

Die Überführung von *myo*-Inosit in chinoide Substanzen in *Pseudomonas beijeirinckii*, 1. Mitt.:

Über eine *myo*-Inosit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas beijeirinckii*

Von

P. Dworsky und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 28. April 1969)

Ein konstitutives Enzym mit der Spezifität einer *myo*-Inosit-Dehydrogenase (*myo*-Inosit: NAD-Oxydoreductase, ES 1.1.1.18) wurde aus *Pseudomonas beijeirinckii* isoliert, etwa 550fach angereichert und in seinen Eigenschaften charakterisiert.

Transformation of myo-Inositol to Quinoid Substances in Pseudomonas beijeirinckii, I: On a myo-Inositol Dehydrogenase of Pseudomonas beijeirinckii.

A constitutive enzyme showing the specificity of a *myo*-inositol dehydrogenase (*myo*-inositol: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.18) has been isolated from *Pseudomonas beijeirinckii*. It was concentrated to 550fold activity; its properties were determined.

Vor längerer Zeit entdeckte Hof¹ ein halophiles Bakterium, das imstande war, einen dunklen Farbstoff zu erzeugen; er nannte es *Pseudomonas beijeirinckii*. Kluyver und Mitarb.² untersuchten die Bedingungen für die Bildung des Farbstoffes und dessen chemische Natur. Sie fanden, daß derartige Substanzen nur dann entstehen, wenn *Ps. beijeirincki* auf einem Nährboden wächst, der *myo*-Inosit enthält; sie machten es weiter sehr wahrscheinlich, daß der Farbstoff ein Salz des Tetrahydroxybenzo-

¹ T. Hof, Rec. Trav. bot. néerland. **32**, 92 (1935).

² A. J. Kluyver, T. Hof und A. G. J. Boezardt, Enzymologia [den Haag] **7**, 257 (1939).

chinons ist, wobei sie die Möglichkeit offen ließen, daß auch Rhodizonat zugegen ist.

Im Zuge unserer Untersuchungen über den biologischen Abbau von *myo*-Inosit haben wir nun begonnen, die Farbstoffbildung in *Ps. beijerinckii* zu untersuchen, weil es uns auf Grund der Befunde von *Kluyver* und *Mitarb.*² als möglich erschien, daß dieser Organismus *myo*-Inosit auf einem bisher noch unbekanntem Wege abbaut.

Zur Zeit sind grundsätzlich zwei Abbauwege für *myo*-Inosit bekannt. In Tieren³, höheren Pflanzen⁴ und Hefe⁵ kann der Cyclit durch spezifische Enzyme einer direkten oxidativen Spaltung zwischen den C-Atomen 1 und 6 unterliegen, wobei D-Glucuronsäure entsteht; diese wird vorwiegend über L-Gulonsäure, L-Xylulose, D-Xylulose zu D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt, welches dann über den Pentosephosphatzyklus abgebaut wird. Nach *Charalampous*³ erfolgt in der Rattenniere daneben auch eine Spaltung zwischen den C-Atomen 3 und 4 des Cyclohexanringes, wobei L-Glucuronsäure entstehen sollte. Dieser Befund bedarf aber noch der Bestätigung.

Ein zweiter Abbauweg, der bisher mit Sicherheit nur in Bakterien, u. zw. zuerst in *Aerobacter aerogenes* nachgewiesen wurde⁶, beginnt mit einer Dehydrogenierung des *myo*-Inosits zu 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon, das dann dehydratisiert wird, wobei D-3,5/4-Trihydroxycyclohexandion entsteht. Der Ring bleibt somit bis zu dieser Stufe intakt und erst in der Folgereaktion erfolgt hydrolytische Ringspaltung zu einer acyclischen Säure, die schließlich zu C₃-, C₂- und C₁-Bruchstücken aufgespalten wird.

Der erste Schritt dieses Abbauweges, die Dehydrogenierung von *myo*-Inosit zu der genannten Inosose, ist in der Natur allerdings weiter verbreitet. Er ist eine Teilreaktion bei der Epimerisierung von *myo*-Inosit zu *scyllo*-Inosit⁷; weiters finden wir ihn auch als isolierte Reaktion in *Acetobacter suboxydans*, wo ganz allgemein axiale Hydroxylgruppen von Cycliten in Ketogruppen übergeführt werden^{8, 9}.

