

decreased at a constant rate over the period of 30–60 min. The concentration of NA remaining in the tissue was of the same order for newly synthesized NA and NA uptake.

1. 5HT (10^{-3} M) in the incubation medium had no effect on the rate of NA efflux in either system.

2. The precursor of 5HT, 5-hydroxytryptophan (5HTP, 10^{-3} M), had no effect on the rate of efflux of NA previously taken up from the medium (Figure 1). In contrast, 5HTP lowered the levels of NA previously synthesized from DOPA to ca. 40% control values. The difference from control values was significant at the 0.01 level (rank summation), except for the last values (75 min) (Figure 2).

3. The amino-acids histidine and L-tryptophan caused the same decrease of NA in tissue, whereas the corresponding amines had no effect. As with 5HTP, the effect

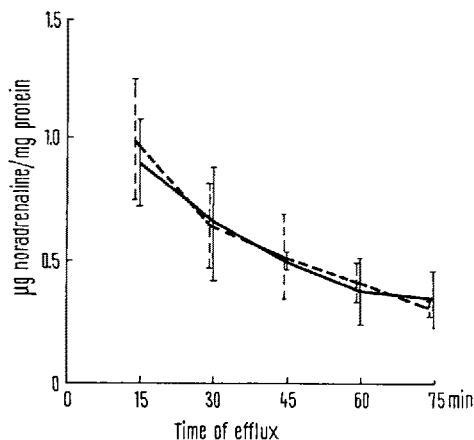


Fig. 1. Noradrenaline uptake: effect of 5HTP on efflux.

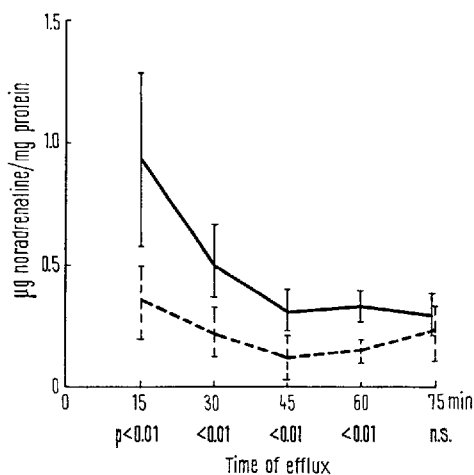


Fig. 2. Noradrenaline synthesis: effect of 5HTP on efflux.

was only found with NA synthesised from DOPA, not with uptake NA.

4. The decarboxylase inhibitor Ro 4-4602 in the incubation medium also resulted in a significant lowering of NA levels in the tissue, but only after 30 min. The effect of the dopamin-hydroxylase inhibitor disulfiram was apparent in a lowering of NA levels after 45 min.

Discussion. The mechanism of depletion of brain tissue NA levels by 5HTP appears to be by inhibition of further NA synthesis from DOPA, rather than by a 5HTP (or 5HT) mediated efflux. This effect has been reported in vivo¹³, where the lowered NA levels after doses of 5HTP causing overt stimulation in the rat were attributed to inhibited synthesis and not to stimulated release of NA¹⁴.

5HTP (as histidine and L-tryptophan) utilizes the same unspecific enzyme as DOPA in its synthetic pathway: 1-aromatic-amino-acid decarboxylase¹⁵. These substrates can act as competitive inhibitors.

Preincubation of brain slices simultaneously with DOPA and 5HTP results in mutual inhibition of synthesis of the amines (75% of control value, $p < 0.01$). The rate of efflux of both amines is not significantly different from control values.

A common enzyme for the decarboxylation of the different amino-acid precursors of the biogenic amines may indicate that the first step of NA biosynthesis (hydroxylation) may not be the only limiting factor of amine formation. Changes of cerebral pyridoxal phosphate levels may also be important for feedback mechanisms involving pyridoxal phosphate dependent enzymes^{9,16}. An overload of any one aromatic amino acid could have implications for the regulated balance of amines in the brain¹⁷.

