

## BIOCHEMISCHE BEZIEHUNG ZWISCHEN MANNITBILDUNG UND HEXOSEMONOPHOSPHATZYKLUS IN *AGARICUS BISPORUS*

G. A. DÜTSCH und DORA RAST

Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich, Switzerland

(Eingegangen 29 Februar 1972)

**Key Word Index**—*Agaricus bisporus*; Agaricaceae; fungi; biosynthesis; mannitol; hexose monophosphate shunt; growth regulation.

**Abstract**—Mannitol accumulation occurs in almost all higher fungi, but its physiological significance is unknown. The polyol is neither a carbon source for growth nor a respiratory substrate, and polymeric compounds in which it might be incorporated have not so far been found. Experiments have been designed to investigate whether the biosynthesis of mannitol, rather than its mere presence, could be of prime importance for organisms synthesizing this sugar alcohol. The labelling patterns of mannitol isolated after application of glucose-1-<sup>3</sup>H, -6-<sup>3</sup>H or -3-<sup>3</sup>H to slices of *Agaricus bisporus* fruit bodies were determined. The results show that the biogenesis of mannitol involves the reoxidation of NADPH formed in the hexose monophosphate shunt. These observations are discussed in relation to the known role of this pathway, and the fact that the overall rate of glucose catabolism via the shunt is normally limited by the availability of NADP. On this basis, it is suggested that mannitol formation has a growth-regulating function in this fungus.

### EINLEITUNG

AKKUMULATION von Zuckeralkoholen (vor allem von Mannit) stellt ein schon lange bekanntes metabolisches Charakteristikum der Asco- und der Basidiomyceten dar<sup>1</sup> und nimmt oft ein quantitativ bedeutendes Ausmass an. So kann z.B. der Mannitgehalt reifer Sporokarpen von *Agaricus bisporus* bis zu 40% des Trockengewichtes betragen.<sup>2</sup> Die stoffwechselphysiologische Funktion der Polyolbildung bei den Pilzen ist jedoch bis heute Gegenstand von Spekulationen geblieben (für detaillierte Literaturangaben vgl.<sup>3</sup>).

In *A. bisporus* verläuft Mannitbildung aus Glucose über freie Fructose als Zwischenprodukt, wobei der letzte Reaktionsschritt NADP-spezifisch erfolgt.<sup>4-6</sup> Da in Pilzen der Glucoseabbau via Hexosemonophosphat (= HMP)-Zyklus ganz allgemein von relativ grosser quantitativer Bedeutung ist<sup>7</sup> und beim Kulturchampignon im speziellen 60–80% der Glucose auf diesem Wege abgebaut werden<sup>8,9</sup>—dabei also viel NADPH anfällt—liegt die Annahme eines direkten biochemischen Zusammenhanges zwischen dem genannten

<sup>1</sup> R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol. 1, p. 103, Birkhäuser, Basel (1962).

<sup>2</sup> D. RAST, *Planta* **64**, 81 (1965).

<sup>3</sup> D. H. LEWIS and D. C. SMITH, *New Phytol.* **66**, 143 (1967).

<sup>4</sup> G. A. DÜTSCH, Dissertation Univ. Zürich (1971).

<sup>5</sup> J. M. EDMUNDOWICZ and J. C. WRISTON, JR., *J. Biol. Chem.* **238**, 3539 (1963).

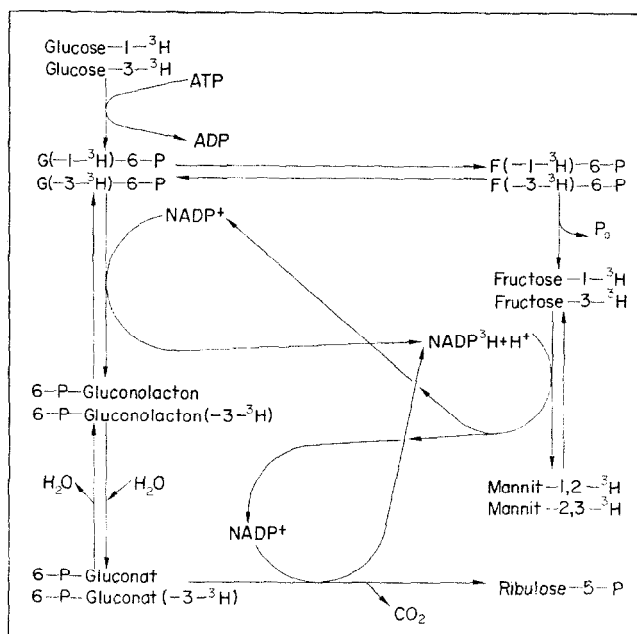
<sup>6</sup> G. DÜTSCH und D. RAST, *Arch. Mikrobiol.* **65**, 195 (1969).