Im Verlauf unserer Versuche, den Abbau von *myo*-Inosit in *Pseudomonas beijerinckii* aufzuklären, wurde gefunden, daß auch hier die Primärreaktion die Überführung der einzigen axialen Hydroxylgruppe des *myo*-

³ F. C. Charalampous und C. Lyras, J. Biol. Chem. **228**, 1 (1957).

⁴ K. M. Gruhner und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **347**, 278 (1966); Mh. Chem. **99**, 1827 (1968).

⁵ E. Thonet und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **97**, 107 (1966).

⁶ T. Berman und B. Magasanik, J. Biol. Chem. **241**, 800, 807 (1966); B. Magasanik, Ann. New York Acad. Sci. (im Druck).

⁷ D. J. Candy, Biochem. J. **103**, 666 (1967).

⁸ J. Larnner, W. T. Jackson, D. J. Graves und J. R. Stamer, Arch. Biochem. Biophys. **60**, 352 (1956).

⁹ A. Weissbach, Biochim. Biophys. Acta **27**, 608 (1958).

Inosits in eine Ketogruppe ist. Wir haben das dafür verantwortliche Enzym, eine NAD-spezifische Dehydrogenase, die systematisch als *myo*-Inosit : NAD-Oxydoreductase (EC 1.1.1.18) zu bezeichnen ist, angereichert und in ihren Eigenschaften charakterisiert. Enzyme dieser Spezifität sind wohl bereits in anderen Organismen nachgewiesen und untersucht worden; gegenüber den bisher bekannten Präparationen weist aber unser Enzym gewisse Unterschiede auf und außerdem zeigt die Kinetik Besonderheiten, die uns von Interesse erscheinen.

In späteren Veröffentlichungen sollen die Enzyme, welche die weiteren Abbauschritte für *myo*-Inosit in *Pseudomonas beijerinckii* katalysieren, beschrieben werden.

Materialien und Methoden

Mikroorganismen. Die verwendete Kultur von *Pseudomonas beijerinckii* Hof wurde von Prof. T. O. Wyken (Delft, Niederlande) erhalten. Der Organismus wurde auf einem Nährboden gezüchtet, der auf 1 l destill. Wasser 120 g NaCl, 0,4 g KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 10 g Mannit, 5 g *myo*-Inosit, 5 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt (Difco) enthielt. Als Grundkulturen wurde Schrägagarröhrchen, welche dieses Medium mit 3% Agar enthielten, verwendet. Zur Züchtung größerer Zellmengen wurde der Organismus zuerst in Flüssigkulturen in 10 ml Medium wachsen gelassen und dann auf Roux-Flaschen mit je 200 ml Medium überimpft. Die Zellen wurden 2 Tage nach Überimpfung auf die Roux-Flaschen geerntet.

Acetobacter suboxydans 621 wurde von der American Type Culture Collection bezogen.

Substrate und Coenzym. NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, ATP und ADP wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. *D-chiro*-Inosit, Quercit, *scyllo*-Inosit, *D*-Pinit und Sequoyit wurden in unserem Laboratorium isoliert; für die Überlassung dieser Substanzen sind wir den Herrn Dr. Kindl, Dr. Ruis und Wöber zu Dank verpflichtet. 2,4,6/3,5-Pentahydrocyclohexanon und DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon wurden nach Posternak¹⁰ hergestellt; [u-¹⁴C]*myo*-Inosit wurde mit Hilfe der Methode der Photoassimilation von ¹⁴CO₂ in *Chrysanthemum leucanthemum* gewonnen¹¹. Auf diese Weise hergestellter [u-¹⁴C]*myo*-Inosit wurde mit Hilfe von *Acetobacter suboxydans* in [u-¹⁴C] 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon übergeführt, wobei die auf dem von Posternak¹⁰ angegebenen flüssigen Nährboden gewachsenen Zellen 2 Tage lang mit dem markierten *myo*-Inosit inkubiert wurden. Das Produkt wurde papierchromatographisch abgetrennt und gereinigt.

¹⁰ T. Posternak, Biochem. Prep. 2, 57 (1952).

