolenmembranen sehr gut für die quantitative Bestimmung des Aktivators.

Die Aktivität der vakuolären ExoPPase ist, wie auch die Aktivitäten der anderen untersuchten vakuolären Pasen (alkalische Pase, Gl. 1 Pase, AMPase, PyroPase, TriPPase), mit EDTA hemmbar. Sie wird aber im Gegensatz zu den genannten Pase-Aktivitäten durch  $\text{MgCl}_2$  nicht aktiviert. Die Indifferenz der ExoPPase gegenüber Arsenat und Vanadat bildet eine weitere Möglichkeit der Abgrenzung gegen die anderen Pasen. Mit NaF hingegen kann die ExoPPase spezi-

fisch gehemmt werden. Die ExoPPase ist bei 37° C bereits instabil und sie wird durch  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gehemmt.

Die ExoPPase hydrolysiert endständige Phosphatgruppen von PP verschiedener Kettenlängen. Sogar PyroP und TriPP besitzen vielleicht eine ganz schwache Affinität zum Enzym. Dies kann daraus gefolgert werden, dass Hydrolyse von PyroP und TriPP durch die an Tonoplasten gebundene Aktivität im pH-Optimum der ExoPPase (pH 6,4) durch einen Kochextrakt aus ganzen Zellen leicht aktiviert wird. Die Affinität der ExoPPase ist bei Verwendung der Polyphosphate P-15, P-25, P-65 und P-200 als Substrate genau proportional zum Polymerisationsgrad.

Säulenchromatografisch lassen sich verschiedene Pasen des Zellsaftes, nämlich die ExoPPase, die alkalische Pase, die TriPPase und die PyroPase, leicht voneinander trennen. Zusammen mit der alkalischen Pase (Molekulargewicht ca. 135'000 Dalton) erscheinen die Aktivitäten gegen Gl. 1P, Gl. 6 P, Fr. 6 P, AMP und ATP.

Dank der Möglichkeit, Protoplasten so schonend aufschliessen zu können, dass beinahe alle Vakuolen (rund 95 %) ganz bleiben, konnte durch Sedimentierung dieser Vakuolen eine beinahe vakuolenfreie "Zytosolfraktion" gewonnen werden. In einem Dichtegradienten wurde mehr als die Hälfte der Vakuolen in einer reinen Vakuolenfraktion (Messung von Leitenzymen verschiedener Organellen) gesammelt. PP wurde als Leitstoff für die Vakuolen zur Bestimmung der Verteilung der Vakuolen in den verschiedenen Fraktionen benutzt. Auf diese Weise konnte die Verteilung verschiedener Pasen zwischen Vakuolen und Zytoplasma ermittelt werden. Ueber 80 % der EndoPPase, der ExoPPase, der Gl. 1 Pase und des Aktivators der ExoPPase sind in den Vakuolen lokalisiert. Eine Gruppe von Phosphatase-aktivitäten (Gl. 6 Pase, Fr. 6 Pase,  $\beta$ -Glyc.Pase) sind zusammen mit der alkalischen Pase zu rund 50 % vakuolär bzw. extravakuolär. UTPase, GTPase und ADPase sind nur zu rund 10 - 30 % in den Vakuolen enthalten. Die TriPPase, PyroPase und  $\alpha$ -Glyc.Pase befinden sich beinahe ausschliesslich im extravakuolären Raum. Innerhalb der Vakuole ist ein Anteil von ca. 50 - 60 % der Pase -Aktivitäten im Zellsaft gelöst; der Rest ist an

die Vakuolenmembran gebunden. Eine Ausnahme bildet die EndoPPase, welche bis zu 70 % an die Tonoplasten gebunden ist.

## ABSTRACT

The aim of the present work was to elucidate the subcellular location, the function and metabolism of polyphosphate (PP) in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

Practically all of the PP contained in protoplasts is present in a particulate fraction which can be obtained upon gentle lysis of protoplasts under isotonic conditions. This fraction contains most of the vacuoles. Upon the purification of vacuoles PP is enriched to the same extent als are markers of the vacuolar membranes ( $\alpha$ -mannosidase) and of the soluble vacuolar material (arginine). PP is located in the vacuolar sap.

The vacuolar PP represent a storage pool of phosphate. It also functions as an ion trap of basic amino acids which represent the storage pool of nitrogen. The binding capacity of both, synthetic and natural vacuolar polyphosphate can be demonstrated by using equilibrium dialysis. Under normal culture conditions the cellular contents of arginine and PP are closely correlated. Under certain conditions the arginine content markedly exceeds the polyphosphate content. Upon the isolation of vacuoles from corresponding cells, the efflux of the excessive arginine which ist not bound by PP takes place. In cells starved for both, phosphate and nitrogen, a most rapid and excessive synthesis of PP is initiated upon the supply of phosphate and nitrogen. This PP overcompensation is accompanied by a corresponding accumulation of arginine. PP overcompensation does not occur in the absence of an exogeneous source of nitrogen.

Several phosphatase activities that are enriched in isolated vacuoles were characterised. PP is degraded by a vacuolar endoPPase as well as by an exoPPase. The latter activity can be distinguished from alkaline Pase and other phosphatases on the basis of differential sensitivity towards inhibitors and chromatographical separation. ExoPPase which is partially bound to vacuolar membranes is activated by a principle located in the vacuolar fluid. This activator is heat stable, hardly dialysable, not digested by subtilisin, RNase and acid phosphatase, acid labile and possesses negative charges. The affinity

of exoPPase to synthetic polyphosphates is proportional to the degree of polymerisation. Various phosphatases as well as a number of other enzymes and substances were analysed with regard to their absolute distribution between vacuoles and the extravacuolar compartments.