Zusammenfassung. 5-Hydroxytryptophan erniedrigt die Konzentration von Noradrenalin in Hirnschnitten, sofern diese das Amin zuvor aus zugesetztem L-DOPA selber synthetisierten. Dieser Effekt beruht vermutlich darauf, dass 5-Hydroxytryptophan die Decarboxylierung des L-DOPA, das im Hirngewebe gespeichert wird, kompetitiv hemmt. Die Relation der Noradrenalin- und Serotoninkonzentration im Hirngewebe kann somit auch durch ein verändertes Angebot an Aminosäuren gestört werden.

H. FEER and A. WIRZ-JUSTICE

Biochemisches Laboratorium der Psychiatrischen
Universitätsklinik Basel, CH-4056 Basel (Switzerland),
8 February 1971.

¹³ G. A. JOHNSON, E. G. KIM and S. J. BOUKMA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 728, 1948 (1968).

¹⁴ B. B. BRODIE, M. S. COMER, E. COSTA and A. DLABAC, *J. Pharmac. exp. Ther.* 152, 340 (1966).

¹⁵ P. M. CEASAR, B. F. ANAGNOSTE and M. GOLDSTEIN, *Abstr. Papers, Am. chem. Soc.* 160, 102 (1970).

¹⁶ J. A. BUZARD and P. D. NYTCH, *J. biol. Chem.* 227, 225 (1957).

¹⁷ S. R. TONGE and B. E. LEONARD, *Life Sci.* 9, 1327 (1970).

Leichtflüchtige Stoffe in *Agaricus bisporus*

Es ist bekannt, dass unter den äusseren Faktoren, welche Wachstum, Fruktifikation, Morphogenese und Sporenkeimung von Pilzen beeinflussen, neben den Feuchtigkeits-, Licht- und Temperaturverhältnissen der Anwesenheit von leichtflüchtigen Stoffen – grösstenteils unbekannter Identität – oft eine entscheidende Rolle zukommt. Es

dürfte sich dabei in den meisten Fällen um niedere Fettsäuren, Fettsäureester, niedere Alkohole, Aldehyde und CO_2 handeln. So stimulieren Vertreter der erstgenannten Stoffgruppe (C_1 – C_6) die Sporenkeimung von *Phycomyces*¹, Ameisensäure aktiviert die Pseudophorenbildung bei *Rhizopus sexualis*², und Isovaleriansäure fördert die Keimung

von Champignonsporen³. In diesem Organismus kommt auch dem Kohlendioxid eine morphogene Wirkung zu: es beeinflusst das Myzelwachstum und fungiert als fruktifikationskontrollierendes Agens⁴. Schliesslich induzieren kurzkettige aliphatische Alkohole (*n*-Butanol, Isoamylalkohol und 2-Pentanol) in niederen Konzentrationen die Bildung von β -Fructofuranosidase und Glucose-Dehydrogenase in Ruhekoniidien von *Aspergillus oryzae*, während grössere Mengen hemmend wirken⁵.

Das vom Substratmycelium von *A. bisporus* produzierte Gasgemisch kann die Morphogenese der Fruchtkörper steuern⁶. Ferner wird die Keimungsrate von Champignonsporen durch die Gesamtheit der von diesem Organismus synthetisierten leichtflüchtigen Stoffe erhöht³. Deren Zusammensetzung hat erstmals LOCKARD⁷ untersucht; die Fraktion enthält Äthanol, Acetaldehyd, Aceton, Äthylacetat und Äthylen. Das Ziel der hier beschriebenen Un-

tersuchungen bestand in einer genaueren gaschromatographischen Analyse der chemischen Identität der von Sporen, Mycelium und Fruchtkörpern produzierten wasser-dampf-flüchtigen Stoffe, um die durch diese bewirkten physiologischen Effekte einer bestimmten Substanz zuzuordnen und so eher einer biochemischen Erklärung zugänglich machen zu können. Zudem erweisen sich Anga-

¹ W. J. ROBBINS, V. W. KAVANAGH und F. KAVANAGH, Bot. Gaz. 104, 224 (1942).

