

nor the metabolic inhibition did per se promote phosphate extrusion because antimycin (1 µg/ml) and iodoacetate (0.1 mM) inhibited respiration and increased the intracellular concentration of P_i without stimulating P_i efflux¹¹. The effect of 3 mM iodoacetate on P_i efflux would, therefore, imply a selective alteration of P_i transport. Iodoacetate (3 mM) caused also visible alterations of epimastigotes, namely, abnormal round shapes and loss of mobility that would involve important osmotic changes in the cells.

Very little is known about ion transport in *T. cruzi* and its modification by enzyme inhibitors^{9,10}. The results described here, particularly the effect of iodoacetate, suggest that exploration of that aspect of the parasite biology might have interesting implications for the chemotherapy of infections by *T. cruzi*¹².

Zusammenfassung. Epimastigoten von *Trypanosoma cruzi* sind für Orthophosphate (P_i) relativ undurchlässig. Man kann trotzdem bei Zellen, die aus Orthophosphat armen Kulturen stammen, einen signifikanten Übertritt

von Orthophosphat ins Zellinnere messen. Bei diesen Zellen ist die Geschwindigkeit des P_i -Transportes ins Zellinnere trotz eines diesem Vorgang entgegenwirkenden Phosphat-Konzentrationsgradienten etwa 5 mal grösser als die der P_i -Abgabe aus dem Zellinnern des umgebenden Mediums. Die Durchlässigkeitsschranke für P_i wird durch 3 mM Jodoacetat zerstört.

J. F. DE BOISO¹³ and A. O. M. STOPPANI¹³

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, Buenos Aires (Argentina), 22 March 1972.

¹¹ J. F. DE BOISO and A. O. M. STOPPANI, *Revta. Soc. argent. Biol.* 46, 124 (1970).

¹² This work was supported by grants of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina), the Instituto Nacional de Farmacología, and the Wellcome Trust.

¹³ Career Investigator, Conicet.

Aktivität einiger Transaminasen in den mit SO₂ behandelten Erbsen-Keimpflanzen

In vorgehenden Mitteilungen haben wir über den Einfluss des SO₂ auf den Gehalt freier Zucker und Aminosäuren sowie Ketosäuren in Erbsen-Keimpflanzen berichtet^{1,2}. Weiter haben wir die Bildung der Bisulfit-Addukte von Carbonylverbindungen (Glyceraldehyd, α-Ketoglutarat, Pyruvat, Oxalacetat) in den mit SO₂ begasten Erbsen-Keimpflanzen bewiesen³. Durch Entstehung dieser Addukte kann die Erniedrigung des Gehalts freier Ketosäuren erklärt werden³. Zugleich erklärt diese Tatsache die Veränderung des Gehalts einiger freier Aminosäuren (Alanin, Glutaminsäure) in den Organen der mit SO₂ behandelten Erbsen-Keimpflanzen¹. Auch bei Kaninchen verursacht SO₂ eine Erniedrigung freier Aminosäuren (Threonin, Histidin, Methionin) im Blut³. Alle diese Tatsachen sprechen für die Beeinflussung der Transaminierungsvorgänge durch SO₂ in Pflanzen und wahrscheinlich auch in Tieren. Um diese Voraussetzung zu bestätigen, haben wir die Aktivität einiger Transaminasen (Glutamat-Oxalacetat- und Asparagat-Pyruvat-Transaminase) in den mit SO₂ begasten Erbsen-Keimpflanzen näher untersucht.

Die Versuche wurden mit 15tägigen grünen Erbsen-Keimpflanzen (*Pisum sativum* L., Sorte Orlik), die bei Licht gepflanzt wurden, durchgeführt. Die Kultivierung sowie Intoxikation mit 1% gasförmigem SO₂ geschah auf dieselbe Weise wie in den früheren Versuchen^{1,2}. Nach der 48stündigen Intoxikation wurden die Keimpflanzen (Kontroll- sowie Versuchspflanzen) auf Kotyledonen, Wurzeln und Achsen verteilt und diese Organe dann getrennt verarbeitet.

