

Betrachtungen über die energetischen Verhältnisse total- und partiell-atmungsdefekter (TRD, PRD) haploider Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*

OTTO BALÁZS

Physiologisches Institut der Universität Bonn, Bonn

ABSTRACT: Considerations on the energetic relations in totally or partially respiratory deficient (TRD, PRD) haploid mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Long-term observations have shown that "totally" respiration-deficient (TRD) chromosomal mutants ($p\varrho^+$) isolated after nitrite treatment of haploid *Saccharomyces cerevisiae* strains very often give origin spontaneously to "partially" respiration-deficient (PRD) chromosomal mutants ($p'\varrho^+$). While cultures of vegetative ($P\varrho^-$) and chromosomal ($p\varrho^+$) TRD-mutants cannot utilize non-fermentable carbon sources such as acetate, $p'\varrho^+$ -strains can utilize acetate, although their consumption is slow and always less than that of $P\varrho^+$ (wild) strains with intact respiration. Q_{O_2} and Q_{CO_2} measurements during the stationary phase on glucose substrate permit the calculation of the oxidative (OEP) and fermentative (FEP) and thus the total (GEP) energy production. From these values a strain-specific respiratory-activity-quotient (AQ) can be calculated. The group of the PRD strains shows a "continuous" transition from the TRD mutants to the "wild" $P\varrho^+$ strains. All RD mutants have a tendency to maintain their total energy production values by means of an intensified fermentation. The diminution of the OEP resulting from the RD mutation exceeds that of the GEP by approximately 60 to 70 %. The rate of oxygen uptake is increased by a raised p_{O_2} in $p'\varrho^+$ mutants. This is not the case with TRD mutants. Whether or not the tendency to endogenous regeneration as shown by the frequent spontaneous occurrence of the process $p\varrho^+ \rightarrow p'\varrho^+$ can be regarded as a genetic "long-term regulation" is discussed.

EINLEITUNG

Hefezellen sind bei Unterdrückung der Atmung durch bestimmte exogene oder endogene Faktoren in der Lage, ihren Energiebedarf durch Gärung zu decken und infolgedessen lebensfähig zu bleiben. Dadurch besteht die Möglichkeit, genetisch atmungsdefekte Hefezellen näher zu untersuchen.

Ursprünglich unterschied man drei Typen atmungsdefekter Hefemutanten (EPH-RUSSI 1953, PITTMAN et al. 1960)¹: (1) „Vegetative“ Atmungsmutanten („petite“-Mutanten), $P\varrho^-$, mit vegetativ vererbbaaren extrachromosomalen Veränderungen.

¹ Die Bezeichnung der Mutantentypen wurde von SHERMAN & SLONIMSKI (1964) übernommen: P/p bedeutet chromosomal, ϱ^+/ϱ^- extrachromosomal bedingte Fähigkeiten, nicht vergärbare C-Quellen zu verwerten/nicht zu verwerten. Ergänzend wurden p' und ϱ' als Bezeichnung eines partiellen Atmungsdefektes eingeführt (BALÁZS 1966).

(2) „Spaltungsmutanten“ (Chromosomal- oder Kern-Mutanten) p_Q^+ , mit rezessiv-chromosomalem Erbfaktor. (3) Doppelmutanten, p_Q^- , mit Atmungsdefekt beider Arten.

Diese drei Gruppen atmungsdefekter Mutanten sollen zusammenfassend als total atmungsdefekte (TRD) Mutanten bezeichnet werden, da diese lediglich eine cyanresistente Restatmung (etwa 3 bis 5 % der Gesamtatmung) aufweisen und nicht mehr in der Lage sind, nicht vergärbare C-Quellen (z. B. Acetat, Laktat, Glycerin und Äthanol) zu verwerten und darauf zu wachsen. Die Bezeichnung „total“ erstreckt sich nicht auf die cyanresistente Restatmung.

Während P_Q^- -Mutanten spontan entstehen oder zum Beispiel durch Acriflavinbehandlung leicht hergestellt werden können, waren p_Q^+ -Mutanten nur sehr selten zu finden (PITTMAN et al. 1960). Erst durch die mutagene Einwirkung von HNO_2 ist es gelungen (BALÁZS unpubliziert), Spaltungsmutanten in großer Zahl herzustellen und sie mit Hilfe der Kreuzungs-Methode (EPHRUSSI 1953, PITTMAN et al. 1960, BALÁZS 1966) zu identifizieren beziehungsweise von den vegetativen Mutanten zu trennen.

Während langjähriger Beobachtungen an so erhaltenen p_Q^+ -Mutanten sind sehr häufig sogenannte „Rückmutationen“ aufgetreten. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen dieser Stämme ergaben – wie im folgenden berichtet wird – daß sie in einer vierten Gruppe atmungsdefekter Mutanten zusammenzufassen sind: (4) Partiiell atmungsdefekte chromosomale Mutanten p'_Q^+ , (PRD), deren Atmungsfähigkeit weit über der üblichen Restatmung von TRD-Stämmen liegt, aber geringer ist, als die Atmung der atmungsintakten P_Q^+ -Stämme (Wild). Diese partiell atmungsdefekten (PRD)-Stämme entstanden spontan aus p_Q^+ -Mutanten.

Als PRD vegetative Mutanten, P_Q' , sind wahrscheinlich die von AVERS et al. (1965) beschriebenen „respiration competent“ Stämme einzuordnen. Eine „Normalisierung“ von P_Q^- -Mutanten – wie sie KRAEPELIN (1964) berichtet – wurde von uns unter den gewählten Bedingungen nie gefunden.

Die Hefestämme, die zu diesem vierten Typ von RD-Mutanten gehören, können Acetat als C-Quelle langsam verwerten und sind somit durch langsames Wachstum auf Acetatsubstrat erkennbar. Diese Eigenschaft bleibt konstant vererbbar. An dieser Stelle sollen nur die energetischen Verhältnisse haploider RD-Hefestämme betrachtet werden.

MATERIAL UND METHODEN

Sämtliche untersuchten Mutanten sind Abkömmlinge zweier haploider *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme entgegengesetzten Paarungstyps. Der eine ist Paarungstyp α , Mangelmutant (ly, ileu, leu); im folgenden werden dieser Stamm und die Abkömmlinge dieses Stammes mit A und einer Katalognummer bezeichnet. Der andere ist Paarungstyp a , prototroph (wächst auf modifiziertem WICKERHAM-Nährboden, BALÁZS 1965); im folgenden werden dieser Stamm und seine Abkömmlinge mit C und einer Katalognummer bezeichnet.