<sup>7</sup> H. J. BLUMENTHAL, in *The Fungi* (edited by G. C. AINSWORTH and A. S. SUSSMAN), Vol. 1, pp. 252, 254, Academic Press, London (1965).

<sup>8</sup> P. LE ROUX, *Thèse de Doctorat ès-Sciences Naturelles*, Univ. Paris (1966).

<sup>9</sup> H. FUCHS, *Diplomarbeit* Univ. Zürich (1969).

Stoffwechselweg und der Mannitsynthese nahe. Ein experimenteller Beweis der entsprechenden, in Schema 1 dargelegten Hypothese wäre dann erbracht, wenn sich ein Transfer von im HMP-Zyklus durch Glucose-6-P- bzw. 6-P-Gluconat-Dehydrogenase abgespaltenem Wasserstoff auf das C2 von Fructose nachweisen liesse. Uebertragen alle beteiligten Enzyme Tritium, so müsste also nach Fütterung von Glucose-1-<sup>3</sup>H neben Mannit-1-<sup>3</sup>H auch Mannit-1,2-<sup>3</sup>H sowie Mannit-2-<sup>3</sup>H (durch Reduktion nichtmarkierter Fructose mit



SCHEMA 1. SCHEMA ZUM EXPERIMENTELLEN NACHWEIS EINER KOPPELUNG ZWISCHEN HMP-ZYKLUS UND MANNITSYNTHESE DURCH NADPH.

<sup>3</sup>H) entstehen, während bei Verwendung von Glucose-6-<sup>3</sup>H lediglich Mannit-6-<sup>3</sup>H (= Mannit-1-<sup>3</sup>H) feststellbar sein sollte. Eine ähnliche Argumentation ergäbe sich bei Verwendung von Glucose-3-<sup>3</sup>H anstelle von Glucose-1-<sup>3</sup>H als Tracer. Die präsentierte Versuchsanordnung zum Nachweis des interessierenden Tritiumtransfers ist allerdings nur dann zulässig, wenn eine Synthese von Glucose-1-<sup>3</sup>H aus Abbauprodukten von Glucose-6-<sup>3</sup>H nicht oder doch nur in geringem Ausmass erfolgt.

Ein Beweis der obigen Hypothese würde einen wesentlich neuen Aspekt in die Diskussion über die biochemisch-physiologische Bedeutung der Polyolbildung bei Pilzen bringen.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### *Nachweis der Transformation des intakten C-Gerüsts von Glucose in Mannit*

Der Nachweis eines enzymatischen Tritiumtransfers vom C1 bzw. C3 der Glucose auf das C2 der Fructose—die dabei in Mannit übergeht—in der in Schema 1 dargelegten Weise beruht auf der Voraussetzung, dass in der Zelle keine Randomisierung der Markierung der Füttersubstanz durch Spaltung der C-Kette und Rekombination hierbei entstehender Metabolite zum Akzeptormolekül (Fructose) stattfindet.

Zur Prüfung, inwiefern diese Annahme zutrifft, isolierten wir den bei Applikation von G-1-<sup>14</sup>C, G-3,4-<sup>14</sup>C bzw. G-6-<sup>14</sup>C gebildeten Mannit und bestimmten nach Perjodatoxydation desselben das jeweilige Markierungsmuster. Allerdings kann dabei nur zwischen den endständigen C-Atomen (C1 + C6) einerseits und denjenigen aus dem Mittelstück des Moleküls (C2 – C5) andererseits unterschieden werden (vgl. experimenteller Teil). Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 1 dargestellt. Zieht man in Betracht, dass auch bei Aussenmarkierung ein kleiner Teil der Totalaktivität des Mannits (3–5%) im Filtrat zu finden und demnach als Nullwert zu betrachten ist (Dimedon etwas wasserlöslich, unvollständiger Abbau des Mannits u.a. Ursachen: vgl. Testsubstanz Mannit-1-<sup>14</sup>C), so folgt aus dieser Bausteinanalyse, dass bei der Ueberführung von Glucose in Mannit keine Randomisierung der Markierung des C<sub>6</sub>-Skelettes erfolgt.