² P. M. HEPDEN und L. E. HAWKER, J. gen. Microbiol. 24, 155 (1961).

³ D. M. LÖSEL, Ann. Bot. N.S. 31, 417 (1967).

⁴ H. J. TSCHIERPE, Gartenbauwissenschaft 24, 18 (1959).

⁵ H. SINOHARA, Biochim. biophys. Acta 224, 541 (1970).

⁶ B. B. STOLLER, Science 116, 320 (1952).

⁷ J. D. LOCKARD, Diss. Abstr. 23, 2298 (1963).

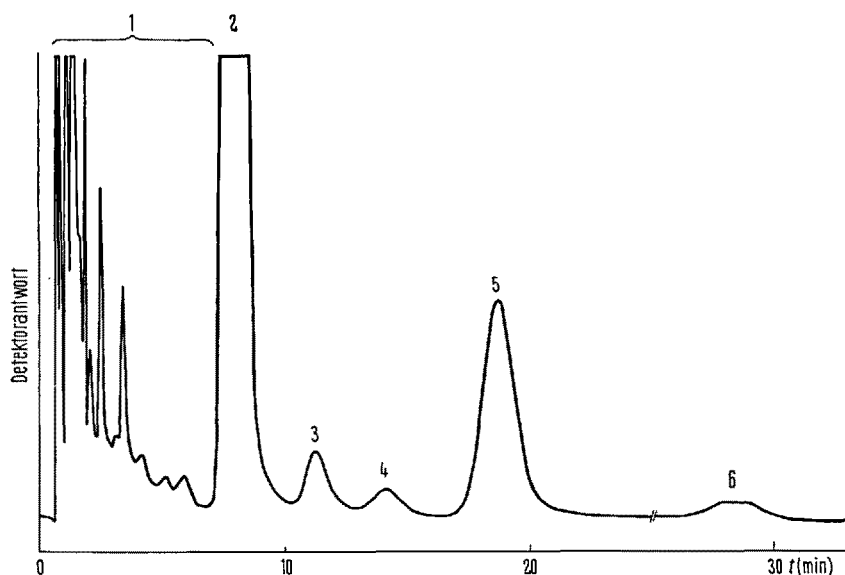


Fig. 2. Gaschromatographische Trennung der niederen Fettsäuren aus dem Fruchtkörper von *A. bisporus*.

1, niedere Alkohole und andere leichtflüchtige Stoffwechselprodukte (Figur 1); 2, Essigsäure; 3, nicht bestimmt; 4, Isobuttersäure; 5, *n*-Buttersäure; 6, Isovaleriansäure.

Extrakterstellung und Chromatographiebedingungen sind an anderer Stelle beschrieben¹⁰.

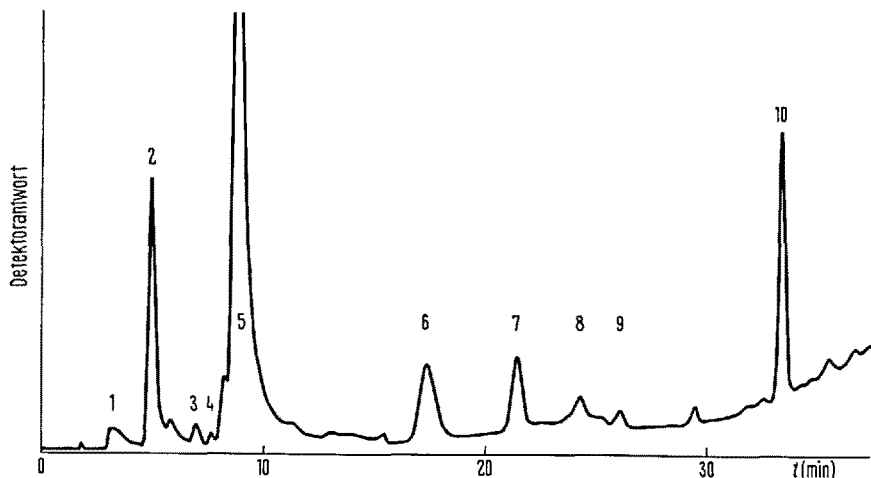


Fig. 1. Gaschromatische Analyse von Alkoholen und anderen leichtflüchtigen Metaboliten der Sporen des Kulturchampignons.