Die p_Q^+ - und ein Großteil der P_Q^- -Mutanten wurden durch Behandlung mit salpetriger Säure hergestellt, nach der Methode, die KAUFERWITZ (1959) an *Escherichia coli* verwendet hat. Aus dem C-Stamm entstanden durch Nitritbehandlung auch mono-

und polyauxotrophe Stämme mit intakter (z. B. C124, C214) beziehungsweise defekter Atmung. Bei der Zusammenstellung der Ergebnisse werden diese Stämme von den autotrophen gesondert behandelt. Einige polyauxotroph gewordene Stämme wiesen einen Bedarf an 6 bis 7 Aminosäuren auf (BALÁZS 1965). Pq^- -Mutanten wurden auch durch Acriflavinbehandlung erhalten (EPHRUSSI 1953). Die Trennung der pq^+ - von den Pq^- -Mutanten wurde mit Hilfe der Querstempelmethode (BALÁZS 1966) vorgenommen.

Neben dem üblichen Hefeextrakt-Glukose-Nährboden (zur Züchtung der Stämme) wurde ein Acetatnährboden mit Phenolrotindikator verwendet, auf dem TRD-Mutanten nicht wachsen, der aber bei atmenden Stämmen infolge oxydativen Acetatverbrauchs immer mehr alkalisch wird, was durch Rotfärbung des Indikators angezeigt wird. Der Acetatverbrauch kann quantitativ mit Hilfe potentiometrischer Titration bestimmt werden.

Q_{O_2} - und Q_{CO_2} -Messungen wurden durch die direkte Methode von WARBURG in einer Lösung mit 0,01 m Glukose-Endkonzentration und einem Phosphatpuffer von pH 4,5 vorgenommen (UMBREIT, BURRIS & STAUFFER 1964).

Sauerstoffverbrauchsmessungen auf Acetat-Nährboden wurden mittels einer neu entwickelten manometrischen Methode durchgeführt, mit der Gasstoffwechsellmessungen unter Züchtungsbedingungen auch über lange Zeitdauer durchführbar sind (BALÁZS 1966).

ERGEBNISSE

In Tabelle 1 sind die qualitativen Beobachtungsergebnisse über das Verhalten der verschiedenen Stämme in Schüttelkulturen auf Hefeextrakt-Glukose- und Acetat-Nährlösungen zusammengestellt.

Die Restglukose wurde nach 24 Stunden photometrisch bestimmt. Der Acetatver-

Tabelle 1

Glukoseverbrauch und Acetatverwertung von Pq^+ - und RD-Stämme in Schüttelkulturen

Mutations-typ	Stamm-bezeichnung	Zahl der untersuchten Stämme	Rest-glukose ¹ mg/ml	Zeitdauer der Verfärbung des Acetatnährbodens ²
Pq^+	C	12	~ 0,3	9 ± 3 h
	A	6	~ 0,5	11 ± 1 h
pq^+	C	15	0,1	} Keine Veränderung während 10tägiger Beobachtungszeit
	A	8	0,1	
Pq^-	C	17	0,1	
	A	22	0,1	
$p'q^+$	C	28	~ 0,2	etwa 1 bis 4 Tage je nach Stamm verschieden
	A	7	~ 0,2	

¹ Nach 24 Stunden Inkubationsdauer in 1 % Glukose-Hefeextrakt-Nährboden. - ² Auf 2,0 % Na-Acetat-Hefeextrakt-Nährboden pH: 5,6 (Phenolrot-Indikator)

brauch dagegen wurde nur qualitativ durch die Verfärbung des zugesetzten Phenolrot-indikators (Umschlag von Gelb in Tiefrot) angezeigt und die dazu benötigte Zeitdauer angegeben. Alle Mutanten verbrauchten die angebotene Glukosemenge innerhalb von 24 Stunden fast vollständig. Signifikant unterschiedliches Verhalten zeigen sie jedoch auf Acetat-Nährboden.

Als TRD-Mutanten wurden diejenigen Stämme betrachtet, die auf Acetat-Nährboden während 10tägiger Beobachtungen keine Farbveränderungen des Indikators hervorriefen. Atmungsintakte P_0^+ -Stämme benötigten hingegen für eine intensive Rotfärbung maximal 12 Stunden. Stämme, die erst nach 24 Stunden Farbveränderungen bewirkten, wurden als PRD-Mutanten betrachtet.

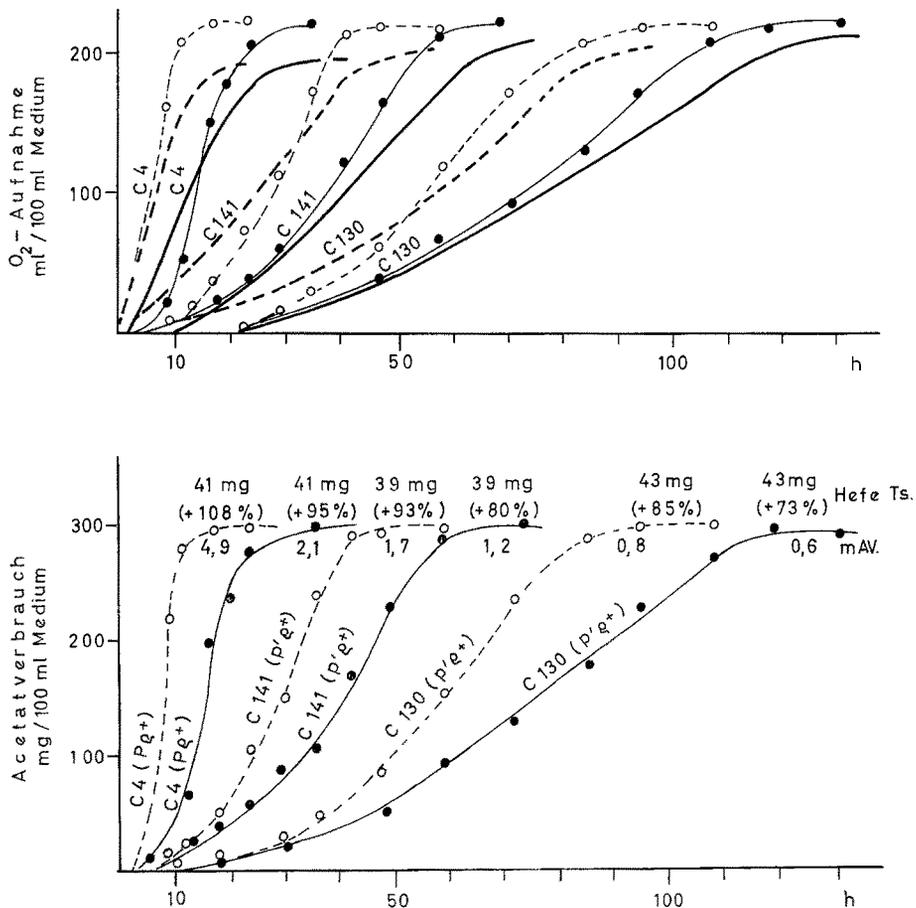


Abb. 1: Acetat- und O₂-Verbrauch von P_0^+ - (C 4) und p'_0^+ - (C 141, C 130) Stämme. Stark ausgezogene Linien: gemessen in Luft; stark ausgezogene Strichlinien: gemessen in reinem O₂; schwach ausgezogene Linien: Sollwerte des O₂-Verbrauchs in Luft und in reinem O₂ (Strichlinie), berechnet aus den gemessenen Acetatverbrauchswerten

