

In Table II is shown a comparison of the protective effect of AET with that of dithioerythritol (DTE), another substance shown by CLELAND⁵ to be a sulfhydryl protective agent. Higher activities were observed with AET at various times of UV-irradiation at 4°C. Other experiments showed that storage of the enzyme in an opaque container up to 24 h at 4°C in the presence of 2×10^{-4} M PLP did not result in any loss of activity and that AET did not increase the activity above the control level. However, an 87% loss of activity occurred upon standing for 24 h at room temperature with PLP alone, and only approximately 25% less was found in the presence of 8×10^{-4} M AET. Likewise, UV-irradiation for 24 h at 4°C produced an 81% loss of activity in the absence of an SH compound and only a 41% loss in 8×10^{-4} M AET. UV-irradiation of buffer solutions containing PLP, AET or PLP and AET prior to addition of enzyme had no inhibitory effect on enzyme activity.

Putting PLP ($1-2 \times 10^{-4}$ M) and AET (1×10^{-3} M) in all solutions and use of opaque containers gave good protection during various steps necessary to begin purification of GAD. The above combination also has been found by STONER⁶ to be highly effective in preventing loss of activity of a soluble preparation containing the GABA transaminase-succinic semialdehyde dehydrogenase systems from *Pseudomonas fluorescens* during extraction, lyophilization, and prolonged storage.

From spectral data, to be published elsewhere, it appears that AET itself may form a cyclic derivative with PLP or may be a nascent source of mercaptoethylamine, which forms a thiazolidine derivative with the aldehyde group of PLP⁷. From inhibition data, a thiazolidine linkage has been postulated by ROBERTS, WEIN, and SIMONSEN⁸ to exist in GAD. The sensitivity to destruction by free radicals of the added thiazolidine complex would be expected to be of the same order as that of the active site on the enzyme; and, therefore, the probability of the active site on a particular enzyme molecule being destroyed by a given concentration of free radicals might be less in the presence of a given concentration of the complex than in the presence of similar concentrations of

glutathione and pyridoxal phosphate. Perhaps the above type of mechanism could partly help to explain the superior in vivo radioprotective efficacy of AET and aminothiols, in general, when compared with sulfhydryl compounds not containing amino groups⁹.

Résumé. Le GAD du cerveau de souris, une enzyme sensible au SH, peut être purifié en présence de 2-amino-éthyl-isothiuronium-bromide (AET), une substance radioprotective. AET, qui existe en solution neutre, comme 2-mercaptoéthyl guanidine, protège les enzymes qui contiennent le SH bien mieux que les quantités isomolaires du GSH ou du dithioérythréol (Cleland's reagent). En outre, il est possible que l'AET soit une source naissante de mercaptoéthylamine qui produit un dérivatif de thiazolidine avec le groupe aldéhyde de pyridoxal phosphate qui opère indépendamment comme galeyeur. Ce mécanisme explique la qualité radioprotective supérieure de l'AET et des aminothiols in vivo en comparaison des substances qui ne contiennent pas d'amino.

E. ROBERTS, MARIA SZABO¹⁰ and B. HABER¹¹

Division of Neurosciences, City of Hope Medical Center, Duarte (California, USA), 3 January 1972.

⁵ W. W. CLELAND, *Biochemistry* 3, 480 (1963).

⁶ G. A. STONER, personal communication (1966).

⁷ M. V. BUELL and R. E. HANSEN, *J. Am. chem. Soc.* 82, 6042 (1960).

⁸ E. ROBERTS, J. WEIN and D. G. SIMONSEN, in *Vitamins and Hormones* (Eds. L. HARRIS and P. WOOL; Academic Press, New York 1964), vol. 22, p. 503.

⁹ Supported by the Institute for Advanced Learning in the Medical Sciences, City of Hope, and by PHS grants No. NB-01615 and No. MH 19502, and by a grant from the Moody Foundation of Galveston.

¹⁰ Present address: Institute of Medical Chemistry, Budapest (Hungary).

¹¹ Present address: Division of Comparative Neurobiology, Marine Biomedical Institute, Galveston (Texas 77550, USA); (Address for reprint requests).