1, Acetaldehyd; 2, Aceton; 3, Äthylacetat; 4, Äthylmethylketon; 5, Äthanol; 6, Isobutanol; 7, *n*-Butanol; 8, Isoamylalkohol; 9, *n*-Amylalkohol; 10, Essigsäure.

Für die Herstellung des Extraktes und die Chromatographiebedingungen vergleiche¹⁰.

ben über die Identität solcher Produkte insofern als von heuristischem Wert, als deren Applikation bei andern Pilzen sowohl gleiche als auch bisher unbekannte physiologische Effekte hervorrufen kann. Schliesslich erfordern die chemische Charakterisierung der verschiedenen Entwicklungsstadien ein und desselben Pilzes sowie eine chemotaxonomische Unterscheidung von Mycelien verschiedener Stämme und Arten ebenfalls Kenntnisse über die qualitative Zusammensetzung der betreffenden Stofffraktion, und zwar selbst dann, wenn solche gaschromatographischen Studien vorwiegend durch «fingerprinting» erfolgen sollen.

Wie Figur 1 zeigt, enthalten Champignonsporen neben als Myzelprodukte von *A. bisporus* bereits beschriebenen Stoffen (Äthanol, Aceton, Acetaldehyd, Äthylacetat) auch Essigsäure, Isobutanol, Butanol, Isoamyl- und Amylalkohol sowie Äthylmethylketon. Analyse gleicher Extrakte bei höherer Temperatur analog der Figur 2 ergab ferner das Vorhandensein von Isobutter-, Butter- und Isovaleriansäure. Die Identität einzelner der durch Co-Chromatographie bestimmten Substanzen wurde nach Abfängen des betreffenden Stoffes durch IR-Spektroskopie (Perkin-Elmer 157, Mikrozelle) bestätigt. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Existenz von lediglich sehr geringen Mengen niederer Fettsäuren in den ja auch in geruchlicher Hinsicht deutlich von Mycelium und Fruchtkörperplectenchym verschiedenen Sporen. Alle genannten Stoffe werden auch vom Mycelium gebildet, wobei jedoch der im Verhältnis zu Material aus den beiden andern untersuchten Entwicklungsstadien bedeutend höhere Gehalt an Isobuttersäure und Isobutanol auffällt. Die Stofffraktion nach saurer Wasserdampfdestillation von Fruchtkörperextrakten zeigt qualitativ ebenfalls dieselbe Zusammensetzung.

Nach diesen vorläufigen Untersuchungen erweist sich der Kulturchampignon als versatiler Gärungsorganismus, stellen doch die meisten der hier nachgewiesenen Substanzen auch Komponenten des bei der Bier- und Weingärung gebildeten Fuselöls dar⁸. Äthanol dürfte, da ja auch Acetaldehyd vorkommt, in gleicher Weise wie bei Bäckerhefe gebildet werden. Im speziellen ist darauf hinzuweisen, dass eine Aceton-Butanol-Gärung in *A. bisporus* im Gegensatz

zu einer anderswo geäußerten Meinung⁹ als durchaus möglich erscheint. Durch den Nachweis von Aceton auch im Fruchtkörperplectenchym ist zudem ein bisher als charakteristisch betrachteter Unterschied zwischen diesem und vegetativem Mycelium⁹ hinfällig geworden. Über die Bildung von Isovaleriansäure und Isoamylalkohol in sämtlichen Entwicklungsstadien des Kulturchampignons ist schon früher berichtet worden; die Identifikation dieser Produkte erlaubte es, die keimungsstimulierende Wirkung der Gesamtheit der leichtflüchtigen Metabolite von *A. bisporus* bei Sporen der eigenen Art stofflich zu lokalisieren und bildete die Grundlage zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der beiden «Triggers»¹⁰. Schliesslich stellen einige der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen – ebenso wie in Früchten¹¹ – Aromakomponenten des Kulturchampignons dar. Tatsächlich entspricht der Geruch der sauren Wasserdampfdestillate sowohl von Sporokarpen als auch von Myzelkulturen demjenigen frischer Pilze¹².

