

Zur Strategie der Zellfraktionierung

Von

PHILIPPE MATILE

Aus dem Institut für Allgemeine Botanik ETH Zürich

Die Entwicklung von neuen, leistungsfähigeren Methoden zur Isolation von Zellstrukturen stellt auf die bereits bekannten biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Organellen ab; Grösse, Gestalt und Dichte des darzustellenden Zellbestandteils bestimmen die Planung der Fraktionierung. Wer Mitochondrien oder Peroxisomen isolieren will, kennt die Bedingungen unter welchen sie sedimentieren, ferner die Enzyme, welche er bei der Beurteilung des Isolats ein- oder ausschliessen muss.

Die Morphologen entdecken indessen mitunter auch neue Strukturen, oft membranumschlossene Vesikel ohne besondere Merkmale. Insbesondere sind meistens biochemische Eigenschaften, aus welchen die Funktion abgeleitet werden könnte, zunächst nicht bekannt. In diesen Fällen müsste eine Strategie der Zellfraktionierung, die zur Isolation des Organells führen soll, gewissermassen mit verbundenen Augen gefunden werden. Weil dies unmöglich ist, muss man sich mindestens ein verlässliches oder verdächtiges Leitmerkmal verschaffen oder einfallen lassen.

Das folgende Beispiel geht auf MOORS (1967) Entdeckung zurück, wonach die Sprossbildung bei Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) mit Sekretbläschen verbunden ist, die, vom endoplasmatischen Retikulum gebildet, ihren Inhalt an der Stelle der entstehenden Tochterzelle in die Zellwand ausschütten (Fig. 1). Diese Vesikel haben einen Durchmesser von ca. $0,1 \mu\text{m}$, dürften sich daher im Extrakt morphologisch kaum von den vesikulären Fragmenten anderer Membransysteme unterscheiden. Geht man von ihrer möglichen Funktion aus, stösst man jedoch auf das Phänomen der plastischen Deformation der Zellwand am Ort der Sprossung; dieses Phänomen könnte durch lokal in die Zellwand sezernierte Enzyme hervorgerufen werden. In der Tat macht NICKERSON (1963) eine Protein-Disulfidreduktase, welche S-S-Brücken zwischen den Glykoproteinen der Zellwand löst, für die veränderten Eigenschaften der Zellwand verantwortlich. Arbeiten von JOHNSON (1968 a, b) sowie SHIMODA und YANAGISHIMA (1968) bieten Anhaltspunkte für die Beteiligung von β -Glucanasen, welche die Ketten der Zellwandglucane spalten.

Nachdem sich Disulfidreduktaseaktivität im verwendeten *Saccharomyces*-Stamm überhaupt nicht nachweisen liess, blieben einzig die β -Glucanasen als mögliche Leitenzyme bei der Zellfraktionierung übrig. Allerdings gewann die entsprechende

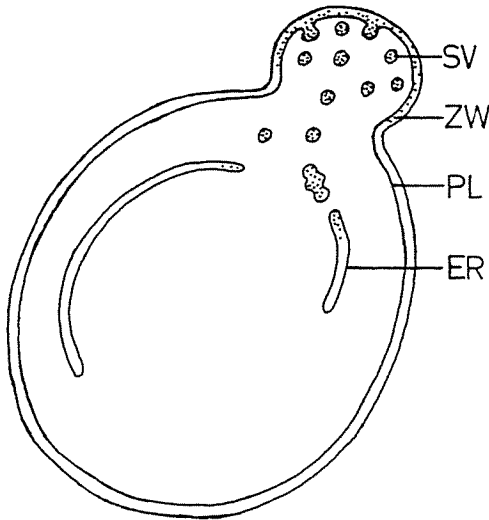


Fig. 1. Beteiligung von Sekretvesikeln (SV) im Sprossbildungsprozess bei *Saccharomyces cerevisiae*
 ZW = Zellwand, PL = Plasmalemma, ER = Endoplasmatisches Retikulum.

Hypothese bald an Wahrscheinlichkeit, als sich in CORTATS (1971) Experimenten zeigte, dass die gesamte Exoglucanaseaktivität einer synchron sprossenden Population stufenweise, und zwar jeweils kurz vor dem Einsetzen der Sprossbildung ansteigt. Die Beziehung zum Wachstum konnte ferner an der im Vergleich zu stationären Zellen wesentlich höheren spezifischen Glucanaseaktivitäten der exponentiell wachsenden Hefepopulation abgelesen werden. CORTAT (1971) konnte ferner in nackten Protoplasten ca. 20% intrazellulär lokalisierte Aktivität feststellen (80% sind also ausserhalb des Plasmalemmas lokalisiert) und zeigen, dass ein überwiegender Teil derselben sedimentierbar, also strukturgebunden vorliegt.