Acetat- und O₂-Verbrauchsbestimmungen in Acetat-Nährboden unter Züchtungsbedingungen

Um die einzelnen Stämme hinsichtlich ihrer recht unterschiedlichen Verwertung von angebotenen C-Quellen exakt miteinander vergleichen zu können, sind quantitative Messungen erforderlich. Die rasche Glukoseverwertung sämtlicher Stämme ermöglicht es, die Glukoseverbrauchsmessungen auch in Ruhephase mit Hilfe der WARBURG-Methode durchzuführen; dagegen ließ die langsame Acetatverwertung der PRD-Stämme dieses einfache Verfahren nicht zu. Auf Grund der zu erwartenden langen Meßdauer in Acetatmedium bei Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, ist mit einer Änderung der physiologischen Beschaffenheit des zu untersuchenden Zellmaterials zu rechnen. Außerdem ergeben sich bei Anwendung der WARBURG-Methode kaum zu umgehende meßtechnische Schwierigkeiten, die ebenfalls durch die lange Meßdauer bedingt sind.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden die vergleichenden quantitativen Messungen hinsichtlich des Acetatverbrauchs nicht in der Ruhephase durchgeführt, sondern unter Züchtungsbedingungen, das heißt auf Acetat-Nährboden in Anwesenheit von Hefeextrakt. Der Acetatverbrauch wurde potentiometrisch, der O₂-Verbrauch manometrisch bestimmt (BALÁZS 1966).

Die unter diesen Bedingungen ermittelten Acetat- und O₂-Verbrauchswerte ergeben einen charakteristischen, S-förmigen Kurvenablauf (Abb. 1), der wahrscheinlich durch die Zellvermehrung bedingt wird. Deshalb wurde der „mittlere Acetatverbrauch“ (mAV) angegeben: Aus der gemessenen Zeitdauer, in der die gesamte angebotene Acetatmenge verbraucht wurde (Plateau), wurde der lineare Acetatverbrauch berechnet und auf 10 Std. und 1 mg Trockengewicht der Einsaatmenge bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabellen 2 bis 4 (Spalte 10) zusammengefaßt.

Die auf Acetatsubstrat ermittelten O₂-Verbrauchswerte, die jedoch mit den theoretischen Sollwerten nicht übereinstimmen, was auch auf einen Zellzuwachs zurückzuführen ist, verlaufen mit den Acetatverbrauchswerten parallel. Erhöhter P_{O₂} bewirkt eine Steigerung des Acetatverbrauches und gleichzeitig eine zunehmende O₂-Aufnahme. Einige charakteristische Beispiele sind in Abbildung 1 dargestellt.

Atmungsmessungen auf Glukosesubstrat während der Ruhephase

Da Glukose sowohl von P_O⁺-Stämmen als auch von den TRD- und PRD-Mutanten schnell verwertet wird, besteht die Möglichkeit, die Atmung auf Glukose während der Ruhepause mit der direkten WARBURG-Methode zu messen. Es wurden stammcharakteristische Meßwerte erhalten sowohl für alle drei Gruppen der Atmungsmutanten als auch für die P_O⁺-Stämme. Die Ergebnisse sind in Tabellen 2 bis 4 angegeben.

Auf Grund der ermittelten Q_{O₂}- beziehungsweise Q_{CO₂}-Werte wurden die entsprechenden Energieproduktionen (OEP und FEP) berechnet, deren Summe die Gesamtenergieproduktion (GEP) ergibt. Die Berechnung der Energieproduktion beruht

Tabelle 2
Ergebnisse der Atmungsmessungen an atmungsintakten und RD-mutierten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen

Muta- tions- typ	Auxo- trophie- grad	Stamm- bezeich- nung	Q _{O₂}	Q _{CO₂}	OEP	Energieproduktion cal. 10 ⁻³ /mg Ts/h FEP	GEP	AQ	mAV	Anmerkungen	
Pq ⁺	0	C 1	67	120	342	66	408	84			
	0	C 4	70	130	357	75	432	83	2,2		
	0	C 3	75	145	383	89	472	81	2,2		
	0	C 2	64	135	327	89	416	79			
		M ± σ			352 ± 24	80 ± 11	432 ± 29	82 ± 2			
P'q ⁺	0	C 212	46	161	235	144	379	60	1,7		
	0	C 128	46	180	235	168	403	58			
	0	C 141	40	189	208	186	394	48	1,2		
	0	C 112 III	33	190	169	196	365	46	1,1		
	0	C 204	25	174	128	186	314	41			
	0	C 203	27	238	138	238	376	37	0,6		
	0	C 110	27	246	136	274	410	33	0,8		
	0	C 142 II	20	218	102	247	349	29			
	0	C 130	21	236	105	269	374	28	0,6		
		M ± σ			162 ± 52	212 ± 48	374 ± 33	42 ± 12			
Pq ⁺	0	C 142 I	15	247	75	290	365	21			
	0	C 135/5	11	217	55	258	317	18			
	0	C 152	10	240	49	288	337	12			
	0	C 119	7,4	253	38	307	345	11			
	0	C 118	6,3	268	32	327	359	9			
	0	C 111	4,5	247	23	303	326	7			
		M ± σ			45 ± 18	296 ± 24	341 ± 20	13 ± 5			
Pq ⁻	0	C 106	3,9	215	20	264	284	7,0		Acriflavinbehandlung	
	0	C 107	2,9	226	15	279	294	5,0		Acriflavinbehandlung	
	0	C 117	2,9	220	15	281	296	5,0			
	0	C 118	2,0	243	10	301	311	3,3			
		M ± σ			15 ± 4	281 ± 15	296 ± 12	5,0 ± 1,6			
Maximale Ab- oder Zunahme der Energieproduktion:											
			- 96 %	+ 73 %	- 31 %						$\frac{M_{\max} - M_{\min}}{M_{\max}} \cdot 100$

Tabelle 3
Ergebnisse der Atmungsmessungen an atmungsintakten und RD-mutierten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen (Fortsetzung)