TABELLE 1. INTRAMOLEKULARE RADIOAKTIVITÄTSVERTEILUNG IN MANNIT, ISOLIERT AUS PLECTENCHYMSCHNITTEN VON *A. bisporus* NACH APPLIKATION VON <sup>14</sup>C-GLUCOSE

Mannit nach Fütterung von	<sup>14</sup> C an (%)	
	C1 + C6	C2 – C5
Glucose-6- <sup>14</sup> C	98,3	1,7
Glucose-1- <sup>14</sup> C	97,0	3,0
Glucose-3,4- <sup>14</sup> C	4,3	95,7
Mannit-1- <sup>14</sup> C (Handelsprodukt)	97,3–94,7	2,7–5,3

#### Nachweis des postulierten Tritiumtransfers

Entsprechend dem in Schema 1 dargelegten Schema können nun markierte Atome aus G-1-<sup>3</sup>H, G-6-<sup>3</sup>H und G-3-<sup>3</sup>H auf zwei Wegen in Mannit gelangen, nämlich (1) dadurch, dass intakte C<sub>6</sub>-Einheiten samt dem daran gebundenen <sup>3</sup>H zum Hexit transformiert werden, der die Markierung somit an derselben Stelle trägt wie der applizierte Präkursor, und (2) via Tritiumübertragung vom C1 bzw. C3 des Tracers zunächst auf NADP und dann auf Fructose durch Vermittlung von G-6-P- bzw. 6-P-Gluconat- und Mannitol-Dehydrogenase. Ein solcher Transfer findet, wie Tabelle 2 zeigt, tatsächlich statt; denn Verwendung von G-1-<sup>3</sup>H führt zu Mannit mit teilweiser Markierung im Mittelteil des Moleküls (wohl am C2), Fütterung von G-6-<sup>3</sup>H hingegen nicht. Die demnach bei der Mannitbildung zwischen der Dehydrierung von G-6-P und der Reduktion von Fructose auftretende Koppelung muss

TABELLE 2. INTRAMOLEKULARE RADIOAKTIVITÄTS-VERTEILUNG IN MANNIT, ISOLIERT AUS PLECTENCHYMSCHNITTEN VON *A. bisporus* NACH APPLIKATION VON <sup>3</sup>H-GLUCOSE

Mannit nach Fütterung von	<sup>3</sup> H an (%)	
	C1 + C6	C2 – C5
Glucose-6- <sup>3</sup> H	98,1	1,9
Glucose-1- <sup>3</sup> H	80,5	19,5
Glucose-3- <sup>3</sup> H	1,7	98,3
Mannit-1- <sup>3</sup> H (Handelsprodukt)	96,0	4,0

TABELLE 3. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT VON MANNIT, ISOLIERT NACH FÜTTERUNG VON PLECTENCHYMSCHNITTEN VON *A. bisporus* MIT VERSCHIEDENEN TYPEN TRITIERTER GLUCOSE

Gefütterter Tracer	spez. Akt. des <sup>3</sup> H-Mannits (dpm/ng)
Glucose-6- <sup>3</sup> H	73,5
Glucose-1- <sup>3</sup> H	88,5
Glucose-3- <sup>3</sup> H	154,5

unter natürlichen Verhältnissen bedeutend effektiver sein, als durch das Versuchsergebnis angezeigt, da—neben der bei der Oxydation von G-1-<sup>3</sup>H erfolgenden Isotopendiskriminierung<sup>10</sup>—in der betrachteten Reaktionskette zweifelsohne an mehreren Stellen Effekte auftreten, welche auf eine Benachteiligung der Umsetzung tritiumhaltiger Moleküle hinauslaufen.