¹¹ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. 335, 180 (1964).

Papierchromatographie. Für die Reinigung der Substrate und Produkte wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet: Aceton—Wasser 4 : 1, n-Butanol—Eisessig—Wasser 4 : 1 : 1, Essigsäureäthylester—n-Propanol—Wasser 13 : 24 : 7. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe der Durchziehmethode; als Reagentien dienten AgNO_3 in Aceton¹² und für Ketoverbindungen eine Lösung von 0,5% Nitrotetrazoliumblau und 5% NaOH in 90proz. Äthanol.

Bestimmung der Enzymaktivität. Die Enzymaktivität wurde routinemäßig mit Hilfe der Bestimmung der Absorption von NADH im Spektrophotometer gemessen. Um die Oxydation von *myo*-Inosit zu 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon zu verfolgen, wurde mit 3 ml Lösung gearbeitet, die 9 μMole *myo*-Inosit, 1,5 μMole NAD^+ , 0,15 mMole Trispuffer, pH 9,0, sowie 0,1 ml der zu bestimmenden Enzymlösung enthielt. Wenn die Reduktion von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon verfolgt werden sollte, so enthielt die Lösung 6 μMole dieses Substrats, 0,06 μMole NADH, 0,15 mMole Trispuffer, pH 7,0 und wiederum 0,1 ml der Enzympräparation. Aus der Zu- bzw. Abnahme der Extinktion bei 340 m μ in den ersten 2 Min. wurde die Aktivität berechnet.

Bestimmung des Proteingehaltes der Enzympräparationen. Die Proteinkonzentrationen der Enzympräparationen wurde entweder nach Warburg und Christian¹³ oder nach der Folinschen Phenolmethode¹⁴ gemessen.

Die Anreicherung des Enzyms

Die mit Hilfe der beschriebenen Züchtungsmethoden erhaltenen Zellen von *Pseudomonas beijerinckii* wurden abzentrifugiert, einmal mit 12proz. NaCl-Lösung und dann zweimal mit destill. Wasser gewaschen. Danach können sie ohne Aktivitätsverlust des Enzyms im gefrorenen Zustand mindestens zwei Monate lang aufbewahrt werden.

Ein Rohextrakt wurde hergestellt, indem man die aus 5 l Nährlösung gesammelten Zellen (15 g Feuchtgewicht) in 200 ml 0,05 *M*-Tris—HCl-Puffer, pH 7,5, der in bezug auf 2-Mercaptoäthanol 0,01 *M* war, suspendierte und dann die Mischung in kleinen Anteilen unter Eiskühlung je 5 Min. mit Ultraschall behandelte. Danach wurden die Zellreste durch Zentrifugieren entfernt. Die so erhaltene Lösung wurde 5 Stdn. lang gegen 5 Liter 0,002 *M*-Tris—HCl-Puffer, pH 7,5, 0,005 *M* in bezug auf 2-Mercaptoäthanol, dialysiert.

Der so erhaltene Rohextrakt wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat in der Kälte auf 30proz. Ammoniumsulfatsättigung gebracht,

¹² W. E. Trevelyan, D. P. Procter und J. S. Harrison, Nature [London] **166**, 444 (1950).

¹³ O. Warburg und W. J. Christian, Biochem. Z. **310**, 384 (1942).

¹⁴ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).

das dabei entstandene Präzipitat abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Lösung wurde dann weiter auf 50proz. Ammoniumsulfat-sättigung gebracht. Dabei wird der größte Teil des Enzyms ausgefällt. Das Protein wurde abzentrifugiert und in 10 ml 0,05*M*-Tris—HCl-Puffer, pH 7,5, 0,01*M* in bezug auf 2-Mercaptoäthanol, gelöst.

Diese Lösung wurde nunmehr an einer Säule (2,5×140 cm) von Bio-Gel P-200 aufgetragen und dann mit 0,05*M*-Tris—HCl-Puffer, pH 7,5, 0,01*M* in bezug auf 2-Mercaptoäthanol, eluiert. Es wurden Fraktionen von 10 ml aufgefangen. Die Enzymaktivität wurde fast ausschließlich in den Fraktionen 20 bis 25 gefunden.

Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden nochmals einer Ammoniumsulfatfraktionierung unterworfen, wobei die Fällung zwischen 35- und 50proz. Ammoniumsulfatsättigung weiterverwendet wurde. Diese wurde in 5 ml 0,05*M*-Tris—HCl-Puffer, pH 7,5, 0,01*M* in bezug auf 2-Mercaptoäthanol, gelöst, und auf eine Säule (20×2 cm) von DEAE-Cellulose aufgetragen. Zur Elution wurde 0,025*M*-Trispuffer, pH 7,9, verwendet; das Enzym erschien dabei gleich nach der Lösungsmittelfront.

Eine Enzymaufarbeitung der beschriebenen Art ist in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Anreicherung des Enzyms

Reinigungsstufe	Gesamtaktivität (U)	spezif. Aktivität (U/mg Protein)	Anreicherung
Rohextrakt	19,8	0,0325	1
1. Ammoniumsulfatfällung	16,5	0,113	3,5
P-200-Eluat	12,4	4,8	14,8
2. Ammoniumsulfatfällung	10,4	7,0	215
DEAE-Eluat	8,8	18,0	553

Während die Aktivität im Rohextrakt bereits nach 2 Tagen stark abgesunken ist, zeigt das gereinigte Präparat bei 0° nur geringen Aktivitätsabfall innerhalb von 3 Wochen; es wird jedoch durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört, so daß eine Aufbewahrung im gefrorenen Zustand nicht möglich ist.

Untersuchung des Enzyms auf Induzierbarkeit

Der Organismus wurde auf einem Nährboden gezüchtet, der an Stelle der üblichen Konzentration von *myo*-Inosit die gleiche Menge von Mannit enthielt. Um eine Verunreinigung der Kultur mit *myo*-Inosit durch die Stickstoffquelle zu vermeiden, wurde hier ein vitaminfreies Caseinhydrolysat der Fa. Difco („Casamino Acids“) verwendet. Bei Aufarbeitung derartiger Kulturen auf das Enzym wurde gefunden, daß die Aktivität des

Tabelle 2. Relative Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substraten

Zur Bestimmung: die verwendeten Puffer sind im Text beschrieben. Die Konzentrationen der Substrate sind: Gruppe 1: 30 mMol/l, Gruppe 2: 0,5 mMol/l, Gruppe 1': 2 mMol/l, Gruppe 2': 0,02 mMol/l

Substrat der Gruppen		relative Geschwindigkeit
1	2	
<i>myo</i> -Inosit	NAD ⁺	100 (Bezugsreaktion)
<i>myo</i> -Inosit	NADP ⁺	1
<i>scyllo</i> -Inosit	NAD ⁺ , NADP ⁺	0
Mannit	NAD ⁺	0
L-(+)-Quercit	NAD ⁺	50
D- <i>chiro</i> -Inosit	NAD ⁺	18
D-Pinit	NAD ⁺	0
Sequoyit	NAD ⁺	0
2,4,5/3,6-Pentahydroxy-cyclohexanon	NAD ⁺ , NADP ⁺	0
DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxy-cyclohexanon	NAD ⁺	5
DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxy-cyclohexanon	NADP ⁺	1,5
1'	2'	
2,4,5/3,6-Pentahydroxy-cyclohexanon	NADH	100 (Bezugsreaktion)
2,4,5/3,6-Pentahydroxy-cyclohexanon	NADPH	20
DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxy-cyclohexanon	NADH	9

Tabelle 3. *Michaelis*-Konstanten in mMol/l

Substrat	K_m	Einfluß der Konzentration des Co-Substrates in mMol/l
<i>myo</i> -Inosit	20	unabhängig von NAD ⁺
NAD ⁺	0,29	unabhängig von <i>myo</i> -Inosit
2,4,6/3,5-Pentahydroxy-cyclohexanon	2	0,05 bis 0,2 NADH
2,4,6/3,5-Pentahydroxy-cyclohexanon	0,49	0,3 NADH (beginnende Hemmung)
NADH	0,019	2,26 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexan

Enzyms pro Gewichtseinheit der extrahierten Zellen innerhalb von $\pm 10\%$ gleich war derjenigen, die bei Aufarbeitung von auf *myo*-Inosit enthaltenen Kulturen gemessen wurde. Dieser Befund kann als ein eindeutiger Beweis für die konstitutive Natur des Enzyms gewertet werden.