Muta- tions- typ	Auxo- trophic- grad	Stamm- bezeich- nung	Q ₀₂	Q _{CO₂}	OEP	Energieproduktion cal. 10 ⁻³ /mg Ts/h FEP	GEP	AQ	mAV	Anmerkungen
P _Q ⁺	1	C 124	62	117	316	69	385	82	2,4	
	1	C 214	58	126	316	85	381	78	2,2	
		M ± σ			306 ± 14	77 ± 11	383 ± 3	80 ± 3		
P _Q ⁺	1	C 135	49	138	250	111	361	69	1,8	
	1	C 155	35	156	179	151	330	54	1,6	
	3	C 113	29	156	148	159	307	48		
	1	C 143	24	199	123	219	342	36	0,8	
	4	C 112 II	18	178	90	200	290	31		
		M ± σ			158 ± 61	168 ± 43	326 ± 29	48 ± 15		
P _Q ⁺	4	C 112 I	14	184	69	213	282	25		Neigung zum Absterben
	7	C 116	7,6	141	38	167	205	19		
	1	C 126	10	215	50	256	306	17		
	7	C 115	6,6	190	33	229	262	13		
	1	C 142/1	6,6	209	33	253	286	12		
	1	C 114	4,1	199	21	243	264	8		
		M ± σ			41 ± 17	227 ± 34	268 ± 35	16 ± 6		
P _Q ⁻	6	C 120	3,5	142	18	173	191	9,4		Neigung zum Absterben Neigung zum Absterben Neigung zum Absterben Acridflavinbehandlung Neigung zum Absterben
	6	C 121	3,9	157	20	191	211	9,4		
	6	C 119	4,1	171	21	209	230	9,1		
	6	C 123	4,5	208	23	254	277	8,3		
	1	C 103	3,1	153	16	188	204	7,7		
		M ± σ			20 ± 3	203 ± 20	223 ± 34	8,8 ± 0,8		
Maximale Ab- oder Zunahme der Energieproduktion:										
			— 94 %	+ 66 %	— 42 %	$\frac{M_{\max} - M_{\min}}{M_{\max}} \cdot 100$				

Tabelle 4
Ergebnisse der Atmungsmessungen an atmungsinaktiven und RD-mutierten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen (Fortsetzung)

Mutations- typ	Auxo- trophie- grad	Stamm- bezeich- nung	Q _{O₂}	Q _{CO₂}	Energieproduktion cal. 10 ⁻³ /mg Ts/h			AQ	mAV	Anmerkungen
					OEP	FEP	GEP			
Pq ⁺	3	A 1	48	90	245	53	298	82	2,3	
	3	A 2	50	110	255	75	330	77	2,1	
Pq ⁺					250 ± 7	64 ± 16	314 ± 18	80 ± 3		
	3	A 121	30	106	153	95	248	62	1,5	
	3	A 119	25	144	128	149	277	46	0,9	
	3	A 113 III	20	148	102	160	262	39	0,8	
	3	A 113 II	19	158	96	174	270	35	0,8	
Pq ⁺					120 ± 27	145 ± 38	265 ± 13	46 ± 12		
	3	A 113 I	10	174	51	205	256	20		
	3	A 112	6,6	192	33	232	265	13		
	3	A 111	4,8	203	24	248	272	9		
	3	A 113/4/4	4,2	197	21	241	262	8		
Pq ⁻					32 ± 14	232 ± 19	264 ± 8	13 ± 5		
	3	A 117	2,9	184	15	226	241	6,1		Acriflavinbehandlung
	3	A 116	2,5	202	13	249	262	4,9		
	3	A 101	2,2	195	11	241	252	4,5		
				13 ± 3	239 ± 14	252 ± 11	5,2 ± 0,8			

Maximale Ab- oder Zunahme
der Energieproduktion:

— 95 % + 74 % — 20 %

$\frac{M_{\max} - M_{\min}}{M_{\max}} \cdot 100$

auf der Annahme, daß neben der Atmung eine rein alkoholische Gärung stattfindet. Die Richtigkeit dieser Annahme wird durch die gute Übereinstimmung der gemessenen mit den berechneten Werten für den Glukoseverbrauch (Abb. 2, mittlere Säulenreihe) bestätigt.

Berechnet man den prozentualen Anteil der durch Veratmung der Glukose produzierten Energiemenge (OEP) an der Gesamtenergie (GEP), erhält man einen charakteristischen Wert, den Atmungsaktivitätsquotienten (AQ). Dieser kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$AQ = \frac{OEP}{GEP} \cdot 100 = \frac{Q_{O_2} \cdot 5,1}{Q_{O_2} \cdot 5,1 + (Q_{CO_2} - Q_{O_2}) \cdot 1,25} \cdot 100$$

DISKUSSION

Quantitative Beobachtungen bei den aus atmungsintakten (P_Q^+) Stämmen nach Nitritbehandlung isolierten p_Q^+ -Mutanten führten zu der Annahme, daß aus diesen Mutanten durch spontane „Rückmutation“ ein neuer, innerhalb der RD-Mutanten abgrenzbarer Typ entsteht: Die partiell atmungsdefekten Spaltungsmutanten p'_Q^+ . Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, wurden vergleichende stoffwechselphysiologische Untersuchungen durchgeführt.

Die Aussage der in Tabelle 1 beschriebenen qualitativen Beobachtungen hinsichtlich der verschiedenartigen Acetatverwertung einzelner Mutantentypen wurde durch quantitative Messungen des Acetatverbrauchs wesentlich präzisiert. Die ermittelten mAV-Werte (Tabellen 2 bis 4, Spalte 10) ermöglichen, außer einer genauen Trennung der PRD-Stämme sowohl von den p_Q^+ -Stämmen als auch von den TRD-Mutanten, auch eine Art Klassifizierung der PRD-Mutanten. Die mAV-Werte liegen nämlich bei den P_Q^+ -Stämmen bei $2,2 \pm 0,1$, während bei dem PRD-Mutanten diese Werte eine Schwankungsbreite von 0,6 bis 1,7 aufweisen.

Bemerkenswert ist, daß die höchsten mAV-Werte (1,7) der PRD-Mutanten noch signifikant von denen der P_Q^+ -Stämme abweichen, und daß kein einziger Fall von sogenannten Rückmutanten ermittelt werden konnte, dessen mAV-Wert dem der P_Q^+ -Stämme entsprach. Noch prägnanter ist die Trennung der PRD-Stämme von den beiden TRD-Stämmen, da weder bei P_Q^- - noch bei p_Q^+ -Mutanten ein Acetatverbrauch nachweisbar war.