Die Bestimmung der Transaminase-Aktivität geschah nach einer modifizierten Methode von GREBINSKIJ et al.⁴. Das Pflanzenmaterial (5 g) wurde mit wenig Glaspulver in 30 ml eiskalten K₂HPO₄-Puffer (pH 8,0) im Porzellan-Mörser unter Kühlung im Eisbad fein homogenisiert und dann sofort in der Kühlzentrifuge (Janetzki K 14) bei 700 g 10 min zentrifugiert. Die Inkubationsmischung war wie folgt zusammengesetzt: 5 ml Enzymextrakt und 2,5 ml 0,06 M Na-Pyruvat- bzw. 0,06 M Oxallessigsäure-Lösung. Diese Mischung wurde 10 min bei 37°C unter mildem Schütteln im Dubnoff-Inkubator inkubiert, dann 2,5 ml 0,06 M Asparaginsäure bzw. 0,06 M Glutaminsäure zu-

gegeben und unter denselben Bedingungen 20 min weiter inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 96%igem Äthanol (25 ml) unterbrochen. Mit jedem Enzymextrakt wurden 3 Parallelversuche durchgeführt; in zwei weiteren Proben (ohne Zugabe von Keto- und Aminosäure) wurde der endogene Gehalt der Aminosäure bestimmt. Eine eventuelle nichtenzymatische Reaktion der Substrate wurde durch eine weitere Probe mit Äthanol-Zugabe am Beginn der Inkubation geprüft.

Nach Zugabe des Äthanols wurde der Eiweisstoff-Niederschlag abzentrifugiert und im Vakuum auf dem Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde dann in 1 ml 80%igem Äthanol gelöst und auf Whatman Nr. 1 aufgetragen und mittels zweidimensionaler Papierchromatographie getrennt^{5,6}. Die Aminosäuren wurden mittels 0,2%iger Ninhydrin-Lösung im Aceton (60°C, 10 min) sichtbar gemacht. Die Flecke des Alanins und der Asparaginsäure wurden dann ausgeschnitten und mit Methanol 3mal unter ständigem Schütteln extrahiert. In den Extrakten wurde die entsprechende Aminosäure mit Ninhydrin und Cadmium-Acetat geprüft und die Absorbanz der orange-roten Cadmium-Komplexe bei 500 nm mit 'Spekol ZV' (C. Zeiss, Jena, DDR) gemessen^{5,6}.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle angegeben. Wegen der nicht ganz befriedigenden Trennung von Asparagin- und Glutaminsäure in den Kotyledonen, wurde die Konzentration der Asparaginsäure nicht bestimmt. Die Mengen der durch die Transaminierung entstehenden Asparaginsäure bzw. des Alanins wurden als Differenz zwischen

¹ J. KOŠTÍŘ, I. MACHÁČKOVÁ, V. JIRÁČEK und E. BUCHAR, *Experientia* 26, 604 (1970).

² V. JIRÁČEK, I. MACHÁČKOVÁ und J. KOŠTÍŘ, *Experientia* 28, 1007 (1972).

³ G. BOMPART, Y. CREACH und P. LEVY, *Compt. r. Soc. biol. Paris* 167, 2297 (1967).

⁴ S. O. GREBINSKIJ, N. M. FORNIAK und M. S. GARGOLA, *Radio-biologija* 6, 631 (1966).

⁵ V. JIRÁČEK, J. KOŠTÍŘ und B. JIRÁČKOVÁ, *Sb. čsl. Akad. zeměd. věd.* 13, 165 (1967).

⁶ V. JIRÁČEK, *J. Chromat.* 33, 312 (1968).

Gehalt freier Asparaginsäure und Alanin in Erbsenkeimlingen vor und nach der Transaminierung

Pflanzenorgan	Versuch		Asparaginsäure		Alanin	
			$\mu\text{g/l g Trockengewicht}$	$\mu\text{g/l Organ}$	$\mu\text{g/l g Trockengewicht}$	$\mu\text{g/l Organ}$
Achsen	Kontrolle	A	$1212,0 \pm 144,8$	$24,24 \pm 2,90$	$610,0 \pm 70,0$	$12,20 \pm 1,40$
		B	$901,0 \pm 43,0$	$18,02 \pm 0,86$	$435,0 \pm 35,0$	$8,70 \pm 0,70$
	1% SO ₂	A	$375,0 \pm 18,3$	$6,28 \pm 0,31$	$512,5 \pm 4,2$	$8,60 \pm 0,07$
		B	$305,8 \pm 15,8$	$5,12 \pm 0,26$	$396,0 \pm 12,5$	$6,56 \pm 0,28$
Wurzeln	Kontrolle	A	$3637,0 \pm 112,5$	$109,40 \pm 3,38$	$281,2 \pm 31,2$	$8,44 \pm 0,94$
		B	$1640,0 \pm 75,0$	$49,32 \pm 2,25$	$93,7 \pm 6,2$	$2,82 \pm 0,18$
	1% SO ₂	A	$805,1 \pm 67,1$	$12,48 \pm 1,04$	$200,0 \pm 6,4$	$3,10 \pm 0,10$
		B	$383,2 \pm 60,6$	$5,94 \pm 0,94$	$154,8 \pm 12,9$	$2,40 \pm 0,20$
Kotyledonen *	Kontrolle	A	—	—	$760,0 \pm 4,4$	$71,14 \pm 0,42$
		B	—	—	$560,0 \pm 97,7$	$52,42 \pm 9,22$
	1% SO ₂	A	—	—	$585,4 \pm 32,4$	$63,60 \pm 3,56$
		B	—	—	$494,5 \pm 14,4$	$53,72 \pm 1,58$