Nachweis der Bisulfit-Addukte (α -Oxysulfonsäuren) von Carbonylverbindungen in den mit SO₂ behandelten Erbsenkeimlingen

Schwefeldioxid ist ein chemisch sehr reaktives Gas, das im Pflanzenorganismus viele metabolische Vorgänge beeinflussen kann. Es ist bekannt, dass SO₂ die Intensität der Photosynthese erniedrigt¹⁻³, unter anderem als Folge der Hydrolyse des Chlorophylls zu Phacophytin^{4,5}. Weiter beeinflusst SO₂ den Stoffwechsel der Disulfide durch deren Überführung in S-Sulfoderivate und Sulfide^{6,7}. Auch die Beeinflussung des Saccharidstoffwechsels durch SO₂ ist mehrfach bestätigt worden⁸⁻¹². Vor allem wurde eine Erniedrigung des Saccharose-Gehalts beobachtet⁹⁻¹². In unserer früheren Mitteilung¹² wurde über einen gleichzeitigen Anstieg des Alanin- sowie des Methioninsulfoxid-Gehalts und den Rückgang des Glutaminsäure-Gehalts berichtet.

SO₂ reagiert im wässrigen Milieu in vitro mit Carbonylverbindungen (Aldehyde, Ketone, Ketosäuren) unter Bildung von Bisulfit-Addukten (α -Oxysulfonsäuren). Diese Verbindungen hemmen die enzymatische Oxidation des Glykolats und Laktats^{13,14} und Glyoxal-Bisulfit hemmt die CO₂-Fixierung¹⁵. Die Entstehung dieser metabolisch aktiven Bisulfit-Addukte im Pflanzengewebe kann verschiedene Störungen des Stoffwechsels zur Folge

haben und wir haben die eventuelle Bildung dieser Stoffe in vivo, und zwar in Keimlingen, die mit SO₂ begast wurden, näher verfolgt.

¹ M. D. THOMAS, *Pl. Physiol.* 10, 291 (1935).

² G. R. HILL, *Pl. Physiol.* 12, 309 (1937).

³ H. W. de KONING und Z. JEGIER, *Atmos. Envir.* 2, 321 (1968).

⁴ W. DORRIES, *Z. PflKrankh., PflPath, PflSchutz* 42, 257 (1932).

⁵ J. MÜLLER, *Naturwissenschaften* 44, 453 (1957).

⁶ S. G. WALEY, *Biochem. J.* 71, 132 (1959).

⁷ L. BALABAJEVA und I. GANČEV, *Csika hyg.* 72, 376 (1967).

⁸ P. R. MILLER, F. W. COBB JR. und E. ZAVARIU, *Hilgardia* 39, 135 (1968).

⁹ S. BOERTITZ, *Biol. Zbl.* 83, 501 (1964).

¹⁰ I. SPÁLENÝ, F. GODIN und B. MAŘAN, 5th Int. Congr. Biochem., Moscow 1961, Abstr. Commun. 333.

¹¹ S. BOERTITZ, *Arch. Forstw.* 78, 123 (1969).

¹² J. KOŠTÍŘ, I. MACHÁČKOVÁ, V. JIRÁČEK und E. BUCHAR, *Experientia* 26, 604 (1970).

¹³ I. ZELITCH, *J. biol. Chem.* 224, 251 (1957).

¹⁴ I. ZELITCH, *Fedn. Proc.* 24, 868 (1965).

¹⁵ K. ASADA und Z. KASAI, *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 23, 66 (1961).

Gehalt der freien sowie gebundenen (in der Form der α -Oxysulfonsäuren) Carbonylverbindungen in den einzelnen Organen der Erbsenkeimlinge nach 24-, 48-, 72- und 96stündiger Einwirkung der 1%igen Schwefeldioxidatmosphäre