Eigenschaften des Enzyms

Reaktionsprodukte, Reversibilität. Das Gleichgewicht der Reaktion *myo*-Inosit + NAD \rightleftharpoons 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon + NADH + H⁺ liegt sehr weit auf der linken Seite. Zum Nachweis der Bildung von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon war es deshalb erforderlich, die Lage des Gleichgewichts durch Zugabe von Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27; bezogen von der Fa. Boehringer, Mannheim) und Natriumpyruvat zu verbessern. Bei Einsatz von [u-¹⁴C]*myo*-Inosit wurde nach 3 Std. Inkubation das erhaltene Reaktionsgemisch mit Vergleichssubstanzen in den drei angegebenen Lösungsmittelgemischen chromatographisch aufgetrennt. Das Reaktionsprodukt zeigte in allen Fällen das gleiche Wanderungsverhalten wie 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon. Bei mehrfachem Umkristallisieren mit einer authentischen Probe von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon blieb die spezifische Aktivität konstant. Bei der Umkehr der Reaktion konnte auf gleiche Weise leicht die Entstehung von *myo*-Inosit nachgewiesen werden.

Substratspezifität. Tab. 2 gibt eine Übersicht über die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten mit verschiedenen Substraten.

pH-Optima der Wirkungen. Zur Bestimmung der pH-Optima wurde für den Bereich von pH 5 bis 8 mit 0,05*M*-Phosphatpufferlösung, für denjenigen von pH 7 bis 9,1 mit 0,05*M*-Tris—HCl-Pufferlösung und für denjenigen von pH 8,7 bis 10 mit 0,05*M*-Glycin—NaOH-Pufferlösung gearbeitet. Für die Oxydation von *myo*-Inosit zu 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon befindet sich das pH-Optimum deutlich zwischen pH 9,0 und 9,5; die Gegenreaktion zeigt hingegen ein breites Optimum zwischen pH 6 und 8.

Inhibitoren. p-Chlormercuribenzoat und Zn⁺⁺ in Konzentrationen von 3×10^{-4} Mol/l hemmen die Enzymwirkung komplett. Eine weit schwächere Inhibition wird durch Cyanid verursacht; $1,7 \times 10^{-3}$ Mol/l vermindern die Aktivität um etwa 40%. Bei Konzentrationen von 10^{-3} Mol/l sind Jodacetat, EDTA, Mg⁺⁺, Ni⁺⁺, ATP und ADP ohne jeden Einfluß auf die Enzymaktivität.

Kinetik. Bei der Oxydation von *myo*-Inosit mit Hilfe von NAD⁺ als Wasserstoffakzeptor sind die *Michaelis*-Konstanten für *myo*-Inosit und für NAD (Tab. 3) jeweils von der Konzentration der anderen Komponente unabhängig (Abb. 1). Somit folgt die Reaktion der Gleichung

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_{m\text{NAD}^+}}{c_{\text{NAD}^+}}\right) \left(1 + \frac{K_{m\text{myo-Inosit}}}{c_{\text{myo-Inosit}}}\right)}$$

Hier ist v die Reaktionsgeschwindigkeit, V die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, K_m die *Michaelis*-Konstante für das im Index stehende Substrat und c die Konzentration des im Index stehenden Substrats.

