

and a distance of 5 cm was kept between the lamp and samples.

Thawed samples were then analysed oscillographically and the results obtained are presented in the Table. Further, a splitting of the dimers mentioned above has been seen after a short time of additional UV-irradiation, using the same method<sup>11</sup>. Nearly complete regeneration of the original thymine monomer was noted in the alkaline solution at pH 12.0<sup>3</sup>, whilst adequate results in the case of 5-hydroxymethyluracil were obtained only in neutral solutions, as to a fairly high rate of an irreversible photolysis of 5-hydroxymethyluracil taking place in alkaline media at about pH 8.0–12.0<sup>12</sup>.

The results mentioned above have been confirmed also by the descendent paper chromatography in a solvent mixture of *n*-butanol + water (86:14).

Thus the considerably low rate of dimer conversion of 5-hydroxymethyluracil (see Table), which has been ascertained in the frozen water solution subjected to UV-light

at 2.537 Å, might be very important with regard to a possible elucidation of mechanisms involved in the eventual UV-induced damage of bacteriophage SP 8 deoxyribonucleic acid.

**Zusammenfassung.** Die UV-bewirkte Dimerisierung des Thymins und 5-Hydroxymethyluracils in gefrorenen wässrigen Lösungen wurde verglichen. Eine kleinere Dimerbildung des 5-Hydroxymethyluracils, in Desoxyribonucleinsäure vom Bakteriophag SP 8 dem Thymin substituiert, konnte die photochemischen Eigenschaften dieser Desoxyribonucleinsäure wesentlich beeinflussen.

D. KALÁB

*Research Department of Bioveta n.p., Ivanovice na Hané (Czechoslovakia), February 5, 1965.*

Dimer conversion of thymine and 5-hydroxymethyluracil (5-HMU) subjected to UV-irradiation at 2.537 Å in frozen water solution

Compound	Irradiated concentration	Time of UV-irradiation	Conversion to photo-dimer (%)
Thymine	$5 \cdot 10^{-4} M$	5 min	30%
Thymine	$10^{-3} M$	10 min	24%
Thymine	$10^{-3} M$	60 min	55%
5-HMU	$5 \cdot 10^{-4} M$	5 min	5%
5-HMU	$10^{-3} M$	10 min	6%
5-HMU	$10^{-3} M$	60 min	18%

## Die biosynthetische Inkorporation von externem $S^{35}O_2$ in Glucobrassicin

Glucobrassicin (GLUBR), ein Thioglykosid, das in Vertretern zahlreicher Gattungen der Familie Brassicaceae<sup>1</sup>, wie auch in Pflanzen der Familie Resedaceae, Cappariaceae und Tovariaceae<sup>2</sup> vorkommt, ist physiologisch interessant. Als Indolkomplex wird GLUBR mit dem Metabolismus der Auxine in den genannten Pflanzen in Zusammenhang gebracht<sup>3</sup>. Darüber hinaus ist GLUBR auch eine natürliche Vorstufe strumigen wirkender Rhodanidionen<sup>4</sup>. Die Biosynthese des GLUBR wurde bisher mit Hilfe von Tryptophan-3- $C^{14}$  untersucht, dabei wurde festgestellt, dass diese Aminosäure direkt in den Indolteil des GLUBR-Moleküls eingebaut wird<sup>5,6</sup>. Das Problem der Biosynthese der Isothiocyanatgruppe und des Sulfatesters im Molekül des GLUBR wurde sowohl mit Hilfe markierten Sulphats<sup>6</sup>, wie auch mittels Thioglukose<sup>7</sup> studiert. Wir haben  $S^{35}O_2$  angewendet, eine Verbindung deren Umsetzung in Pflanzen auch im Zusammenhang mit Industrieabgasen von besonderem Interesse ist.

Die Versuche wurden mit Blätterkohl und Blumenkohl-pflanzen durchgeführt. Die in Töpfen – die mit einer Polyäthylenfolie bis zur Pflanzenachse umhüllt waren – gezogenen Pflanzen (9 Pflanzen pro Versuchsgruppe)

wurden in einer speziellen Plexiglasskammer (Volumen 5,8 l) der  $S^{35}O_2$  enthaltenden Atmosphäre mit einer Aktivität von 1,7 mc/l ausgesetzt. Nach 6 h Inkubation wurde das  $S^{35}O_2$  abgesaugt und die Pflanzen wurden in reiner Atmosphäre unter Beleuchtung (Glühlampe 500 W) noch weitere 24 h belassen. Sie absorbierten sehr aktiv das mit der Atmosphäre gebotene  $SO_2$ . Eine Hälfte der unbeschädigten Pflanzen wurde unmittelbar für eine Dauer von 2 min in siedendes Methanol eingebracht, das die endogene Myrosinase inaktivierte und damit die Analyse des im Extrakt unzersetzten GLUBR ermöglichte<sup>5</sup>, die zweite wurde unter Beigabe von Wasser zerkleinert. Dabei spaltet die endogene Myrosinase im Homo-

<sup>1</sup> M. KUTÁČEK und K. OPLIŠTILOVÁ, *Fiziologia rastěnj* 11, 867 (1964).