Zeitdauer der SO_2 -Einwirkung	Versuch	Pflanzenorgan	Gehalt der bestimmten Carbonylverbindung ($\mu\text{g/g}$ Trockengewicht)					
			Glyceraldehyd		α -Ketoglutarat		Pyruvat (+Oxalacetat)	
			frei	gebunden	frei	gebunden	frei	gebunden
24	Kontrolle	Kotyledonen	126	—	0,82	—	45	—
		Wurzeln	355	—	16,2	—	490	—
		Achsen	194	—	2,7	—	84,5	—
	SO_2 -Versuch	Kotyledonen	97,5	3,4	0,50	—	40	—
		Wurzeln	190	59	3,7	2,0	165	95,5
		Achsen	156	34	1,0	3,4	58	82,5
48	Kontrolle	Kotyledonen	75	—	0,42	—	44	—
		Wurzeln	512	—	27,0	—	440	—
		Achsen	320	—	4,8	—	94	—
	SO_2 -Versuch	Kotyledonen	156	—	0,25	—	32	—
		Wurzeln	323	82	11,2	7,6	176	106
		Achsen	216	38	1,6	6,3	70	97
72	Kontrolle	Kotyledonen	73	—	0,28	—	21,5	—
		Wurzeln	470	—	25,4	—	290	—
		Achsen	382	—	9,0	—	212	—
	SO_2 -Versuch	Kotyledonen	124	—	0,63	0,15	29	7
		Wurzeln	384	154	19,3	14,0	194	140,5
		Achsen	246	29	4,3	10,8	117	125
96	Kontrolle	Kotyledonen	101	—	0,23	—	26	—
		Wurzeln	815	—	56,2	—	610	—
		Achsen	435	—	9,3	—	186	—
	SO_2 -Versuch	Kotyledonen	113	—	0,22	—	27,5	—
		Wurzeln	332	114	11,4	8,1	240	156
		Achsen	302	33	1,2	9,0	50,5	83

Die Versuche wurden mit 15tägigen Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum* L., Sorte Orlik), die bei Licht gekeimt wurden, durchgeführt und der Gehalt an Glyceraldehyd, α -Ketoglutarat, Pyruvat (und Oxalacetat) sowie deren Bisulfit-Addukte in Kotyledonen, Wurzeln und Achsen verfolgt. Die Keimpflanzen wurden kultiviert und deren Intoxikation mit 1%iger SO_2 Atmosphäre während 24, 48, 72 und 96 h untersucht¹². Nach der Intoxikation wurden die Keimpflanzen auf Kotyledonen, Wurzeln und Achsen verteilt und diese Organe dann getrennt verarbeitet. Das Pflanzenmaterial (30 g) wurde im Porzellanmörser homogenisiert und zweimal mit je 150 ml des 50%igen Äthanol 24 h extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum bei 30°C abgedampft und der Rückstand in 1 ml des 50%igen Äthanol aufgenommen.

Die Trennung der freien sowie der als α -Oxysulfonsäuren anwesenden Ketoverbindungen ist weder mittels Papierchromatographie in verschiedenen Lösungsmittelsystemen noch mittels Hochspannungs-Papierelektrophorese gelungen¹⁶. Nur die Abtrennung der freien Carbonylverbindungen von deren Bisulfit-Addukten gelang, wobei die einzelnen Verbindungen in diesen zwei Gruppen nicht getrennt werden konnten. Darum wurde die chromatographische Trennung dieser beiden Gruppen, mit nachfolgender Überführung in die 2,4-Dinitrophenylhydrazone, und deren Trennung mittels Papierchromatographie kombiniert.

Die konzentrierten Extrakte (1 ml) wurden dann auf chromatographisches Papier Whatman Nr. 3 aufgetragen und zweimal absteigend in der Lösungsmittelmischung Dioxan-Ameisensäure (9:1, v/v) entwickelt. Auf diese Weise wurden die freien Carbonylverbindungen und Bi-

