

sure unidirectional transport of water in this system<sup>17</sup>. Approaches for experimental verification of this hypothesis are discussed<sup>18</sup>.

<sup>17</sup> A. G. OGSTON, personal communication.

<sup>18</sup> Addendum. It has been brought to the author's attention that J. KOEFOED and P. J. KNUDSEN [Proc. 1st. Int. Congr. Nephrol. Geneva/Evian 1960; pp 571-573 (1961), S. Karger, Basel] have proposed a mechanism according to which enzymatic degradation of hyaluronic acid may contribute to the creation of a hyperosmotic environment in the renal medulla.

<sup>19</sup> Participant of the USPHS Career Award Program.

**Résumé.** Par l'adsorption de plus d'eau que de corps dissous, les acides mucopolysaccharides (MPS-s) de la medulla interne du rein peuvent participer à l'élaboration d'urine concentrée. Ce nouveau mécanisme hypothétique laisse supposer que le MPS est le produit d'une synthèse cellulaire et qu'il prend l'eau d'adsorption au moment de la sécrétion. Ensuite, le MPS quitte le rein par les voies veineuses et lymphatiques et enfin se détruit dans un autre organe.

G. G. PINTER<sup>19</sup>

Department of Physiology, University of Maryland  
School of Medicine, Baltimore (Maryland, USA),  
August 29, 1966.

## Zur Frage der Indolyl-3-acetaldehyd-Mutase in Mikroorganismen

Beim Tryptophanabbau durch Mikroorganismen und höhere Pflanzen wurde unter anderem das Auftreten von Indolyl-3-acetaldehyd (IAAld), Indolyl-3-essigsäure (IES) und  $\beta$ -(Indolyl-3)-äthanol ( $\beta$ -IA, Tryptophol) beobachtet<sup>1-12</sup>.

Der biogenetische Zusammenhang dieser 3 Substanzen wird oft in einer Dismutierung des IAAld zu IES und  $\beta$ -IA gesehen. TEUSCHER<sup>1</sup> nimmt eine spontane Disproportionierung an, während KAPER und VELDSTRA<sup>2</sup> bei *Agrobacterium tumefaciens*, SCHWINN<sup>3</sup> bei *Phytophthora cactorum* und LIBBERT<sup>4</sup> bei *Pisum sativum* und andere (siehe auch GORDON<sup>5</sup>) eine enzymatische Dismutierung vermuten.

Die Existenz einer Indolyl-3-acetaldehyd-Mutase wurde allerdings von KLUNGSÖYR<sup>12</sup> angezweifelt. Sie bezog sich dabei besonders auf den Nachweis einer IAAld-Oxidase in *Avena-Coleoptilen*<sup>13</sup> und auf einige eigene Experimente beim Tryptophanstoffwechsel. Nach ihren und unseren Versuchen ist keinesfalls eine spontane Dismutierung zu erwarten. IAAld wird in wässrigen Lösungen lediglich zu einem verschwindend geringen Prozentsatz durch Luft-sauerstoff<sup>14</sup> zu IES oxydiert. Der grösste Teil des eingesetzten IAAld geht durch Polymerisation verloren.  $\beta$ -IA ist nicht nachweisbar<sup>10,14</sup>. Demnach käme also höchstens eine enzymatische Disproportionierung in Frage. Die Existenz einer Acetaldehyd-Mutase zum Beispiel in Milch, die zunächst von DIXON und LUTWAK-MANN<sup>15</sup> angenommen wurde, ist allerdings durch Arbeiten von RACKER<sup>16</sup> zweifelhaft geworden. Es ist wahrscheinlicher, dass gleichzeitig eine Aldehydreductase und eine Aldehyddehydrogenase in sehr unterschiedlicher Quantität und Aktivität vorliegen.

Wir untersuchten diese Frage am Beispiel einiger Mikroorganismen, deren Tryptophanstoffwechsel zum Teil ziemlich genau bekannt ist<sup>2,10</sup> (Tabelle).

Bei Endomycopsis und Torulopsis findet sich nach Fütterung von IAAld nur  $\beta$ -IA und keine IES. Die Beteiligung einer Mutase am IAAld-Abbau kann damit für diese Stämme ausgeschlossen werden. Bei den beiden *Hansenula*-Stämmen und bei *Agrobacterium* lassen sich beide Indolderivate nachweisen. Da jedoch 5-20mal mehr  $\beta$ -IA als IES auftritt, müsste neben einer eventuell vorhand-

enen Mutase eine sehr aktive Aldehydreductase auftreten.

In zellfreien Extrakten mit IAAld und NADH<sub>2</sub> lässt sich durch die Abnahme der Extinktion bei 340 nm ein Verbrauch von NADH<sub>2</sub> durch eine Aldehydreductase<sup>18</sup> nachweisen (Figur 1).