Die nach Applikation von G-3-<sup>3</sup>H zu beobachtende intramolekulare Tritiumverteilung im Mannit entspricht zwar der Erwartung, wäre aber als Beweis dafür, dass auch die Dehydrierung von 6-P-Gluconsäure Reduktionsäquivalente zur Synthese von Mannit liefert, unbrauchbar, da ohnehin die gesamte Markierung am Mittelteil (am C3 und allenfalls auch am C2) zu finden sein muss. Bei Verwendung dieses Tracers kann also der Wasserstofftransfer nicht nach der im obigen Fall angewendeten Methode untersucht werden. Zieht man nun aber in Betracht, dass bei der Oxydation von in Position 3 tritierter Glucose keine Isotopendiskriminierung feststellbar ist,<sup>10</sup> so wird man nach Fütterung von G-3-<sup>3</sup>H Mannit von höherer spezifischer Aktivität erwarten als nach Applikation von G-1-<sup>3</sup>H (unter der selbstverständlichen Voraussetzung gleicher spezifischer Aktivität der verwendeten Tracersubstanzen). Wie die in Tabelle 3 aufgeführten Versuchsergebnisse zeigen, trifft die Vermutung zu. Es ist klar, dass dieses Resultat für sich allein noch keinen hinreichenden Beweis für eine Koppelung zwischen der Dehydrierung von 6-P-Gluconat und der Mannitsynthese darstellen würde; denn eine höhere spezifische Aktivität von Mannit nach Fütterung von G-3-<sup>3</sup>H könnte sich theoretisch auch ohne Tritiumübertragung auf das C2 der Fructose ergeben, dann nämlich, wenn G-3-<sup>3</sup>H bei der Transformation ganzer Hexosemoleküle in Mannit eine wesentlich geringere Diskriminierung als G-1-<sup>3</sup>H erführe. Anhaltspunkte für das Vorliegen einer solchen Situation liegen jedoch nicht vor. Ferner müssten bei einer Koppelung der Mannitsynthese lediglich mit der Oxydation von G-6-P und nicht auch mit derjenigen von 6-P-Gluconat im Zytosol zwei NADPH-Pools bestehen, was unwahrscheinlich ist.

### Folgerungen

Da nun einerseits durch Mannitbildung Reoxydation von im HMP-Zyklus gebildetem NADPH erfolgt, andererseits das Ausmass des Glucoseumsatzes über diesen Stoffwechselweg im wesentlichen durch das NADP-Angebot limitiert ist,<sup>11</sup> erscheint die Folgerung als zwingend, dass der Hexosekatabolismus via C1-Oxydation durch die Syntheserate von Mannit kontrolliert werden kann. Insbesondere dürfte eine durch vermehrte Hexitbildung ermöglichte Beschleunigung der Glucoseoxydation über den HMP-Zyklus seiner allgemein bekannten biochemischen Funktion entsprechend vor allem in Perioden starken Wachstums von Bedeutung sein. Untersuchungen über den Verlauf der Mannitbildung in Substratmycelium und Fruchtkörpern von *A. bisporus*<sup>2,4,12</sup> stehen mit dieser Annahme in Einklang. Da der Hexit normalerweise nicht wieder in den Stoffwechsel eintritt,<sup>4</sup> wird damit auch die einleitend erwähnte Polyolakkumulation bei den Pilzen verständlich.

### EXPERIMENTELLES

*Pflanzenmaterial.* Sämtliche Experimente wurden mit *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., Stamm 11-M5, durchgeführt. Die Sporokarpen waren jeweils frisch gepflückt und wiesen einen Hutdurchmesser von 3–4 cm auf. Die Applikation von Tracern an Plectenchymschnitte sowie die Extraktions- und Aufarbeitungs-verfahren sind in einer früheren Arbeit beschrieben.<sup>6</sup>

<sup>10</sup> J. KATZ, R. ROGNSTAD and R. G. KEMP, *J. Biol. Chem.* **240**, PC 1484 (1965).

<sup>11</sup> S. PONTREMOLI and E. GRAZI, in *Comprehensive Biochemistry* (edited by M. FLORKIN and E. H. STOTZ), Vol. 17, pp. 172, 183, Elsevier, Amsterdam (1969).

<sup>12</sup> G. A. DÜTSCH und D. RAST, *Mushroom Sci.* **8**, im Druck.

*Periodatoxydation.* Zur Bestimmung des Markierungsmusters von Mannit wurden Proben von 20 mg Hexit in 2 ml H<sub>2</sub>O mittels NaIO<sub>4</sub> oxydativ abgebaut und der aus den Endgruppen entstehende HCHO als Dimedonderivat ausgefällt (Methode von Bell,<sup>13</sup> jedoch ohne Erhitzen des Reaktionsgemisches). Die Radioaktivitätsmessung erfolgte sowohl am Formaldehyddimedon als auch im Filtrat.

*Radioaktivitätsmessungen.* Wässrige Lösungen wurden in einem Suspensionsgel, Formaldehyddimedon in Toluol auf Radioaktivität geprüft.<sup>6</sup> Zur Messung diente ein Szintillationszähler des Typs Nuclear-Chicago Unilux II.

*Anerkennungen*—Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sei für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, dem E. Hauser Champignonlaboratorium, Gossau-Zürich, für das Versuchsmaterial bestens gedankt.

<sup>13</sup> D. J. BELL, *J. Chem. Soc.* 992 (1948).