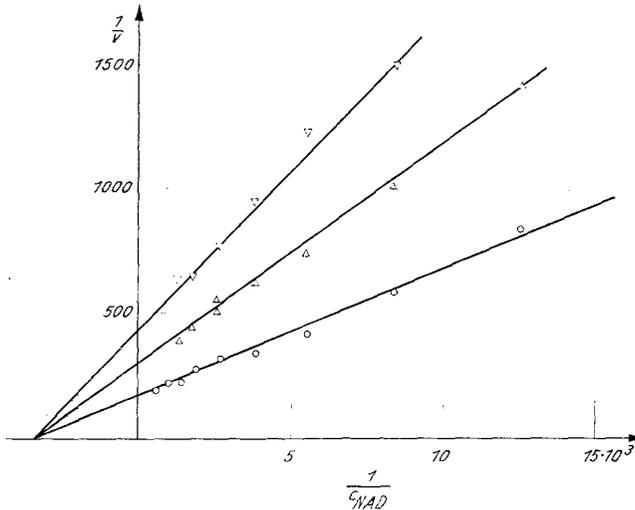


Abb. 1. *Michaelis*konstante von NAD^+ bei verschiedenen Konzentrationen von *myo*-Inosit. Die zu messende Lösung enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml 150 μMol Tris-Puffer pH 9,0, 0,1 ml Enzymlösung und Inosit in folgenden Mengen: ∇ 5,55 μMol , \triangle 9,24 μMol und \circ 18,5 μMol . Die Menge an NAD^+ ist variabel. Die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit ist in $\mu\text{Mol}/\text{min}$ angegeben

Bei der Reaktion in der Gegenrichtung beobachtet man eine Hemmung durch beide Substrate, 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon und NADH. Bei Erhöhung der Konzentration der Inosose wird die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit zur ihr proportional (Abb. 2), womit der folgende Zusammenhang gegeben ist:

$$v = \frac{V \cdot c_{\text{Inosose}}}{(K_{m\text{Inosose}} + c_{\text{Inosose}}) \left(1 + \frac{c_{\text{Inosose}}}{K_i}\right)} \quad \text{mit } K_i = 3,3 \cdot 10^{-3} M$$

Hingegen ist die Hemmung durch NADH der vierten Potenz der NADH-Konzentration proportional (Abb. 3); somit gilt:

$$v = \frac{V \cdot c_{\text{NADH}}}{(K_{m\text{NADH}} + c_{\text{NADH}}) \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i'}\right)^4} \text{ mit } K_i' = 4,7 \cdot 10^{-4} M.$$

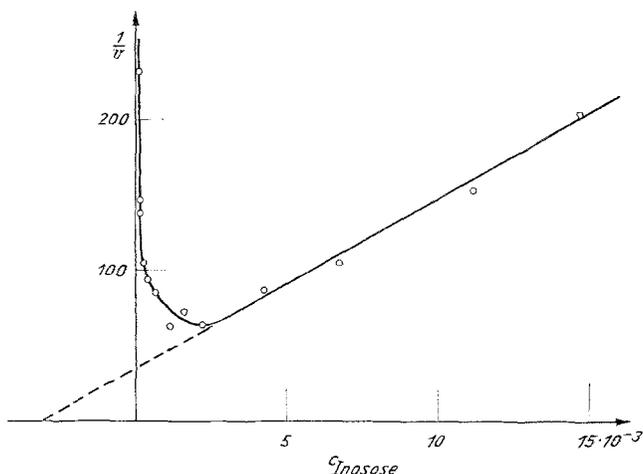


Abb. 2. Hemmung der enzymatischen Reduktion von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon mit NADH durch höhere Konzentrationen von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon. Die zu messende Lösung enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml 150 μ Mol Tris-Puffer pH 7,0, 0,01 ml Enzymlösung, 0,93 μ Mol NADH und die aus der Abb. ersichtliche Konzentration an 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon. Die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit ist gegen die Substratkonzentration an 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon aufgetragen

Diskussion

Von Enzymen gleichartiger Spezifität sind bisher nur wenige genauer untersucht worden. Die Berichte über Enzympräparationen aus *Acetobacter suboxydans*^{8, 9} und aus einer Heuschreckenart⁷ enthalten nur wenige Daten, die einen Vergleich mit der *myo*-Inosit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas beijerinckii* ermöglichen. Ein beträchtlicher Unterschied scheint bei der Substratspezifität des *Acetobacter*-Enzyms vorzuliegen, da dieses auch *scyllo*-Inosit und damit äquatoriale Hydroxylgruppen angreifen kann, während die hier beschriebene Enzympräparation offensichtlich streng für axiale Hydroxylgruppen spezifisch ist. Da es sich aber bei den Enzympräparationen aus *Acetobacter* um wenig gereinigte Zubereitungen handelt, wäre es denkbar, daß noch andere Enzyme zugegen waren; *Larner*⁸ hält es auch für möglich, daß der von ihm als Substrat verwendete *scyllo*-Inosit *myo*-Inosit als Verunreinigung enthielt.