In Ansätzen mit IAAld und NAD steigt dagegen die Extinktion an (Figur 1, Kurve I). Der bei der Oxydation des IAAld freiwerdende Wasserstoff wird offensichtlich auf NAD übertragen. Demnach liegen nebeneinander eine Aldehydreductase und eine Aldehyddehydrogenase vor. Werden die Enzymlösungen hochtourig zentrifugiert (> 250 000 g), so sedimentiert die Aldehydreductase rascher als die Dehydrogenase. Die nachweisbare Reductaseaktivität ist gegenüber weniger intensiv zentrifugierten (70 000 g) und anschliessend dialysierten Ansätzen deutlich vermindert.

Setzt man nicht dialysierten Extrakten (70 000 g) NAD zu, so steigt die Extinktion unter Oxydation des nicht ab-

<sup>1</sup> E. TEUSCHER, Pharmazie 20, 781 (1965).

<sup>2</sup> J. M. KAPER und H. VELDSTRA, Biochim. biophys. Acta 30, 401 (1958).

<sup>3</sup> F. J. SCHWINN, Phytopath. Z. 54, 179 (1965).

<sup>4</sup> E. LIBBERT und K. BRUNN, Naturwissenschaften 48, 741 (1961).

<sup>5</sup> S. A. GORDON, Handbuch der Pflanzenphysiologie (Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1961), Bd. 14, p. 635.

<sup>6</sup> K. V. THIMANN und H. E. DOLK, Biol. Zbl. 53, 49 (1933).

<sup>7</sup> F. T. WOLF, Proc. natn Acad. Sci. U.S.A. 38, 106 (1952).

<sup>8</sup> F. T. WOLF, Phytopath. Z. 26, 219 (1956).

<sup>9</sup> G. B. BAILEY und A. C. GENTILE, Plant Physiol. 37, 439 (1962).

<sup>10</sup> K. W. GLOMBITZA und T. HARTMANN, Planta 69, 135 (1966).

<sup>11</sup> F. WIGHTMAN, Colloques int. Cent. natn Rech. scient. 723, 191 (1963).

<sup>12</sup> S. KLUNGSÖYR, Colloques int. Cent. natn Rech. scient. 723, 218 (1963).

<sup>13</sup> Y. SHIGEMURA und S. A. GORDON, Plant Physiol. 35, Suppl. 28 (1960).

<sup>14</sup> P. LARSEN und R. RAJAGOPAL, Colloques int. Cent. natn Rech. scient. 723, 230 (1963).

<sup>15</sup> M. DIXON und C. LUTWAK-MANN, Biochem. J. 37, 1347 (1937).

<sup>16</sup> E. RACKER, J. biol. Chem. 177, 883 (1949).

<sup>17</sup> K. W. GLOMBITZA, J. Chromat. 25, 87 (1966).

<sup>18</sup> Wir wählten den Ausdruck «Aldehydreductase» anstelle des üblichen «Aldehyd-oxidoreductase», da wir bisher die Reversibilität der Reaktion nicht nachweisen konnten.

getrennten zelleigenen Substrates durch Bildung von  $\text{NADH}_2$  an. Gibt man im Zeitpunkt 0 (Figur 2, Kurve I) IAAlD zu, so sinkt die Absorption bei 340 nm zunächst rasch ab und steigt nach ca. 7 min unter erneuter Bildung von  $\text{NADH}_2$  allmählich wieder an. Ein ähnliches Kurvenbild erhält man, wenn man direkt  $\text{NADH}_2$  im Überschuss

zusetzt (Figur 2, Kurve II). Der Anstieg nach ca. 9 min ist in diesem Fall jedoch erheblich schwächer. Die Oxydasewirkung ist nur bei einem erheblichen NAD-Überschuss deutlich nachweisbar.

Die Aktivität der Aldehyddehydrogenase ist demnach bei *Hansenula* erheblich geringer als die der Aldehydreductase. Eine durchaus mögliche Beteiligung von  $\text{FAD}^t$  an der Oxydationsreaktion konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Reduktion scheint bei den Pilzen unter normalen Umständen nicht reversibel zu sein, da in Gegenwart von  $\beta$ -IA keine Änderungen im NAD- und  $\text{NADH}_2$ -Gehalt feststellbar sind und da in lebenden Kulturen bei Fütterung von  $\beta$ -IA kein IAAlD nachweisbar ist.

