



Abbildung 1 zeigt deutlich dieselben räumlich-periodischen Systeme, wie sie bei *Chlorophytum* und *Aspidistra* gefunden wurden. Sie stehen in direkter Verbindung mit dem Lamellarsystem der Grana und des Stroma. LEYON² hat bei *Aspidistra* Stadien gefunden, die für eine Bildung der Stromalamellen von der Kristallgitterstruktur aus sprechen. In unserer Abbildung sind ausser den Stromalamellen auch schon Granalamellen vorhanden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie die komplizierten Bilder entwicklungsgeschichtlich zu deuten sind.

MÜHLETALE⁷ hat bei *Lilium*, *Fritillaria* und *Zea Mais* Beobachtungen gemacht, die vollkommen denen an *Chlorophytum* und *Aspidistra* entsprechen.

Mit der vorstehenden Notiz ist die Kristallgitterstruktur (oder, wie man es vorsichtiger nennen mag, ein mindestens zweiperiodisches System) auch bei einer Dikotyledone nachgewiesen. Damit kann es als gesichert

gelten, dass dieses System, wo vorhanden, mit der Ausbildung des Stroma-Granamusters in einem, wie auch gearteten, kausalem Zusammenhang steht.

E. HEITZ

Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, den 12. September 1956.

Summary

The same periodical structure of the so-called primary granum, as found in *Chlorophytum*, *Aspidistra* and other monocotyledons, is shown to be present in a dicotyledon also. There must exist a causal connection between that lattice and the development of the lamellar strom-grana pattern, as was first suggested by LEYON².

Xanthine Dehydrogenase in Bovine Blood Serum

In earlier studies of the distribution of xanthine dehydrogenase, there was a lack of reference to its presence in blood¹. However, BLAUCH and KOCH found that the addition of xanthine to blood of the rat and guinea pig resulted in an increase of its uric acid contents. These authors concluded, therefore, that xanthine oxidase was the enzyme responsible for this process². The blood of other animals tested (man, horse, cow, goat) appeared to be devoid of this enzyme³.

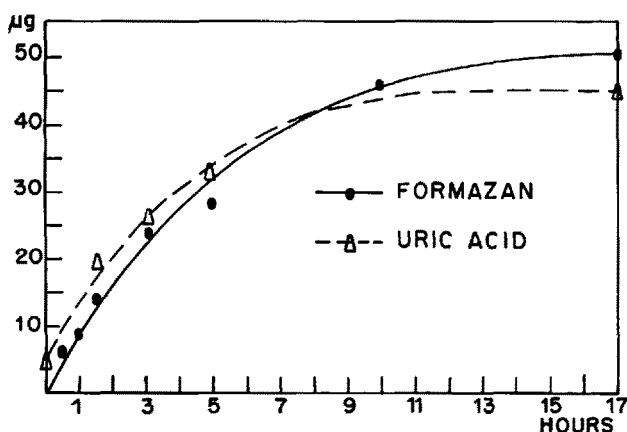


Fig. 1.—Increase production of uric acid and tetrazolium reduction by bovine serum incubated with xanthine at 37°C.

In the course of some experiments with xanthine oxidase in the blood of several animals⁴, we found that bovine serum, when in the presence of xanthine, is able to reduce the triphenyltetrazolium chloride to some extent; this process being due to a dehydrogenase. A more detailed study was then undertaken to demonstrate that xanthine dehydrogenase is the enzyme of the bovine blood serum.

¹ E. J. MORGAN, Biochem. J. 20, 1282 (1926).

² M. B. BLAUCH and F. C. KOCH, J. biol. Chem. 130, 455 (1939).

³ W. H. COLE, W. H. ELLETT, and N. A. WOMACK, J. Lab. clin. Med. 16, 918 (1931). — T. KAWACHI, Hukuoka Acta med. 44, 694 (1953).

⁴ G. G. VILLELA, O. R. AFFONSO, E. MITIDIERI, and L. P. RIBEIRO, An. Acad. Brasil. Ci. (in press).

⁷ K. MÜHLETALE (mündliche Mitteilung).