sulfit-Addukte gut getrennt. Diese Stoffgruppen wurden zweimal mit je 50 ml 50%igem Äthanol 12 h eluiert und weiter getrennt verarbeitet. Die Eluate wurden im Vakuum abgedampft, in 2ml 50%igem Äthanol aufgenommen und in 2,4-Dinitrophenylhydrazone nach einer bei uns bewährten Methode¹⁷ überführt. Zwei ml konzentriertes Eluat wurden mit 28 ml 10%iger Metaphosphorsäure und 3 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz (100 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 30 ml 2 N HCl) vermischt und nach 30 min fünfmal mit je 25 ml Äther ausgeschüttelt. Die ätherischen Extrakte, in denen die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Carbonylverbindungen enthalten sind, wurden im Vakuum bei 30°C auf 20 ml eingeeengt, dann 3 mal mit je 5 ml 5%iger Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt. In der alkalischen Schicht befanden sich nur die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Ketosäuren, während in der ätherischen Schicht Glyceraldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon und freies 2,4-Dinitrophenylhydrazin zurückblieben. Aus dem Na_2CO_3 -Extrakt wurden dann die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Ketosäuren nach dem Ansäuern mit eiskalter 16%iger H_2SO_4 dreimal mit je 10 ml Äther extrahiert. Nach Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand in 2,5 ml 0,1 N Ammoniak gelöst und 0,5 ml auf Whatman Nr. 1 aufgetragen. Dasselbe geschah mit der ätherischen Lösung des Glyceraldehyddinitrophenylhydrazons. Die chromatographische Tren-

¹⁶ I. MACHÁČKOVÁ, Dissertationschrift, Naturwiss. Fakultät, Karls-Universität, Prag 1969.

¹⁷ V. HALAMKOVÁ, Diplomarbeit, Pharmazeut. Fakultät, Komenský-Universität, Bratislava 1967.

nung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone verlief entweder in der Mischung *n*-Butylalkohol-Äthylalkohol-Wasser (4:1:5) bei aufsteigendem Entwickeln oder in der Mischung *n*-Propylalkohol-Benzol-5 *N* Ammoniak (5:2:2), wo zweimal aufsteigend entwickelt wurde. Aus dem Chromatogramm wurden die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Ketosäuren mit 1 *N* NaOH (2 mal 30 ml mit je 5 ml) extrahiert; das Dinitrophenylhydrazon des Glyceraldehyds wurde mit 96%igem Äthanol (10 ml/24 h) eluiert. Die photometrische Bestimmung der Konzentration der Ketosäuredinitrophenylhydrazone wurde bei 520 nm und diejenige des Glyceraldehyd-dinitrophenylhydrazons bei 380 nm mit dem Spektrophotometer 'Spekol ZV' (C. Zeiss, Jena, DDR) durchgeführt. Weil Oxalazetat während der Überführung in das entsprechende 2,4-Dinitrophenylhydrazon grösstenteils zum Pyruvat zersetzt wird, entsprechen die Werte für den Pyruvatgehalt dem Gesamtgehalt des Pyruvats und Oxalacetats. In der Tabelle werden die Konzentrationen ($\mu\text{g}/1\text{ g}$ Trockengewicht) der freien sowie der in Bisulfit-Addukten gebundenen Carbonylverbindungen (Glyceraldehyd, α -Ketoglutarat, Pyruvat zusammen mit Oxalacetat) in den Organen der Kontroll- sowie Versuchskeimlinge angegeben. Alle Werte sind Ergebnisse von 2 Bestimmungen.

Der Anteil der als Bisulfit-Addukte anwesenden Carbonylverbindungen im prozentualen Gesamtgehalt der entsprechenden Carbonylverbindung änderte sich nach mehr als 24stündiger Einwirkung des SO_2 nur sehr wenig. Höhere Konzentration des Glyceraldehyd-Bisulfits in den Wurzeln als in den Achsen führt zur stärkeren Störung des Saccharidstoffwechsels in den Wurzeln¹². Die sehr hohe relative Konzentration des α -Ketoglutarat-Bisulfits in den Achsen deutet auf eine bedeutende Störung des Citrat-Cyclus.

Die Entstehung der Bisulfit-Addukte aus Carbonylverbindungen und die Entnahme dieser weiteren metabolischen Umwandlungen können die Einwirkung des SO_2 auf den Saccharidstoffwechsel sowie auf denjenigen der organischen Säuren weitgehend erklären. Der Mangel an freien Ketosäuren kann auch den Gehalt einiger Aminosäuren wesentlich verändern¹³, weil nur eine verminderte Konzentration der Ketosäuren den Transaminierungsreaktionen zur Verfügung steht. Die Steuerung der Transaminierungsvorgänge durch SO_2 haben wir bereits abgeklärt und über unsere Ergebnisse wird in einer nachfolgenden Mitteilung berichtet¹⁸.