Summary. The composition of the volatile fractions (isolated by acidic steam distillation) of the spores, substrate mycelium and fruiting body of the common mushroom is investigated. The physiological and/or biochemical functions of some of the identified substances are discussed.

E. J. STÄUBLE und DORA RAST

Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich, Künstlergasse 16, CH-8006 Zürich (Schweiz), 1. März 1971.

⁸ R. STEVENS, J. Inst. Brew. 66, 453 (1960).

⁹ H. J. TSCHIERPE, Arch. Mikrobiol. 52, 231 (1965).

¹⁰ D. RAST und E. J. STÄUBLE, New Phytol. 69, 557 (1970).

¹¹ H. E. NURSTEN, in *The Biochemistry of Fruits and their Products* (Ed. A. C. HULME; Academic Press, New York 1970), vol. 1, p. 239.

¹² Die Autoren danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für finanzielle Beiträge und der Firma E. Hauser-Champignonkulturen AG, Gossau (ZH), für Pilzlieferungen.

The Effect of NADH and NAD⁺ on the Proteolysis of Lactate Dehydrogenase Isozymes by Trypsin

It has been demonstrated¹ that the susceptibility of LDH isozymes to proteolysis varies. A bacterial peptidase, subtilisin has been found to digest LDH 5 (M₄) only, while the activity of LDH 1 (H₄) is left unaltered². Conformational changes induced by coenzyme, substrates and ions have also been reported to cause modified susceptibility of additional enzymes to proteolysis³⁻¹⁰. The present study was undertaken to investigate the effect of NADH and NAD⁺ on the proteolysis of LDH 1 and LDH 5 by trypsin. NADH (Kyowa Makko Kogyo, Japan), NAD⁺ (Reanal, Hungary), trypsin (Carl Roth, Western Germany) 3 times crystallized were used. LDH 1 (H₄) crystallized from swine heart containing 98% H₄ (Figure 1) was purchased from Serva. A LDH preparation crystallized from swine skeletal muscle (Reanal) abundant in LDH 5 was dialyzed against Tris-HCl buffer and purified further by DEAE-cellulose (Macherey Nagel 2100) chromatography¹¹ to obtain LDH 5 (M₄), the purity of which was checked by agar gel electrophoresis (Figure 1). Protein content was measured at 280 nm. All materials were dis-

solved in 0.05 M Tris-HCl buffer containing 6.10⁻⁴ M CaCl₂ adjusted to pH 7.6. Proteolysis was started by adding trypsin (50 µg) to the samples. 1.0 ml was the final volume of each sample. Temperature was kept con-

¹ J. CLAUSEN and B. ØVLISEN, Biochem. J. 97, 513 (1965).

² E. S. VESSEL and K. L. YIELDING, Ann. N. Y. Acad. Sci. 151, 678 (1968).

³ G. SZABOLCSI, Acta physiol. hung. 13, 213 (1958).

⁴ P. ELŐDI and G. SZABOLCSI, Nature, Lond. 184, 56 (1959).

⁵ R. T. SCHIMKE, E. W. SWEENEY and C. M. BERLIN, J. biol. Chem. 240, 4609 (1965).

⁶ P. S. FITT and E. A. FITT, Biochem. J. 105, 25 (1967).

⁷ D. K. MCCLINTOCK and G. MARKUS, J. biol. Chem. 243, 2855 (1968).

⁸ F. CHATAGNER, Y. GICQUEL, C. PORTEMER and M. TIXIER, Experientia 26, 602 (1970).

⁹ L. MUSZBEK and J. SÓMEGI, Experientia 26, 25 (1970).

¹⁰ J. SOMOGYI, Biochim. biophys. Acta 151, 421 (1967).

¹¹ J. SÜDI, Biochim. biophys. Acta 212, 213 (1970).