Gasstoffwechselfmessungen (Q_{O_2} und Q_{CO_2}) auf Glukose-Substrat ermöglichen einen Überblick über die Atmungs- beziehungsweise Gärungsverhältnisse sowohl bei den P_Q^+ -Stämmen als auch bei allen RD-Mutanten. Sie gestatten fernerhin durch die Berechnung der freiwerdenden Energiemengen die Angabe eines stammcharakteristischen Maßes für den Atmungsdefekt, welches in Form des AQ-Wertes ausgedrückt wird.

Die voneinander abweichenden Q_{O_2} , Q_{CO_2} - und GEP-Werte der Atmungsintakten P_Q^+ -Stämme lassen eine einheitliche Betrachtung sämtlicher Stämme nur bedingt zu; es sind gleichwertige Gruppen zu bilden.

Die Stämme können folgendermaßen gruppiert werden: (a) In „Hauptgruppen“, die jeweils gleichwertige, nicht atmungsspezifische Eigenschaften der verschiedenartigen

Tabelle 5

Zusammenfassung der Ergebnisse (Mittel- und Streuungswerte) von Atmungsmessungen auf Glukose-Substrat, nach genetisch verschiedenen Atmungseigenschaften geordnet

Mutations- typ	Stamm („Haupt- gruppen“)	Zahl d. Ver- suche ¹	OEP		FEP		GEP		AQ	
			M ²	± σ ³	M ²	± σ ³	M ²	± σ ³	M ²	± σ ³
Pq ⁺	C prototroph	4 (3)	352	24	80	11	432	29	82	2
	C auxotroph	2 (1)	306	14	77	11	383	3	80	3
	A auxotroph	2 (1)	250	7	64	16	314	18	80	3
		8 (5)	315		75		390		81	
	M _M ⁴			20		12		23		2,7
	M _σ ⁵									
pq ⁺	C prototroph	6 (5)	45	18	296	24	341	20	13	5
	C auxotroph	6 (5)	41	17	227	34	268	35	16	6
	A auxotroph	4 (3)	32	14	232	19	264	8	13	5
		16(13)	40		254		294		13,9	
	M _M ⁴			17		27		25		5,5
	M _σ ⁵									
Pq ⁻	C prototroph	4 (3)	15	4	281	15	296	12	5,0	1,6
	C auxotroph	5 (4)	20	3	203	29	223	34	8,8	0,8
	A auxotroph	3 (2)	13	3	239	14	252	11	5,2	0,8
		12 (9)	16,5		171		238		6,7	
	M _M ⁴			3,3		22		24		1,1
	M _σ ⁵									
p'q ⁺	C prototroph	9 (8)	162	52	212	48	374	33	42	12
	C auxotroph	5 (4)	158	61	168	43	326	29	48	15
	A auxotroph	4 (3)	120	27	145	38	265	13	46	12
		18(15)	151		177		336		44,4	
	M _M ⁴			51		45		29		13
	M _σ ⁵									
F-Test	Pq ⁺ + pq ⁺ + Pq ⁻	36(27)								
	M _σ ⁵		12		23		24,5		4,0	
	F _{15,27}		17,7		3,8		1,4		9,9	
p		< 0,001		< 0,01	nicht signifikant		< 0,001			
¹ In Klammern die Freiheitsgrade.										
² $M = \frac{\sum_i x_{ik}}{n_{ik}}$										
³ $= \sqrt{\frac{\sum_i (x_{ik} - \bar{x}_{ik})^2}{n - 1}}$										
⁴ $M_M = \frac{\sum_k n_k \cdot M_k}{\sum_k n_k}$										
⁵ $M_\sigma = \sqrt{\frac{\sum_k (n_k - 1) \sigma_k^2}{\sum_k (n_k - 1)}}$										

Stämme zusammenfassen. So entstand die Hauptgruppe der Abkömmlinge des prototrophen Stammes C, die Hauptgruppe des auxotrophen Stammes C und die Hauptgruppe der Abkömmlinge des auxotrophen Stammes A. Diese Hauptgruppen werden auf Grund der genetisch verschiedenen Atmungseigenschaften in Untergruppen unterteilt (Tab. 2, 3, 4; Abb. 2). (b) Benutzt man die verschiedenen genetisch bedingten Atmungseigenschaften als ordnendes Merkmal, werden die unter a erwähnten Hauptgruppen zu Untergruppen (Tab. 5).

Die Gesamtzahl der vorhandenen stabilen Mutanten, die also in Hauptgruppen und zusätzlich in Untergruppen geteilt werden müssen, läßt eine exakte statistische Wertung nicht zu. Die vorstehend genannten Gruppenbildungen ermöglichen aber folgende Betrachtungen: (1) Ordnet man die Stämme innerhalb der Hauptgruppen in der Reihenfolge der abnehmenden AQ-Werte (Abb. 2), findet automatisch bei allen drei Hauptgruppen eine Ordnung der Stämme von den P_Q^+ -Stämmen über die p'_Q^+ und p_Q^+ -Stämme zu den P_Q^- -Stämmen statt. In durchschnittlich gleicher Reihenfolge nehmen auch die Q_{O_2} -, OEP- und GEP-Werte ab. Dabei bilden die p'_Q^+ -Mutanten immer den Übergang von den P_Q^+ -Stämmen zu den TRD-Mutanten. Gruppiert man nach den genetisch verschiedenen Atmungseigenschaften, ergibt sich folgendes (Tab. 5): Man kann innerhalb der Gruppen der Stämme P_Q^+ , p_Q^+ , P_Q^- – trotz unterschiedlicher „Hauptgruppenwerte“ – die Q_{O_2} -, OEP- und GEP-Werte um einen Mittelwert mit relativ kleiner Streuung gruppieren. Bei den p'_Q^+ -Mutanten dagegen ist die Schwankungsbreite signifikant wesentlich höher, als bei den anderen Stämmen (siehe F-Test, Tab. 5). Dasselbe Bild ergibt sich bei den AQ-Werten: Sie liegen für die P_Q^+ -Stämme um 81 ± 3 , für die p_Q^+ -Mutanten um 14 ± 5 , für die P_Q^- -Mutanten um 7 ± 1 . Die AQ-Werte der p'_Q^+ -Mutanten fallen zwischen 25 und 70, und bilden einen Übergang zwischen den oben angegebenen Grenzwerten. Aus beiden Betrachtungsweisen geht deutlich hervor, daß die Gruppe der PRD-Stämme in dem Intervall von den P_Q^+ -Stämmen zu den TRD-Mutanten einen „kontinuierlichen“ Übergang bildet.