#### Abbauprodukte nach der Verfüterung von IAAlD

Mikroorganismus	nachgewiesene Substanz			
	$\beta$ -IA	IES	IA	nicht umgesetzt IAAlD
<i>Endomycopsis vernalis</i>	+++	—	—	—
<i>Hansenula anomala</i> Stamm Steiner	+++	+	—	—
<i>Hansenula anomala</i> Stamm Burzik	+++	+	—	—
<i>Torulopsis utilis</i> B 20	+++	—	—	—
<i>Torulopsis utilis</i> B 77	++++	—	—	—
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	++	(+)	+	+

Die Anzahl der + gibt die Mengenverhältnisse der gefundenen Substanzen wieder (IA = Indolaldehyd-(3)). *Endomycopsis*, *Hansenula* und *Torulopsis* B 20 wurden wie üblich in Oberflächenkulturen vorgezogen<sup>10</sup> und auf Schalen mit 0,1% IAAlD pH 4,6 umgepflanzt. *Torulopsis* B 77 und *Agrobacterium* (pH 6,5) wurden in dem gleichen Nährboden<sup>10</sup> in Schüttelkulturen vorgezogen und nach 6 Tagen abzentrifugiert, ausgewaschen und auf Nährlösung mit 0,1% IAAlD umgepflanzt. Nach 3–16 h wurden Mycel und Nährlösung aufgearbeitet und dünnschichtchromatographisch untersucht<sup>10,17</sup>.

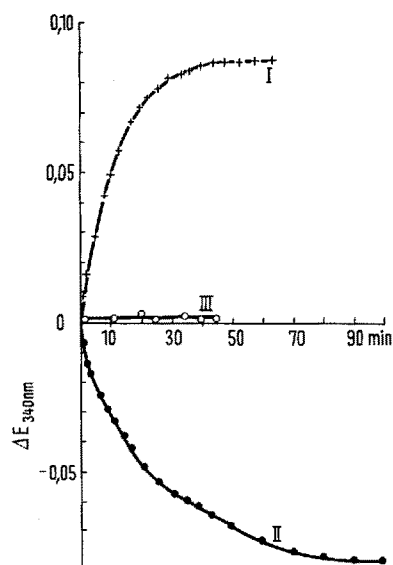


Fig. 1. Extinktionsverlauf bei 340 nm einer Mischung aus: (Kurve I) 2 ml eines hochtourig abzentrifugierten zellfreien Extraktes aus *Hansenula anomala* mit  $5 \cdot 10^{-6} M$  NAD,  $2,5 \cdot 10^{-6} M$  IAAlD in Tris-Puffer pH 8,8. (Kurve II) 2 ml zellfreier Extrakt mit  $1 \cdot 10^{-6} M$   $\text{NADH}_2$  und  $2,5 \cdot 10^{-6} M$  IAAlD. (Kurve III) 2 ml zellfreier Extrakt mit  $5 \cdot 10^{-6} M$  NAD und  $2,5 \cdot 10^{-6} M$   $\beta$ -IA.

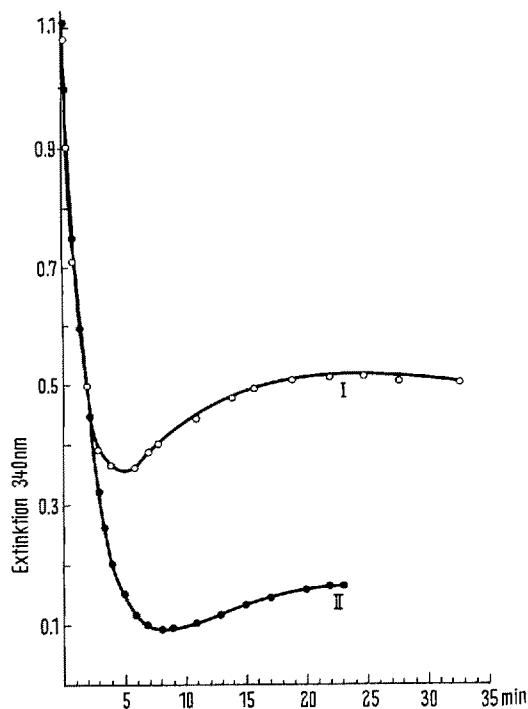


Fig. 2. Extinktionsverlauf bei 340 nm einer Mischung aus: (Kurve I) 0,5 ml eines niedrigtourig abzentrifugierten zellfreien Extraktes aus *Hansenula anomala* in 1,5 ml Tris-Puffer pH 8,8 und  $5 \cdot 10^{-6} M$  NAD, dem nach Stabilisierung der zunächst ansteigenden Extinktion im Zeitpunkt 0  $2,5 \cdot 10^{-6} M$  IAAlD zugesetzt wurden. (Kurve II) 0,5 ml zellfreier Extrakt in 1,5 ml Tris-Puffer pH 8,8 und  $1 \cdot 10^{-6} M$   $\text{NADH}_2$  und  $2,5 \cdot 10^{-6} M$  IAAlD.

**Summary.** No evidence of the existence of a single indoleacetaldehyde mutase in microorganisms is available. Different results from studies on living cultures and cell-free extracts of *Endomycopsis vernalis*, *Hansenula anomala*, *Torulopsis utilis* and *Agrobacterium tumefaciens* indicate the participation of 2 different enzymes: an aldehyde dehydrogenase and an aldehyde reductase.

K.-W. GLOMBITZ

Pharmakognostisches Institut der Universität, Bonn (Deutschland), 6. September 1966.