Die nach diesen Vorarbeiten einsetzende Zellfraktionierung zeigte bald, dass Exoglucanaseaktivität mit mindestens drei Populationen von subzellulären Partikeln assoziiert ist: aus Extrakten sedimentierbares Material (60 Min. 150 000 x g) wurde auf lineare Dichtegradienten von Urografin¹ geschichtet und die Verteilung der Enzymaktivität nach Zentrifugation (2,5 Std., 39 000 rpm) im Spinco SW-39 Rotor ermittelt (Fig. 2). Es galt nun herauszufinden, welche dieser verschiedenen dichten Partikelpopulationen eine eindeutige Beziehung zur Sprossung aufweist. Hierzu wurden Extrakte aus einer exponentiell wachsenden Zellpopulation (konstanter Anteil an sprossenden Zellen) und aus stationären Zellen (keine Sprossung, keine Sekretbläschen) unter identischen Bedingungen der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Auf den in Fig. 3 wiedergegebenen Verteilungskurven der Exoglucanaseaktivitäten fehlt offensichtlich im Fall der stationären Zellen das Partikelmaterial mit einer Dichte von ca. 1,14 gcm⁻³. Die Vermutung, dass hier die fraglichen Vesikel zu suchen sind, wurde ferner durch eine frühere Identifikation (MATILE et al. 1967)

¹) Urografin: Methylglucaminsalz der N,N'-Diäcetyl-3,5-diamino-2,4,6-trijodbenzoesäure.

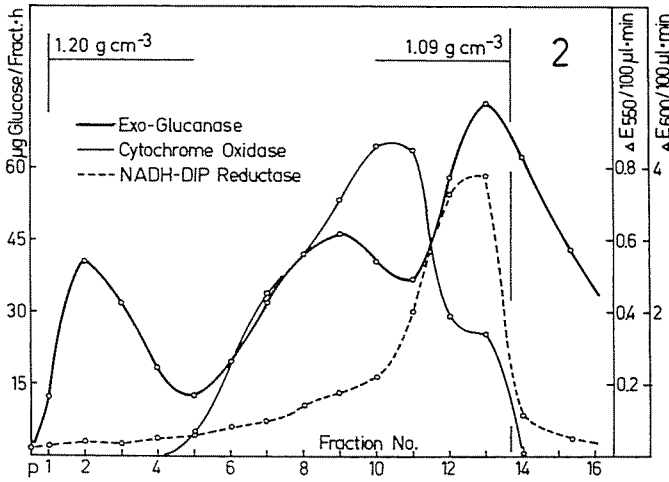


Fig. 2. Verteilung der sedimentierbaren Aktivität von drei Enzymen in Dichtegradienten von Urografin. Ausgangsmaterial: exponentiell wachsende Zellen.

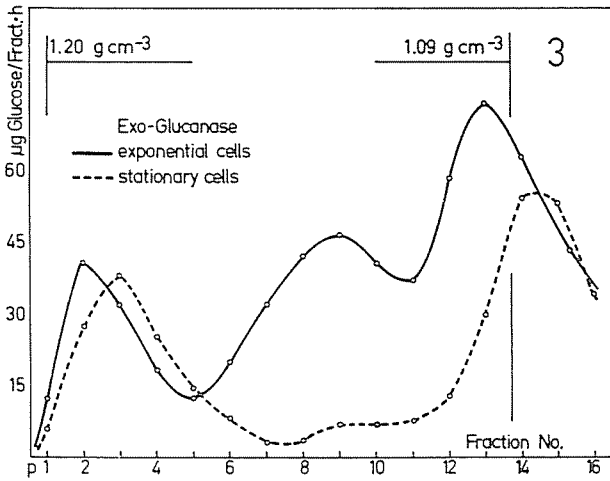


Fig. 3. Vergleichende Fraktionierung von Extrakten aus exponentiell wachsenden und stationären Zellen. Verteilung der sedimentierbaren Exo-Glucanase-Aktivitäten in Urografingradienten.

des Glucanasegipfels bei Urografindichte ca. $1,19 \text{ g cm}^{-3}$ mit Fragmenten des Plasmamembrans und die Gegenwart von Elementen des ER in der leichtesten glucanasehaltigen Fraktion unterstützt.

Aus der Verteilung mitochondrialer Enzyme (Fig. 2) geht hervor, dass die Mitochondrien das Dichtegleichgewicht in derselben Zone der Urografingradienten erreichen, wie das vielversprechende glucanasehaltige Material. Es war daher zunächst unumgänglich, durch differentielle Zentrifugation die Trennung dieser zwei Komponenten anzustreben. Aus der Situation hinsichtlich der Glucanase geht klar hervor,

dass dabei jede differentiell sedimentierte Fraktion in Urografingradienten ausgewertet werden musste. Trotz der grundsätzlichen Mängel der differentiellen Zentrifugation war es möglich, eine mitochondrienarme Fraktion zwischen 20 000 x g (20 Min.) und 55 000 x g (20 Min.) zu erhalten, die einen Grossteil der Glucanasepartikel enthielt; ein geringer Anteil geht zusammen mit den Mitochondrien und einem beträchtlichen Teil der Plasmalemmafragmente ins 20 000 x g-Sediment. Es liegt auf der Hand, dass die Zonalzentrifugation auf dieser Stufe der Fraktionierung gegenüber der konventionellen Differentialzentrifugation grosse Vorteile geboten hätte.