<sup>2</sup> H. SCHRAUDOLF, *Exper.* 21, 520 (1965).

<sup>3</sup> M. KUTÁČEK, *Festschrift des Int. Symp.: Physiologie, Ökologie und Biochemie der Keimung*, Greifswald (1963) und *Biol. Plant.*, Praha 6, 88 (1964).

<sup>4</sup> R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, *Ann. Acad. sci. fenn. Ser. A. II*, *Chemica* 107 (1961).

<sup>5</sup> M. KUTÁČEK, Ž. PROCHÁZKA, and E. VEREŠ, *Nature* 194, 393 (1962).

<sup>6</sup> H. SCHRAUDOLF und F. BERGMANN, *Planta*, im Druck.

<sup>7</sup> V. JIRÁČEK, persönliche Mitteilung.

genat das GLUBR in seine Spaltprodukte, u.a. Rhodanid und Sulphat Ionen<sup>4</sup>. Die im Extrakt enthaltenen Verbindungen wurden mittels Papierchromatographie entweder direkt, oder nach Reinigung durch Dünnschichtchromatographie auf Silikagel G<sup>8</sup> analysiert. Die Radioaktivität der Flecke wurde im fensterlosen Methandurchflusszählrohr bestimmt.

Als Lösungsmittel für den Nachweis des GLUBR in den Extrakten dienten: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:3) und Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:7:6). Ausser der Aktivität im GLUBR-Fleck war eine bedeutende Aktivität in der Zone um den Start zu verzeichnen. Hier laufen neben anderen Verbindungen die schwefelhaltigen Aminosäuren. Das mittels Chromatographie auf Dünnschicht gereinigte GLUBR war nach der Extraktion mit Pyridin teilweise zersetzt und enthielt ausser dem eigentlichen GLUBR eine weitere S<sup>35</sup>-haltige Verbindung, die einen dem Ascorbinsäure ähnlichen aber niedrigeren Rf-Wert hat. Wir konnten uns überzeugen, dass diese Verbindung durch Zersetzung von GLUBR entsteht und zwar einerseits durch Wärme, vor allem jedoch durch eine katalytische Wirkung des Silikagels. Dagegen enthielten wässrige Pflanzenextrakte, in denen GLUBR durch Myrosinase zersetzt war, ausser Aktivität am Start (Sulphationen) auch noch markierte Rhodanidionen, die in Aufarbeitungen mit inaktivierter Myrosinase nicht nachgewiesen werden konnten.

Unsere Ergebnisse über den Einbau von SO<sub>2</sub>, welches zum erstenmal als Schwefelspender für Glukosinolat-synthese verwendet wurde, stehen in Übereinstimmung mit WETTERS<sup>9</sup>, sowie auch mit SCHRAUDOLFS<sup>6</sup> Versuchen.

Unsere Arbeit zeigt die Bedeutung von SO<sub>2</sub> im Zusammenhang mit dem Gehalt an strumigenen Stoffen in den Pflanzen der Gattung *Brassica* hin. GLUBR selbst, für

welches man annehmen kann, dass es bei bestimmten Pflanzen einen gewissen Schwefelspeicher darstellt, ist eine Vorstufe der strumigen wirkenden Rhodanidionen. Die goitrogene Wirkung der Rhodanidionen ist zwar schwächer, doch ist die Konzentration ihrer Vorstufe relativ hoch. Da SEDLÁK<sup>10</sup> durch die Zufuhr einer erhöhten Sulfatmenge in den Boden einen hoch strumigen Blätterkohl erhalten hat, muss nach den hier mitgeteilten Ergebnissen in Industriegebieten mit erhöhtem SO<sub>2</sub>-Gehalt in der Atmosphäre auch dieser Faktor zu einer Erhöhung der strumigen Eigenschaften dort angepflanzter Cruciferen führen.