Bovine blood serum, when incubated with xanthine at 37°C in a water bath produced uric acid which increases with the time of incubation. The slope of the curve showed it to be of the same type as that obtained with the reduction of the tetrazolium dye (Fig.1). Uric acid was determined by the method of BLAUCH and

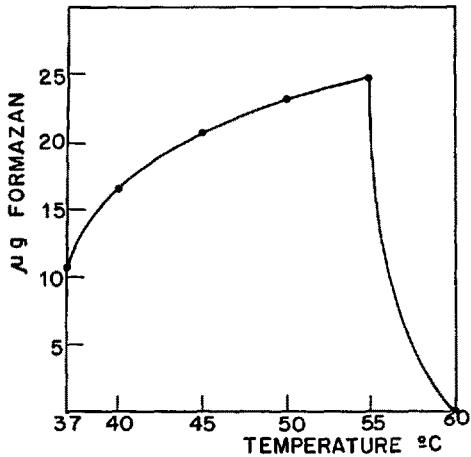


Fig. 2.—Increase tetrazolium reduction expressed in micrograms formazan with increasing temperatures.

KOCH⁵ and the dehydrogenase activity by the technique of VILLELA, the results expressed in micrograms of formazan produced⁶. The enzyme activity presented a maximum when it was incubated at 55°C, followed by an inactivation between 55–60°C. These results are shown in Figure 2.

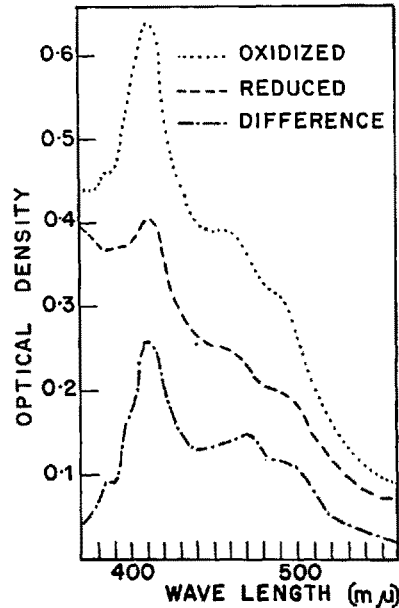


Fig. 3.—Absorption spectrum of bovine serum xanthine dehydrogenase in presence and absence of xanthine; the difference curve represents the change in spectrum as the enzyme is reduced by xanthine.

⁵ M. B. BLAUCH and F. C. KOCH, J. biol. Chem. 130, 443 (1939).
⁶ G. G. VILLELA, Rev. Brasil. Biol. 14, 455 (1954). — O. R. AFFONSO, E. MITIDIERI, L. P. RIBEIRO, and G. G. VILLELA, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 527 (1955).

Table

Inhibitors	Final concentration mg/ml	Bovine serum		Serum enzyme preparation	
		μg for-mazan	% inhi-bition	μg for-mazan	% inhi-bition
No inhibitor		22.31	—	14.70	—
6-pteridylaldehyde .	0.01	1.30	94.17	0	100
Aminopterin	0.01	6.11	72.62	0.41	97.20
Sodium azide	0.0133	17.08	23.44	5.24	64.36
Xanthopterin	0.01	21.56	3.37	6.53	55.59
p-Aminophenol	0.0133	19.44	12.87	10.82	26.40
KCN	0.0564	8.68	61.10	8.02	45.45
Borate	1.33	—	—	9.92	32.52

Effect of various inhibitors on bovine serum dehydrogenase and on its enzyme preparation. — Each Thunberg tube contained 1 ml of bovine serum or 1 ml of the serum xanthine oxidase preparation. 0.89 μM of triphenyltetrazolium chloride, 760 μM of xanthine, the amount of the inhibitor indicated in the table and sodium pyrophosphate buffer pH 8.6, total volume 8 ml. Blanks were run simultaneously.

Subsequent experiments were conducted to demonstrate the inhibition of the enzyme activity by several known inhibitors. A specific inhibition was obtained chiefly with 2-amino-4-hydroxy-6-pteridinecarboxaldehyde (6-pteridylaldehyde) and aminopterin which inhibits strongly xanthine oxidase as shown by KALCKAR *et al.*⁷.

An active fraction was prepared from blood serum using the technique of WESTERFELD *et al.*⁸. Blood serum was precipitated with ammonium sulfate in different concentrations and the final precipitate was dissolved and dialyzed in cellophane bags at low temperatures. The activity of the purified preparation was tested by the production of uric acid and by the reduction of triphenyltetrazolium chloride when incubated with sodium xanthine. The inhibition with 6-pteridylaldehyde, aminopterin, cyanide, sodium azide, xanthopterin, p-aminophenol and borate was assayed and the results are summarized in the table. As the table shows, the inhibition of the activity was comparable to that obtained with the original serum.

