

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF YEAST TONOPLAST FRAGMENTS

Abhandlung

zur Erlangung des Titels

eines Doktors der Naturwissenschaften

der

Eidgenössischen Technischen Hochschule

vorgelegt von

Willem van der Wilden

Ingenieur Biologie, Landbouw Hogeschool Wageningen

Geboren am 31. Januar 1950 in Utrecht

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Ph. Matile, Referent

Prof. Dr. A. Fiechter, Korreferent

1978

Abstract

Vacuoles isolated from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae* contain a high specific activity of α -mannosidase. This hydrolase appears to be associated exclusively with the vacuolar membrane (tonoplast). It is a stable enzyme which is tightly bound to the membrane, and was thus suitable as a marker-enzyme for isolating tonoplast fragments from homogenates of whole yeast cells.

Attempts to isolate tonoplasts by employing chromatographic techniques such as affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography failed. The corresponding studies revealed that the stability of tonoplast fragments requires the presence of Mg^{2+} and K^+ in the medium.

The isolation of tonoplast fragments was achieved by combined differential and density equilibrium centrifugation in Urografin gradients. The final preparation was free of enzyme activities associated with organelles other than vacuoles; it was also free of β -glucosidase which is present in the vacuolar fluid. Apart from α -mannosidase, ATPase and NADH-DCIP oxidoreductase were enriched in the purified tonoplasts. A small amount of RNA, presumably ribosomal RNA, is associated with a fraction of tonoplast fragments. The isolation procedure is suitable for preparing tonoplasts independent on the physiological condition of the yeast cells.

Isolated tonoplasts were compared with the plasmalemma regarding the chemical composition. The tonoplast contain a considerably higher proportion of protein than the plasmalemma. Regarding the lipid composition, this membrane contains a much higher proportion of ergosterol (ca. 40 % of the total lipid content) as compared with the tonoplast (ca. 8 %). In contrast, the tonoplast is much richer in phospholipids (ca. 28 %) than the plasmalemma (ca 7 %). Marked changes in the protein composition of tonoplasts as caused by the growth conditions were observed in the class of proteins with molecular weights between 15'000 and 30'000 Dalton.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Sphäroplasten von Saccharomyces cerevisiae isolierte Vakuolen enthalten eine hohe spezifische Aktivität von α -Mannosidase. Annähernd 90 % der totalen Aktivität dieser Hydrolase ist in den Vakuolen lokalisiert. Die α -Mannosidase ist mit der Vakuolenmembran (Tonoplast) verbunden. Sie ist stabil, nur mit Detergentien von der Membran ablösbar und daher als Leitenzym für die Isolation von fragmentierten Tonoplasten aus konventionellen Homogenaten von ganzen Hefezellen geeignet.

Versuche zur Isolation von Tonoplasten mit Hilfe von chromatographischen Methoden misslangen. Die affinitätschromatographische Reinigung wurde mit einem vermeintlich biospezifischen Gel, welches den α -Mannosidase-Inhibitor Mannosamin als Liganden enthielt, versucht. Weil eine starke biounspezifische Bindung der Membranen an dieses Gel auftrat, war die Desorption der Tonoplasten unmöglich. Gewisse hydrophobe Gele adsorbierten die Tonoplastfragmente reversibel, jedoch konnte ihre vollständige Abtrennung von anderen Membranen nicht erreicht werden. Versuche mit nicht modifiziertem Agarose-Gel zeitigten die Notwendigkeit zur Gegenwart von Mg^{2+} und K^+ im Medium für die Stabilisierung der Tonoplastfragmente.

Die Isolation der Tonoplastfragmente wurde durch eine Kombination von differentieller und Dichtegleichgewichts-Zentrifugation erreicht. Die Zentrifugation des Homogenats bei 20'000 x g (10 min) führte zu einem Ueberstand, welcher weitgehend frei von Mitochondrien und Plasmalemma war. Die Tonoplasten wurden aus diesem Ueberstand auf eine Schicht von Urografin (1.160 g/ml) zentrifugiert (60 min; 50'000 x g). Die resultierende rohe Tonoplastenfraction wurde auf lineare Dichtegradienten von Urografin (1.105 - 1.160 g/ml) aufge-

laden. Nach Zentrifugation (6 h; 200'000 x g) befanden sich die Tonoplastfragmente konzentriert in einer Gradientenzone mit Dichte ca. 1.13 g/ml.

Die Fraktion der gereinigten Tonoplasten war frei von Enzymaktivitäten, welche mit anderen Organellen als Vakuolen verbunden sind. Sie war auch frei von β -Glucosidase, einem löslichen Vakuolenenzym. Ausser α -Mannosidase, ATPase und NADH-DCIP-Oxidoreduktase konnten keine Enzymaktivitäten in der Tonoplastenfraktion festgestellt werden. Eine geringe Menge von RNS, wahrscheinlich ribosomaler RNS, ist mit einem Teil der Tonoplastvesikel verbunden.

Die Methode für die Isolation von Tonoplasten ist für verschiedene physiologische Zustände der Hefezellen tauglich.

Die Induktion des Wachstums ist von der Abnahme der spezifischen Aktivitäten von α -Mannosidase und NADH-DCIP-Oxidoreduktase, und von einer Zunahme der spezifischen ATPase-Aktivität in den isolierten Tonoplasten begleitet. Ferner erfolgt beim Uebergang von der stationären Wachstumsphase zu exponentiellem Wachstum eine deutliche Verschiebung der Proteinzusammensetzung der Vakuolenmembran. Der relative Anteil an Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 15'000 und 30'000 Dalton nimmt zu.

Isolierte Tonoplasten wurden hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung mit isoliertem Plasmalemma verglichen. Der Tonoplast enthält wesentlich mehr Protein als das Plasmalemma. Vom totalen Lipidgehalt entfällt beim Tonoplast relativ wenig auf Ergosterin (ca. 8 % verglichen mit ca. 40 % beim Plasmalemma), wogegen der Gehalt an Phospholipiden mit ca. 28 % (Plasmalemma: ca. 7 %) verhältnismässig hoch ist.