**Summary.** In plants of the *Brassica oleracea* species contaminated with S<sup>35</sup>O<sub>2</sub>, incorporation of radioactive sulphur into glucosinolate glucobrassicin has been found. The label is present also in the isothiocyanate group of glucobrassicin, which by decomposition under the action of myrosinase liberates labelled thiocyanate.

M. KUTÁČEK, J. SPÁLENÝ  
und K. OPLŠTILOVÁ

*Institut für experimentelle Botanik, Abteilung für Radiobiologie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, und Institut für Landschaftsgestaltung und Landschaftsschutz der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha (Czechoslovakia), 28. Juli 1965.*

<sup>8</sup> M. KUTÁČEK and Ž. PROCHÁZKA, *Régulateurs naturels de la croissance végétale* (Gif-sur Yvette 1963), p. 445.

<sup>9</sup> L. R. WETTER, *Phytochemistry* 3, 57 (1964).

<sup>10</sup> J. SEDLÁK, *Nature* 192, 377 (1961).

## The Reticulo-Endothelial Localization of Hepatic Acetylcholinesterase

The localization of hepatic non-neuronal cholinesterases and their biological functions is obscure. Hepatic non-neuronal acetylcholinesterase has been said to be located in histiocytes<sup>1</sup> or on connective tissue fibres<sup>2</sup>. As part of a study on the enzyme histochemistry of liver metabolism acetylcholinesterase distribution was investigated in adult male Flemish giant rabbits.

After 16 h fixation in cold 4% formaldehyde-saline, liver tissue was sectioned at 16  $\mu$  on a cryostat at  $-25^{\circ}\text{C}$ . Enzyme localization was performed by a modification<sup>3</sup> of the COUPLAND and HOLMES technique<sup>4</sup>, using acetylthiocholine iodide substrate for acetylcholinesterase (AcChE) and *n*-butyrylthiocholine iodide for butyrylcholinesterase (BuChE)<sup>5</sup>. The buffer system used was 0.1 *M* 2-amino-2-(hydroxy-methyl)-propane-1:3-diol/0.1 *N* HCl. Enzyme specificity was checked by co-incubation with  $1 \cdot 10^{-5}$  *M* physostigmine<sup>6</sup>,  $1 \cdot 10^{-5}$  *M* 62C47h diiodide<sup>7</sup>, and  $2 \cdot 10^{-5}$  *M* Mipafox<sup>8</sup>. The optimum substrate pH value and incubation time for AcChE were 5.5 and 4 h, and for BuChE 5.4 and 6 h. In one group of animals the vascular pattern was outlined by perfusion with Berlin Blue in a 2% aqueous solution<sup>9</sup>. In a further group the Kupffer cells were visualized by injecting Indian ink intravenously 30 min before killing the animals.

AcChE is located in cells lining the sinusoids of (classical hexagonal) lobules (Figure). The reaction is centri-

and mid-lobular in location. The centrilobular vein wall gives a negative reaction for AcChE. The sinusoidal lining location of the AcChE positive cells is further confirmed in the Berlin Blue perfused group of experimental animals. Also, in animals receiving intravital Indian ink, AcChE activity is found closely related to the colloidal particles in phagocytic cells, further suggesting the Kupffer cell localization of AcChE. BuChE is present within hepatocytes and related to intrahepatic nerves.

Although the true biological functions of non-neuronal cholinesterases (—) are obscure, there is some suggestion as to their role at certain sites. These include ionic trans-

<sup>1</sup> M. A. GEREBTZOFF, *Cholinesterases* (Pergamon Press, London 1959), p. 8.

<sup>2</sup> S. D. SUTHERLAND, *J. Anat., Lond.* 98, 321 (1964).

<sup>3</sup> B. BALLANTYNE and R. G. BURWELL, *Nature* 206, 1123 (1965).

<sup>4</sup> R. E. COUPLAND and R. L. HOLMES, *Quart. J. micr. Sci.* 98, 327 (1957).

<sup>5</sup> G. B. KOELLE, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 100, 158 (1950).

<sup>6</sup> M. S. BURSTONE, *Enzyme Histochemistry* (Academic Press, New York and London 1962), p. 293.

<sup>7</sup> P. C. DIEGENBACH, *Nature* 207, 308 (1965).

<sup>8</sup> C. W. M. ADAMS, E. A. MARPLES, and J. R. TROUNCE, *Clin. Sci.* 19, 473 (1960).

<sup>9</sup> J. TRUETA, A. E. BARCLAY, P. M. DANIEL, K. J. FRANKLIN, and M. L. L. PRITCHARD, *Studies of the Renal Circulation* (Blackwell Scientific Publications, Oxford 1947), p. 43.