The enzyme preparation was submitted to spectrophotometric analysis before and after the addition of xanthine, showing a characteristic decrease of the maximum at 410 mμ corresponding to the reduced xanthine oxidase (Fig. 3). The spectrophotometric measurements were performed in a Beckman DU apparatus. The present experiments indicate that the absorption maxima are similar to those published for xanthine dehydrogenase of chicken liver by WESTERFELD⁹.

G. G. VILLELA, O. R. AFFONSO, and E. MITIDIERI¹⁰

Biochemical Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, July 13, 1956.

⁷ H. M. KALCKAR, N. O. KJELDGAARD, and H. KLENOW, Biochim. Biophys. Acta 5, 586 (1950).
⁸ D. A. RICHERT, R. VANDERLINDE, and W. W. WESTERFELD, J. biol. Chem. 186, 261 (1950).
⁹ C. N. REMY, D. A. RICHERT, R. J. DOISY, I. C. WELLS, and W. W. WESTERFELD, J. biol. Chem. 217, 293 (1955).
¹⁰ Fellow from Conselho Nacional de Pesquisas.

Résumé

Le sérum sanguin des bovidés contient des quantités élevées de xanthine déhydrogénase. On l'a démontré par le dosage de l'acide urique et la réduction du triphényltétrazolium après incubation avec de la xanthine. Des expériences complémentaires faites avec différents inhibiteurs de la xanthine oxydase et la préparation d'une fraction active donnant le spectre d'absorption de la xanthine oxydase ont confirmé les résultats obtenus avec le sérum non traité.

Beeinflussung des 5-Hydroxytryptamin-stoffwechsels im Gehirn durch Isonikotinsäurehydrazide

Reserpin bewirkt bei Kaninchen Abnahme des 5-Hydroxytryptamin (5HT, Serotonin)-Gehaltes im Gehirn innert einer halben Stunde nach Injektion; 5HT wird freigesetzt und durch Wirkung der Monoaminoxidase zu 5-Hydroxyindolessigsäure abgebaut¹. Dabei tritt Sedation ein. Durch Isopropyl-isonikotinsäurehydrazid (Iproniazid, *Marsilid*), das die Monoaminoxidase *in vitro* und *in vivo* hemmt², werden zentrale Wirkungen von Reserpin abgeschwächt oder aufgehoben. Es kann auch ein Zustandsbild entstehen wie nach 5-Hydroxytryptophan-Applikation. Diese Aminosäure passiert im Gegensatz zu 5HT die Blut-Hirnschranke gut und wird im Gehirn zu 5HT decarboxyliert. Dabei kommt Lysergsäure-diäthylamid (LSD)-artige Wirkung zustande³. Isonikotinsäurehydrazid (Isoniazid, *Rimifon*), das die Monoaminoxidase viel weniger stark hemmt⁴ als Iproniazid, verändert die Reserpinwirkung nicht⁵.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Iproniazidbehandlung der 5HT-Gehalt des Gehirns ansteigt und dass bei Iproniazidbehandelten Kaninchen 1 h nach Reserpininjektion der 5HT-Gehalt im Gehirn nicht wesentlich unter die Norm abfällt⁶. Diese Befunde er-

lauben jedoch nicht, über den Wirkungsmechanismus von Iproniazid auf den 5HT-Stoffwechsel des Gehirns sichere Schlüsse zu ziehen. Um darüber näheres zu erfahren, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich der 5HT-Gehalt des Gehirns Iproniazidbehandelter Tiere während einer längeren Zeitperiode nach Reserpin und bei verschiedenen Reserpindosen verhält; ferner, ob Isoniazid und Iproniazid die 5HT-Konzentration im Gehirn und die Wirkung von Reserpin auf den 5HT-Gehalt des Gehirns unterschiedlich beeinflussen.

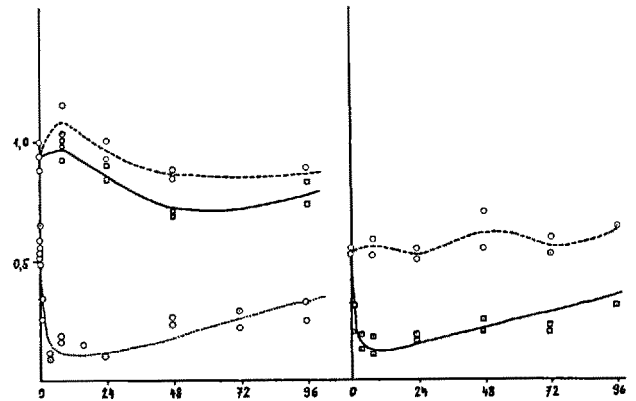


Abb. 1. Beeinflussung des 5HT-Gehaltes im Gehirn von Ratten durch Reserpin, Iproniazid und Isoniazid bzw. Kombination von Iproniazid/Reserpin und Isoniazid/Reserpin.