Hingegen stimmt das hier beschriebene Enzym in Eigenschaften und Spezifität sehr weitgehend mit demjenigen aus *Aerobacter aerogenes* überein; bei diesem Enzym wurde auch eine Hemmung durch das Produkt bzw. Substrat 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon beschrieben. Eine genauere Analyse dieser Erscheinung wurde aber dort nicht vorgenommen.

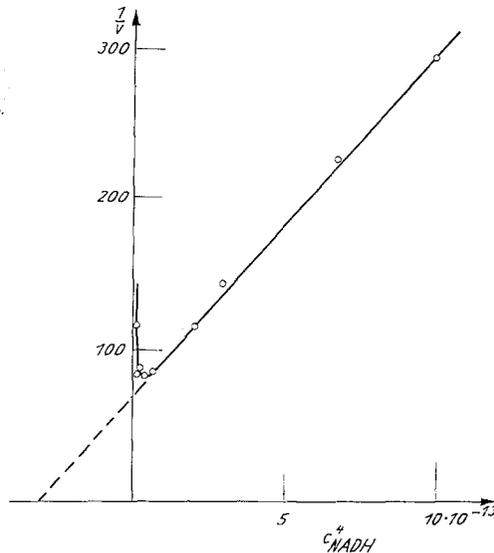


Abb. 3. Hemmung der enzymatischen Reduktion von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon mit NADH durch höhere Konzentrationen von NADH. Die zu messende Lösung enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml 150 μ Mol Tris-Puffer pH 7,0, 0,01 ml Enzymlösung, 6,78 μ Mol 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon und variable Mengen an NADH. Die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit ist gegen die vierte Potenz der NADH-Konzentration aufgetragen

Der wesentliche Unterschied gegenüber dem Enzym aus *A. aerogenes* liegt darin, daß dieses Enzym induzierbar ist, während wir zeigen konnten, daß es sich bei *Pseudomonas beijerinckii* um ein konstitutives Enzym handelt, das also auch in gleicher Aktivität vorhanden ist, wenn der Organismus auf einem Nährboden wächst, der keinen *myo*-Inosit enthält. Ein weiterer, wohl aber nicht wesentlicher Unterschied besteht darin, daß sich die gereinigten Präparationen unseres Enzyms nicht im gefrorenen Zustand aufbewahren lassen, was mit dem Enzym aus *Aerobacter* möglich ist.

Die Kinetik unserer *myo*-Inosit-Dehydrogenase zeigt einige Besonderheiten; hier ist besonders die ausgeprägte Hemmbarkeit durch Produkte bzw. Substrate zu erwähnen. Eine Hemmung, die der vierten Potenz der

Substratkonzentration proportional ist, wie wir sie bei NADH beobachten konnten, ist unseres Wissens in der Literatur noch niemals beschrieben worden. Für eine mögliche biologische Bedeutung dieser Erscheinung haben wir aber bisher noch keine Hinweise.

Noch unvollendete Untersuchungen über das weitere Schicksal von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon in *Pseudomonas beijerinckii* und über die Chinonbildung aus *myo*-Inosit in diesem Organismus lassen uns darauf schließen, daß nicht nur das beschriebene Enzym des *myo*-Inositabbaus, sondern auch die weiteren Enzyme dieser Reaktionsfolge mit denjenigen aus *Aerobacter aerogenes*⁶ weitgehend übereinstimmen. Die Bildung von Tetrahydroxybenzochinon und verwandter Chinone ist bisher noch nicht völlig geklärt. Unsere bisherigen Ergebnisse scheinen aber alle in der Richtung zu deuten, daß unter den Bedingungen der Chinonproduktion aus *myo*-Inosit ein Enzym des Abbaumechanismus in seiner Wirksamkeit komplett oder zumindest beträchtlich gehemmt ist. Dadurch häuft sich ein Zwischenprodukt zuerst im Zellinneren an und wird schließlich in das Medium sezerniert, wo es auf nichtenzymatische Weise zum Chinon oxydiert wird.

Die vorliegende Arbeit wurde durch einen Förderungsbeitrag der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.