(2) Betrachtet man die Energieproduktion sämtlicher Stämme, erhält man folgendes Gesamtbild: Die GEP-Werte bilden sowohl in den Haupt- als auch in den Untergruppen voneinander verschiedene mittlere Niveaus mit einer gewissen stufenweisen Abnahme von den P_Q^+ - zu den P_Q^- -Stämmen. Dennoch ist bei sämtlichen RD-Mutanten eine Tendenz sichtbar, ihre GEP-Werte durch Erhöhung der FEP, also durch intensivierte Gärung zu erhalten. Die Streuung der GEP-Werte bei den p'_Q^+ -Mutanten ist nicht signifikant unterschiedlich von den P_Q^+ -, p_Q^+ - und P_Q^- -Stämmen (Tab. 5). Die statistische Auswertung sämtlicher Meßwerte (Abb. 3) zeigt eine signifikante (0,1 %) Korrelation der OEP-FEP-Werte ($r = -0,82$). Die OEP-GEP-Korrelation ist signifikant (0,1 %) positiv ($r = +0,75$). Die Abnahme der GEP-Werte beträgt im Durchschnitt bei den prototrophen C-Stämmen 31 %, bei den auxotrophen C-Stämmen 42 % und bei den A-Stämmen 20 %, die OEP-Werte dagegen vermindern sich bei allen 3 Hauptgruppen um jeweils 95 % (Tab. 2 bis 4).

Global betrachtet ist die Verminderung der oxydativen Energieproduktion infolge der RD-Mutation um etwa 60 bis 70 % größer als die der GEP. Aus dieser Beobachtung läßt sich folgern, daß die Hefezellen hinsichtlich ihrer Energieerzeugung einen Regelmechanismus besitzen, der einer umweltsunabhängigen (also endogen deter-

minierten) PASTEUR-Regulation entspräche. Dieses kommt darin zum Ausdruck, daß bei unzureichender OEP – infolge genetisch bedingter Veränderungen der Atmungsaktivität – die Gärung (und dadurch die FEP) in dem Maße gesteigert wird, daß die ausgefallene Energiemenge möglichst weitgehend ersetzt werden kann.

Bekanntlich wird die Energieversorgung der Zelle durch exogen beeinflussbare enzymatische Fließgleichgewichts-Systeme aufrechterhalten, wobei der jeweilige Gleichgewichtszustand mittels eines Rückkoppelungsmechanismus erhalten wird (Hess 1966). Das in den vorliegenden Untersuchungsergebnissen erhaltene Gesamtbild über

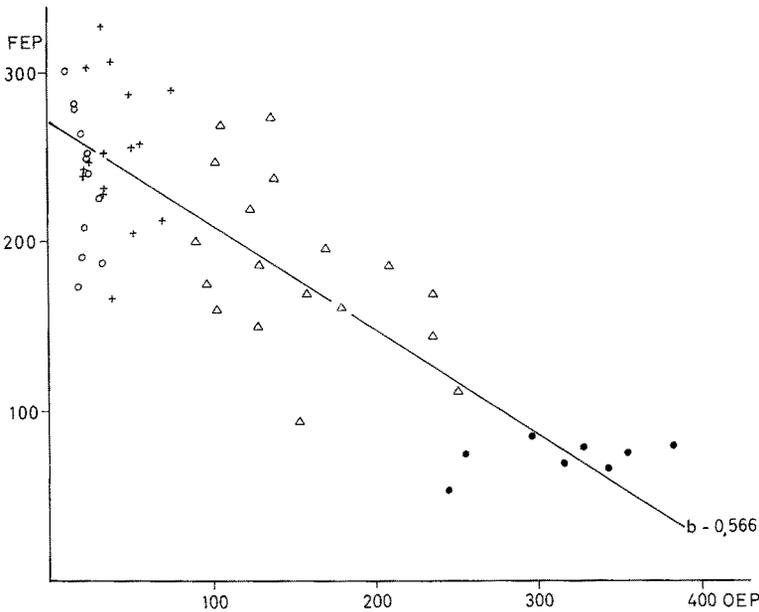


Abb. 3: Regression zwischen den OEP- und FEP-Werte sämtlicher Stämme.
 ● = Pq^+ ; \triangle = $p'q^+$; + = pq^+ ; \circ = Pq^- -Stämme.
 (Näheres im Text)

das Verhalten atmungsdefekter Hefemutanten hinsichtlich ihrer Energieversorgung zeigt, daß dieses Fließgleichgewicht auch nach endogenen, das heißt genetisch bedingten Einwirkungen erhalten und in den meisten Fällen über einen minimalen Sollwert geregelt werden kann. Unter diesem Aspekt wäre die Energieversorgung der Zelle als genetisch determiniertes – und erblich beeinflussbares – Fließgleichgewichtssystem vorstellbar. Darin sind Atmungs- und Gärungsintensität über einen Regelmechanismus zu einer funktionellen Einheit verknüpft. Betrachtet man diesen Regelmechanismus selbst als genetisch determiniert und mutierbar, so würde das Fließgleichgewichtssystem insgesamt als Resultante von drei in Grenzen veränderlichen Größen bestimmt werden. Die bei mutagenen Einflüssen beobachtete große Zahl „letal“er Mutanten könnte somit auf ein Versagen innerhalb des komplexen Fließgleichgewichtssystems zurückgeführt

werden, das die für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen erforderliche Energie produziert beziehungsweise regelt.

(3) Der AQ-Wert gibt das Verhältnis der OEP- zu den GEP-Werten in Prozenten an. Es ist also eine von den nicht atmungsspezifischen Eigenschaften wahrscheinlich unabhängige, stammcharakteristische Größe. Mit Hilfe dieser Größe ließe sich vielleicht zwischen den unterschiedlichen *Saccharomyces cerevisiae*-Typen ein Vergleich ziehen, und somit wären ihre verschiedenen Atmungseigenschaften einer genetischen Analyse zugänglich.

(4) Die AQ-Werte der atmungsfähigen Stämme ($P_{O_2}^+$ und $p'_{O_2}^+$) weisen eine Parallelität zu den entsprechenden mAV-Werten auf (Tab. 2 bis 4). Es ist jedoch auffallend, daß bei einem AQ-Wert unter 25 Spaltungsmutanten nicht mehr in der Lage sind, Acetat zu verwerten, obwohl sie auf Glukosesubstrat noch eine erhebliche Energiemenge durch Atmung freisetzen können. Offenbar sind diese Stämme nicht mehr in der Lage, mittels ihrer Restatmung auf Acetat-Substrat die Kalorienmengen freizusetzen, die zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen notwendig sind. Es ergibt sich die Frage, ob etwa eine Energieschwelle vorliegen könnte. SHERMAN & SLONIMSKI (1964) beschreiben Stämme mit der Bezeichnung $p_{4O_2}^+$, die sich auf ähnliche Weise verhalten, und bemerken, daß in diesen Mutanten alle Atmungsenzyme vorhanden sind: "They have all the cytochromes, with cytochrome a, a_3 and b present in low concentrations." Die Energieschwelle wäre also mit zu geringen (unterschwellig) Enzymkonzentrationen zu deuten.