A, Gehalt nach der Transaminierung. B, Gehalt ohne Transaminierung (endogener Gehalt). * Wegen unbefriedigender Trennung von Asparagin- und Glutaminsäure auf den Papierchromatogrammen wurde der Asparaginsäure-Gehalt nicht bestimmt.

Gesamtgehalt (nach der Transaminierung) und endogenem Gehalt (ohne Transaminierung) der entsprechenden Aminosäure berechnet.

In den Wurzeln der mit SO₂ behandelten Erbsen-Keimpflanzen ist der endogene Alanin-Gehalt angestiegen, während er in den Kotyledonen und Achsen schwach und auch der endogene Asparaginsäure-Gehalt in den Achsen und Wurzeln vergifteter Keimpflanzen signifikant gesunken ist. Die Menge der entsprechenden Aminosäure (Alanin, Asparaginsäure), die durch die Transaminierung in den Organen der Kontroll-Keimpflanzen entstanden ist, wird als 100%ige Aktivität der entsprechenden Transaminase angesehen. Nach 48-stündiger Einwirkung des SO₂ sank die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) in den Achsen um 77,8% ($P < 0,01$) und in den Wurzeln um 78,9% ($P < 0,001$). Die Aktivität der Asparagat-Pyruvat-Transaminase (APT) sank in den Achsen um 33,5% (nicht signifikant), in den Wurzeln um 76,0% ($P < 0,05$) und in den Kotyledonen um 54,5% ($P < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ursache der Störung der Transaminierungen durch SO₂ kann verschieden sein, unter anderem zum Beispiel infolge der Bildung des Bisulfit-Addukts des Pyridoxals⁷, Kofermers der Transaminasen oder Umwandlung des Cytosins zu Uracil⁸, was die Struktur der DNA, RNA und schliesslich der Enzym-Proteine verändert. Die endgültige

Erklärung dieser komplizierten Frage muss künftigen Versuchen vorbehalten werden.

Summary. Fifteen-day-old green pea seedlings were intoxicated 48 h by 1% gaseous sulphur dioxide and in their individual organs the activity of glutamate-oxalacetate (L-aspartate: 2-ketoglutarate-aminotransferase) and aspartate-pyruvate (L-alanine: oxalacetate-aminotransferase) transaminases estimated. The activity of glutamate-oxalacetate transaminase in the intoxicated seedlings was lowered in shoots by 77.8% and in roots by 78.9% as compared with the control plants. The activity of aspartate-pyruvate transaminase was lowered in shoots by 33.5%, in roots by 76% and in cotyledons by 54.5% in comparison with the control plants.

V. JIRÁČEK, I. MACHÁČKOVÁ und J. KOŠTÍŘ

Biochemisches Institut der Karls-Universität,
Albertov 2030, Praha 2 (Czechoslovakia),
27. January 1972.

⁷ I. MACHÁČKOVÁ-NITTELOVÁ, Dissertationsschrift, Naturwiss. Fak. Karls-Universität, Prag 1969.

⁸ R. SHAPIRO, R. E. SERVIS und M. WELCHER, J. Am. chem. Soc. 92, 422 (1970).

Effect of Ultrasonic Waves on the Ribonuclease Activity

The implication of RNA in growth has been demonstrated for several plant tissues¹. On the other hand the ultrasonic treatment was found to decrease the cell elongation, acting on the protein-nitrogen (PN) level^{2,3}. It was of interest to complete our previous observations and to analyse – for the lentil roots – the changes of the ribonuclease (RNase) activity, which in some way controls the endogenous RNA content⁴.

16 mm roots of *Lens culinaris* seedlings were subjected to a non-cavitating ultrasonic irradiation of 30 min at

2.4 Watt/cm², in an isotonic mannitol solution (800 kHz quartz generator⁵). The method to test the RNase activity was previously described⁶, and adapted to the present material⁷. It is based on the observed degradation of macromolecular RNA in solution, by incubation with diluted root extracts. Such degradation is displayed by the increase of optical density (OD) at 260 nm in the supernatants, after removal of the undegraded RNA by precipitation. The difference in OD between the controls and the incubated samples is taken as a measure of