Ordinate: 5HT-Konzentration in γ/g Gehirn
Abszisse: Zeit in Stunden

links:

○-----○ 100 mg/kg Iproniazid subkutan, 16 h vor der ersten Messung.

○-----○ 3 mg/kg Reserpin intraperitoneal zur Zeit 0.

□-----□ 3 mg/kg Reserpin intraperitoneal, zur Zeit 0, 16 h nach 100 mg/kg Iproniazid subkutan.

rechts:

○-----○ 100 mg/kg Isoniazid subkutan 16 h vor der ersten Messung.

□-----□ 3 mg/kg Reserpin intraperitoneal zur Zeit 0, 16 h nach 100 mg/kg Isoniazid subkutan.

Für jede Messung wurden die Gehirne von zwei Tieren verwendet.

Methodik. Ratten, Mäuse und Kaninchen wurden mit Iproniazid, Isoniazid oder Reserpin sowie mit Kombinationen Iproniazid/Reserpin oder Isoniazid/Reserpin behandelt. Die Iproniazid- und Isoniaziddosis betrug 1 Mal 100 mg/kg (freie Base), bei Ratten und Mäusen subkutan, bei Kaninchen intravenös. Die Reserpindosis war verschieden je nach Tierart und Versuchsanordnung und wird später angegeben. Bei der Kombinationsbehandlung erfolgte die Injektion von Iproniazid bzw. Isoniazid 10 bis 16 h vor der Reserpininjektion. Die Tiere wurden in verschiedenem Intervall, maximal 4 Tage nach Reserpin-, Isoniazid- oder Iproniazidzufuhr getötet, Ratten und Mäuse durch Dekapitation, Kaninchen durch Luftembolie. Nach Homogenisierung des sofort entfernten Gehirns in 0,1 n-HCl erfolgte Extraktion des 5HT in Butanol bei pH 10, Reextraktion in 0,1 n-HCl und spektrophotofluorimetrische Bestimmung nach Einstellen des Extraktes auf 3 n mit konzentrierter HCl; λ des aktivierenden Lichtes = 295 m μ , λ des emittier-

¹ A. PLETSCHER, P. A. SHORE und B. B. BRODIE, J. Pharmacol. exp. Ther. 116, 46 (1956). – P. A. SHORE, S. L. SILVER und B. B. BRODIE, Science 122, 284 (1955).

² E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER und L. S. VAN ORDEN, Exper. 8, 349 (1952). – E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN und J. R. FOUTS, J. lab. clin. Med. 40, 965 (1952). – E. A. ZELLER und J. BARSKY, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 459 (1952). – R. W. SCHAYER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 60 (1953). – E. A. ZELLER, J. BARSKY und E. R. BERMAN, J. Biol. Chem. 214, 267 (1955).

³ D. F. BOGDANSKI, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND, Fed. Proc. 15, 402 (1956). – S. UDENFRIEND, D. F. BOGDANSKI und H. WEISSBACH, Fed. Proc. 15, 493 (1956). – S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH und D. F. BOGDANSKI, im Druck; *idem*, in Vorbereitung. – P. A. SHORE, A. PLETSCHER, E. G. TOMICH, A. CARLSSON, R. KUNTZMAN und B. B. BRODIE, Ann. N. Y. Acad. Sci., im Druck. – A. H. SJOERDSMA, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND, Amer. J. Med. 22, 520 (1956). – H. BESENDORF und A. PLETSCHER, Helv. physiol. Acta (1956) im Druck. – B. B. BRODIE, A. PLETSCHER und P. A. SHORE, J. Pharmacol. exp. Ther. 116, 9 (1956). – M. CHESSIN, B. DUBNICK, E. R. KRAMER und C. C. SCOTT, Fed. Proc. 15, 409 (1956).

⁴ E. A. ZELLER und J. BARSKY, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 459 (1952). – R. W. SCHAYER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 60 (1953).

⁵ H. BESENDORF und A. PLETSCHER, Helv. physiol. Acta (1956). im Druck.

⁶ S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH und D. F. BOGDANSKI, im Druck. – B. B. BRODIE, A. PLETSCHER und P. A. SHORE, J. Pharmacol. exp. Ther. 116, 9 (1956).