(5) Die Tatsache, daß auf Acetat-Substrat die Atmungsaktivität der $p'_{O_2}^+$ -Mutanten durch erhöhten PO_2 in beträchtlichem Maße beeinflusst werden kann (Abb. 1), unterstützt die Annahme, daß diese Stämme sich in einer energetisch labilen Lage befinden. Ihr verzögertes Wachstum auf Acetatnährboden kann also auf die von ihnen in diesem Milieu produzierbare geringe Energiemenge zurückgeführt werden. Die Aufstellung einer brauchbaren Energiebilanz auf Acetatsubstrat und damit die Ermittlung der niedrigsten Energiemenge, die für die Erhaltung der Lebensfunktionen der Zellen in der Ruhephase notwendig ist, wird durch die Tatsache verhindert, daß die Acetatverwertung der $p'_{O_2}^+$ -Stämme nur unter Züchtungsbedingungen zu bestimmen ist.

(6) Die größte Schwankungsbreite der GEP-Werte ist bei den zusätzlich Auxotrophie aufweisenden Abkömmlingen des prototrophen Stammes C zu beobachten. Ein Großteil dieser Stämme wies eine 6- bis 7fache Polyauxotrophie auf (BALÁZS 1965). Diese Polyauxotrophie ist bei einem Großteil der TRD-Mutanten allmählich nach einigen Passagen aufgetreten und blieb genetisch konstant. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß gerade diejenigen polyauxotrophen Stämme, die auf Glukose-Nährboden eine auffallend niedrige GEP zeigen, zum Absterben neigen, das heißt, sich über längere Zeit schwer oder gar nicht lebend erhalten lassen. Es wäre durchaus möglich, die von BULDER (1966) beschriebene Letalität einiger TRD-Mutanten damit zu deuten, daß eine zusätzliche Polyauxotrophie die Stämme hindert, diejenige Energieschwelle zu erreichen, die in diesem Mangelzustand für die Aufrechterhaltung des Zellwachstums notwendig ist.

Die stoffwechselphysiologischen Untersuchungen auf Acetat- und Glukose-Sub-

strat beweisen, daß die durch sogenannte Rückmutation entstandenen PRD-Mutanten einen Übergang von den atmungsintakten P_{ρ}^{+} -Stämmen zu den TRD-Mutanten bilden. Da die TRD-Mutanten im allgemeinen durch eine Veränderung in ihrem Cytochromsystem von den P_{ρ}^{+} -Stämmen abweichen (EPHRUSSI 1953, SHERMAN 1963), ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die wohldefinierte und vererbare neue Atmungseigenschaft der PRD-Stämme auf eine genbedingte Aktivitäts- und/oder Konzentrationsänderung der am Atmungsprozeß teilnehmenden terminalen Enzyme zurückzuführen ist (SHERMAN & SLONIMSKI 1964). Die vergleichenden atmungsphysiologischen Untersuchungen bestätigen somit die immer mehr verbreitete Ansicht, daß der durch die ursprüngliche Mutation entstandene Defekt enzymatisch umgangen wird, und dadurch die „neuen“ PRD-Stämme entstehen können.

Die hohe Zahl von aus p_{ρ}^{+} -Stämmen entstandenen p'_{ρ}^{+} -Stämme (bei Strichkulturen über die gesamte Impffläche auftretend) läßt die Vermutung zu, daß diese Änderung nicht auf einem sekundären Mutationsvorgang („Rück“-Mutation) zurückzuführen wäre, sondern eher damit, daß – wenigstens bei einer großen Zahl der ursprünglichen p_{ρ}^{+} -Mutanten – eine Art endogene Regenerationstendenz anzunehmen wäre, die der Zelle zu einer mehr ökonomischen Energieausnutzung verhilft. Dafür spricht auch der Befund, daß die Atmungsaktivität der PRD-Mutanten unterschiedlich ist und daß ihre AQ-Werte einen – wie öfters betont – sozusagen kontinuierlichen Übergang von den P_{ρ}^{+} -Stämmen zu den TRD-Mutanten bilden.

Die kybernetische Betrachtung der enzymatischen Vorgänge innerhalb der genetisch intakten Zelle brachte die Ansicht, daß die Zelle durch ein enzymatisches Rückkoppelungssystem in der Lage ist, mittels einer Art „biochemischen Schalters“ (HESS & BRAND 1965, HESS 1966) exogene schädliche Einflüsse in gewissem Rahmen innerhalb kurzer Zeit zu kompensieren. Unter diesem Aspekt könnte die Regenerationstendenz $p_{\rho}^{+} \rightarrow p'_{\rho}^{+}$ so interpretiert werden, daß eine Art kybernetisches Regelungssystem auch innerhalb des genetischen Informationsgehaltes der Zelle wirksam ist, wobei der OEP als informativer Sollwert für die „genetische Umschaltung“ der Stoffwechselmechanismen maßgebend wäre, und daß die Zelle durch eine Art „langfristiger Regelung“ in der Lage wäre, auch endogene, also genetisch bedingte Einflüsse ohne zusätzliche Mutation („Rückmutation“) zu umgehen. Der Vorgang $p_{\rho}^{+} \rightarrow p'_{\rho}^{+}$ wäre damit so zu deuten, daß durch den genbedingten Ausfall der Atmungsprozesse die „langfristige Regelung“ in der Weise wirksam wird, daß die Zelle durch das in ihrem Informationsgehalt vorhandene Regelungssystem befähigt wird, die ausgefallenen oxydativen Prozesse enzymatisch derart zu regeln, daß durch partielle Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit eine günstigere oxydative Energieversorgung (als Sollwert) erreicht wird.