Die letzte Stufe der Isolation umfasste die Auftrennung von grösseren Mengen der differentiell sedimentierten Fraktion auf etwas flacheren Urografingradienten im SW-25 Rotor (Fig. 4). Die drei Banden der Glucanasemaxima wurden isoliert, die Partikel aus Sorbitmedium sedimentiert und damit vom Urografin freigeschwenkt.

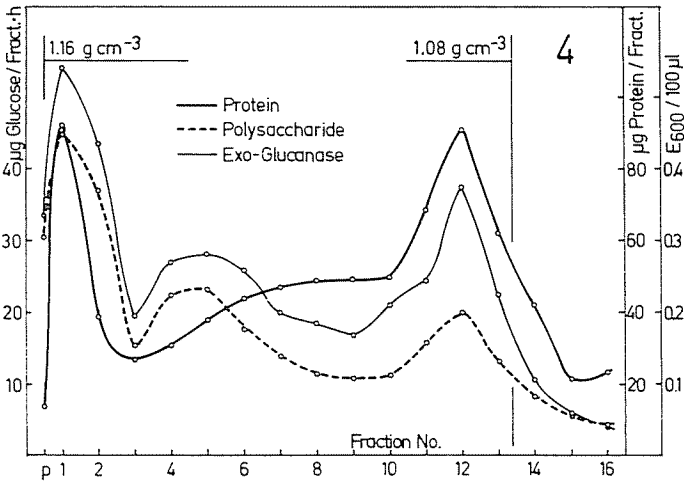


Fig. 4. Isolation der Glucanasevesikel durch Dichtegradienten-Zentrifugation einer differentiell zwischen 20 und 55 000 x g sedimentierten Fraktion aus exponentiell wachsenden Zellen. Das gesuchte Material ist in den Fraktionen 4-6 enthalten.

Die morphologische Analyse der vermuteten Sekretbläschen ergab, bei befriedigender Reinheit der Fraktion, die Gegenwart von Membranvesikeln mit Durchmessern vergleichbar mit jenen der von MOOR (1967) beobachteten Vesikel. Hohe spezifische Exoglucanaseaktivität und ein erstaunlich hoher Gehalt an Mannan zeichnen das Isolat in biochemischer Hinsicht aus; ferner konnte die Gegenwart von Endoglucanase nachgewiesen werden (MATILE et al. 1971). Ein absolut schlüssiger Nachweis der Identität des Isolats mit den Sekretbläschen, welche die Sprossbildung induzieren, steht selbstverständlich noch aus. Mit guten Gründen kann indessen die Hypothese vertreten werden, dass die lokale Ausscheidung von Glucanasen die Hefezellwand modifiziert und die durch den Turgor bewirkte plastische Deformation zur Ausstülpung des Sprosses führt.

Das geschilderte Beispiel einer Zellfraktionierung zeigt, wie eine zielstrebige Strategie erst dann entwickelt werden kann, wenn ein absolutes Minimum an (möglichen) Merkmalen einer Struktur bekannt ist. Im vorliegenden Fall war es die Aktivität eines Leitenzyms, welches, wie sich später zeigte, nicht einmal ausschliesslich mit dem gesuchten Organell assoziiert ist. Ausschlaggebend für das Gelingen der Isolation war schliesslich die Möglichkeit, zwei Zustände der Zellen, sprossende Zellen mit und stationäre ohne Sekretbläschen vergleichend zu fraktionieren.

Die Firma Schering AG, Berlin, hat freundlicherweise grössere Mengen von Urografin zur Verfügung gestellt.

Literatur

- CORTAT, M. (1971): Diss. ETH Zürich Nr. 4667.
JOHNSON, B. F. (1968a): *J. Bacteriol.* 95, 1169.
— (1968b): *Exp. Cell Res.* 50, 692.
MATILE, PH., MOOR, S. and MÜHLETHALER, K. (1967): *Arch. Mikrobiol.* 58, 201.
MATILE, PH., CORTAT, WIEMKEN, A. and FREY-WYSSLING, A. (1971): *Proc. Natl. Acad. Science USA* 68.
MOOR, H. (1967): *Arch. Mikrobiol.* 57, 135.
NICKERSON, W. J. (1963): *Bacteriol. Rev.* 27, 305.
SHIMODA, C. and YANAGISHIMA, N. (1968): *Physiol. Plant.* 21, 1163.