Summary. The intoxication of 15-day-old green pea seedlings with 1% gaseous SO_2 causes an important concentration fall of some free ketoacids (pyruvic, oxalacetic, α -ketoglutaric) and of glyceraldehyde in the roots and shoots. This fall is a consequence of the reaction of these carbonyl compounds with SO_2 in the plant tissue under the formation of bisulphite adducts (α -hydroxysulfonic acids), which have been chemically proved and quantitatively estimated.

V. JIRÁČEK, I. MACHÁČKOVÁ und J. KOŠTÍŘ

Biochemisches Institut der Karls-Universität,
Albertov 2030, Praha 2 (Czechoslovakia), 11. Oktober 1971.

¹⁸ V. JIRÁČEK, I. MACHÁČKOVÁ und J. KOŠTÍŘ, *Experientia* 28, 966 (1972).

Physicochemical Automaticity at a Mercury-Electrolyte Interface: Associated Electrical Potential and Impedance Changes

There is a growing interest in experimentally observable periodic membrane processes, especially in the context of the origins of rhythmic phenomena exhibited by living organisms¹. TEORELL's² classical studies on electroosmotic flow clearly demonstrated periodic oscillations of potential and volume flow across coarse membranes. Electrical potential oscillations may also be observed in an ultra-thin poly-electrolyte double membrane system under conditions of constant current injection³. These are but two examples of physicochemical automaticity, of which the passive iron wire model as a nerve analogue is perhaps the most widely known⁴. We report here on measurements made on an earlier system exhibiting rhythmic behaviour^{5,6}.

In 1873, LIPPMANN⁵ reported that when a drop of mercury is placed in dilute acid containing potassium dichromate and an iron wire is dipped into the liquid in close proximity to the drop, regular and rapid oscillations of the drop occur which may last for hours. This experiment, often referenced as OSTWALD's⁷ artificial heart, was most probably first developed in Kühne's laboratory^{6,7}. We have reproduced the experimental conditions as described by LIPPMANN and monitored 3 aspects of the electrochemical activity displayed during this phenomenon. Firstly, stainless steel electrodes were placed in the fluid surrounding the drop and the potential variations were measured by a conventional ECG amplifying system.

Secondly, the mercury drop was placed upon a stainless steel contact situated at the bottom of the recessed centre of the dish and the voltage between the drop and the iron needle dipping into the solution recorded. Finally, between these same latter two terminals, electrical impedance was also recorded. All electronic units were dc coupled and of standard design⁸. The 3 events were displayed on a high speed ultraviolet recorder⁹. In our experiments, a 6 mm mercury drop was immersed in 10 ml of a 10% nitric acid solution containing approximately 40 mg of potassium dichromate ($\approx 0.4\%$). An iron needle was secured on an

¹ A. SOLLBERGER, *Biological Rhythm Research* (Elsevier, Amsterdam 1965).

² T. TEORELL, *J. gen. Physiol.* 42, 831 (1959); *Acta physiol. scand.* 62, 293 (1964).

³ A. KATCHALSKY and R. SPANGLER, *Q. Rev. Biophys.* 7, 127 (1968).

⁴ W. OSTWALD, *Z. phys. Chem.* 35, 33 and 204 (1900). R. S. LILLIE, *Biol. Rev.* 11, 181 (1936).

⁵ G. LIPPMANN, *Annln. Phys.* 25149, 546 (1873).

⁶ H. E. HOFF, L. A. GEDDES, M. E. VALENTINUZZI and T. POWELL, *Cardiovasc. Res. Bull.*, Houston 9, 117 (1971).

⁷ W. OSTWALD, *Electrochemie* (Verlag von Veit und Co., Leipzig 1896), p. 1018.

⁸ L. A. GEDDES, H. E. HOFF, D. M. HICKMAN and A. G. MOORE, *Aerospace Med.* 33, 28 (1962).

⁹ 1508 Visicorder, Honeywell, Denver (Colorado, USA).