Es ist nicht zu entscheiden, ob die auf Grund der obigen Ergebnisse angenommenen endogene „langfristige Regelung“ mit einer der genetischen Arbeitshypothesen, wie multiple Allelie, Pleiotropie, oder die Wirkungsweise von Suppressor-, Repressor- und Regulatorgenen in Einklang zu bringen ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Langjährige Beobachtungen zeigten, daß aus total atmungsdefekten (TRD) chromosomalen Mutanten (p_Q^+), die nach Nitritbehandlung haploider *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme isoliert wurden, sehr häufig spontan partiell atmungsdefekte (PRD) chromosomale Mutanten (p'_Q^+) entstehen.
2. Während die vegetativen (P_Q^-) und chromosomalen (p_Q^+) TRD-Mutanten nicht vergärbare C-Quellen wie beispielsweise Acetat unter Züchtungsbedingungen überhaupt nicht verwerten können, zeigen die p'_Q^+ -Stämme eine Acetatverwertung, die allerdings langsam erfolgt und in allen Fällen unter dem Wert der atmungsintakten P_Q^+ -Stämme liegt.
3. Die Q_{O_2} - und Q_{CO_2} -Messungen auf Glukosesubstrat in der Ruhephase ermöglichen die Ermittlung der oxydativen (OEP)- und fermentativen (FEP)- und hieraus der gesamten (GEP)-Energieproduktion. Aus diesen Werten läßt sich ein stammcharakteristischer Atmungsaktivitätsquotient (AQ) berechnen.
4. Die Gruppe der PRD-Stämme bildet einen „kontinuierlichen“ Übergang von den TRD-Mutanten zu den P_Q^+ -Stämmen.
5. Bei sämtlichen RD-Mutanten ist eine Tendenz sichtbar, ihre GEP-Werte durch intensivierete Gärung zu erhalten (Signifikante Korrelation zwischen OEP und FEP). Die Verminderung der OEP infolge der RD-Mutation ist um etwa 60 bis 70 % größer als die der GEP.
6. Erhöhter P_{O_2} steigert bei den p'_Q^+ -Mutanten die Geschwindigkeit der O_2 -Aufnahme. Dies ist bei TRD-Mutanten nicht der Fall.
7. Die auf Grund des häufig spontan auftretenden Vorgangs $p_Q^+ \rightarrow p'_Q^+$ angenommene endogene Regenerationstendenz wird als eine Art endogene „langfristige Regelung“ gedeutet.

ZITIERTE LITERATUR

- AVERS, C. J., RANCOURT, M. W. & LIN, F. H., 1965. Intracellular mitochondrial diversity in various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 527–535.
- BALÁZS, O., 1960. Genetische Wirkung salpetriger Säure auf *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Inaktivierende und mutagene Wirkung. (Unpubliziert)
- 1965. Auxanographisches System zur Ermittlung des Auxotrophiegrades sowie des Nährstoffbedarfes bei polyauxotrophen Mutanten von Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* **50**, 298–320.
- 1966. Vergleichende Stoffwechselphysiologische Untersuchungen total- und partiell-atmungsdefekter (TRD, PRD) haploider *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten. *Zbl. Bakteriol.* (Im Druck.)
- BULDER, C. J. E. A., 1966. Lethality in respiratory deficiency and utilisation of fermentation energy in Petite negative yeasts. *Arch. Mikrobiol.* **53**, 189–194.
- EPHRUSSI, B., 1953. Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms. Oxford Univ. pr. London, 150 pp.
- HESS, B., 1966. Kontrollmechanismen der Glykolyse. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **14** (im Druck).
- & BRAND, K., 1965. Enzyme and metabolite profiles. In: Control of energy metabolism. Ed. by B. Chance, R. W. Estabrook & J. R. Williamson. Acad. pr., New York, 111–122.

- KAUDEWITZ, F., 1959. Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von *Escherichia coli*. *Z. Naturf.* **14b**, 528–537.
- KRAEPELIN, G., 1964. Normalisierung des Atmungsdefektes bei Hefe. Rückführung stabilisierter RD-Mutanten in voll atmungsfähige Normalzellen. *Arch. Mikrobiol.* **48**, 299–305.
- NAGAI, S., YANAGISHIMA, N. & NAGAI, H., 1961. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. *Bact. Rev.* **25**, 404–426.
- OGUR, M., LINDEGREN, G. & LINDEGREN, C. C., 1954. A simple screening test for genetic studies of respiration deficiency in yeast. *J. Bact.* **68**, 391–392.
- PITTMAN, D., WEBB, J. M., ROSHANMANESH, A. & COKER, L. E., 1960. Evidence for the genetic control of photoreactivation. *Genetics, Princeton* **45**, 1023–1037.
- RAUT, C., 1953. A cytochrome deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Expl Cell Res.* **4**, 295–305.
- SHERMAN, F., 1963. Respiration-deficient mutants of yeast. 1. Genetics. *Genetics, Princeton* **48**, 375–385.
- & SLONIMSKI, P. P., 1964. Respiration-deficient mutants of yeast. 2. Biochemistry. *Biochim. biophys. Acta* **90**, 1–15.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. & STAUFFER, J. F., 1964. Manometric techniques. 4th ed. Burgess, Minneapolis, Minn., 305 pp.

Diskussion im Anschluß an den Vortrag BALÁZS

Hess: Können Sie uns sagen, unter welchen Sauerstoffdrucken Sie gearbeitet haben?

BALÁZS: Es wurde mit Luft und mit reinem Sauerstoff gearbeitet, also bei etwa 150 beziehungsweise 760 Torr P_{O_2} .

Hess: Ich stelle die Frage, weil ich wissen will, ob die Cytochrommangelmутanten durch Sauerstoff oder durch andere Substrate wie Acetate induziert werden können. Es könnte sein, daß die Cytochromsynthese lediglich deprimiert ist.

BALÁZS: Die Versuche auf Acetat-Substrat mit erhöhtem p_{O_2} könnten darauf deuten, daß eine O_2 -Induktion der Cytochromsysteme bei atmungsintakten und partiell atmungsdefekten Stämmen durchaus im Bereich der Möglichkeit liegt. Daß Acetat eine induktive Wirkung ausübt, wäre unter den verwendeten Versuchsbedingungen unwahrscheinlich; man könnte eine solche Wirkung höchstens dem erhöhten P_{O_2} zuschreiben. Wenn überhaupt eine erhöhte Acetatverwertung als Folge einer Induktion betrachtet werden kann, ist es bemerkenswert, daß die Erhöhung der Acetatverwertung und der O_2 -Aufnahme bei den PRD-Mutanten nur innerhalb offenbar genetisch bestimmter Grenzen stattfinden kann. Mit anderen Worten: die Möglichkeit einer Erhöhung der Atmung durch eventuelle Sauerstoff-Induktion ist je nach Stamm limitiert, woraus man schließen könnte, daß die Atmungsintensität der Stämme mit verschiedenen AQ-Werten auf jeweils unterschiedlichen Niveaus genetisch festgelegt ist. Total atmungsdefekte Mutanten (weder $p_{O_2}^+$ noch $P_{O_2}^-$) weisen auch nach erhöhtem P_{O_2} keine meßbare Acetatverwertung auf; man kann wohl annehmen, daß bei diesen Mutanten kein induzierbares System vorliegt. Die Änderung $p_{O_2}^+ \rightarrow p'_{O_2}^+$ kann wohl nicht auf Induktion beruhen, da dieser Vorgang ja spontan, in Luft und auf Glukose-Substrat beobachtet worden ist. Es wäre durchaus interessant, zu untersuchen, ob diese von uns auf eine „genetische Schalterwirkung“ zurückgeführte Änderung zum Beispiel durch erhöhten P_{O_2} oder durch Acetat zu beeinflussen ist.