

B-Cotyledons of squash seeds. The conclusions reached on the basis of the experiments on the castor bean endosperm are confirmed and generalized by the finding of a similar behaviour of some mitochondrial enzyme activities in the cotyledons of germinating squash seeds. Figure 1 shows in this material the effects of cycloheximide or of low temperature (practically no protein synthesis is detectable any more under these conditions) on the development of mitochondrial malate dehydrogenase, succinic dehydrogenase, oxalacetate-glutamate transaminase and cytochrome oxidase activities. In all cases, a significant increase of enzyme activities is observed even under the two conditions of inhibited protein synthesis. This fact is very evident during the first 24 h of germination and much less so in the following 24 h, when the rate of the increase of enzyme activities in the control cotyledons is very high.

These data suggest that a minor, but still significant fraction of the increase of the activities considered depends on the reactivation of preexisting inactive enzyme forms. As in the case of the castor bean this conclusion is confirmed by the data of Figure 2, showing that even in isolated mitochondria obtained from dry seeds a consistent increase of malate dehydrogenase, cytochrome oxidase, and transaminase is observed during the first 2–3 h of incubation. Here again the conditions of incubation are such that no detectable *in vitro* protein synthesis can occur. Moreover, no activation at all was ever observed

in mitochondria isolated from seeds germinated for 24 h or longer.

Conclusions. The present results extend to mitochondrial enzymes the phenomenon of reversible inactivation-reactivation previously reported from some soluble enzymes^{4–8}. The contribution of enzyme reactivation to the development of the enzyme pattern of early germination is quantitatively limited. However, its importance is easily understood if one considers that the beginning of rapid de novo enzyme synthesis must be conditioned by some level of metabolism supported by preexisting catalytic activities.

The molecular nature of the enzyme inactivation-reactivation process is largely obscure. The reversible transition from the active to the inactive enzyme form during maturation can be (at least in some cases) markedly speeded up by experimental dehydration^{4, 18, 19}. Moreover, the present data, together with those reported by other authors, show that some reactivation can be demonstrated in cell free systems, by simple incubation of the inactive forms in diluted solutions, without drastic treatments^{4, 6}. These data suggest that water availability (in this case as in that of the hydration-dependent control of protein synthesis in the germinating seed)²⁰ is the main factor involved in this process. The problem of the likely interactions between single enzyme and other large or small molecules remains completely open and further work on this interesting point is desirable.

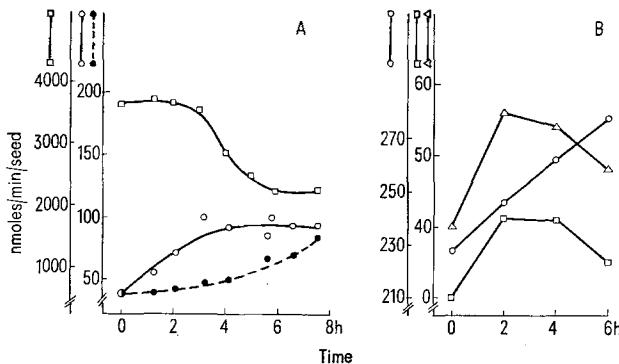


Fig. 2. *In vitro* time course of mitochondrial enzyme activities of castor bean endosperm and of squash cotyledons. The values are expressed as nmoles substrate consumed/min/seed. A) Castor bean mitochondria were extracted from dry seeds and the preparation incubated at 0°C (—●—) or at 27°C (—○—), or from seeds germinated for 60 h at 27°C and the preparations incubated at 27°C (—□—). B) Squash mitochondria were extracted from dry seeds and the preparations incubated at 30°C. —□—, glutamate-oxalacetate transaminase; —○—, malate dehydrogenase; —△—, cytochrome oxidase.

Riassunto. In semi di ricino e di zucca una frazione significativa dell'aumento di attività enzimatiche mitocondriali durante le prime 24 h di germinazione risulta insensibile a inibitori della sintesi proteica. Un significativo aumento delle stesse attività è rivelabile anche *in vitro* in preparati mitocondriali ottenuti da semi secchi.

R. COLOMBO, P. LADO, M. PRADA and F. ROLLO

Centro di studio del C.N.R. per la Biologia Cellulare e molecolare delle Piante, Istituto di Scienze Botaniche dell'Università di Milano,
Via Gius. Colombo, 60, I-20133 Milano (Italy),
14 July 1972.

¹⁸ P. LADO and M. SCHWENDIMANN, Acc. Naz. Lincei 40, 1104 (1966).

¹⁹ P. LADO, G. Bot. It. 72, 359 (1965).

²⁰ E. STURANI, S. COCCUCCI and E. MARRE, Pl. Cell Physiol., Tokyo 9, 783 (1968).

Jodidwirksamkeit auf den Wassergehalt des Lig. nuchae des Rindes als Folge anionischer Abschirmung positiver Ladungsstellen am Strukturprotein¹

Rahmenthema ist die extrazelluläre Pharmakokinetik des Jodids. Der gegenständliche Beitrag will einen kleinen Teil dieser Wirksamkeit experimentell erfassen, um für deren molekular-biologische Deutung erste Ansätze zu gewinnen. Gegenüber Chlorid scheint Jodid als effektiv (mit Wasserhülle) kleineres Anion vorzugsweise geeignet zu sein, dissozierte basische Reste der Aminosäureketten (elektropositive AS-Seitengruppen) elektrostatisch abzuschirmen. Folglich werden die salzartigen inter- und intra-

chenaren Bindungen zwischen den positiven und negativen AS-Seitengruppen geschwächt. Überwiegt, was für die meisten Proteine im biologischen pH-Bereich gültig ist, die Dissoziation der sauren Reste, und trägt demnach das Protein elektronegative Überschussladung, so bedeutet die genannte Abschirmung der nebenbei noch vorhandenen positiven Ladungsstellen (der basischen Reste der

¹ Herrn Professor Dr. Dr. Th. LEIPPERT zum 70. Geburtstag gewidmet.

AS-Ketten) eine Verstärkung des negativen interchenaren Feldes. In diesem relativ alkalischen Bereich, bezogen auf den isoelektrischen Punkt, ($\text{pH} > \text{IP}$) wird also Jodid zur verstärkten gegenseitigen Abstossung der AS-Ketten führen müssen. Für positive Überschussladung ($\text{pH} < \text{IP}$) ist folglich eine gegensätzliche Wirksamkeit des Jodids zu erwarten: Das nach Säuerung des Mediums positiv gewordene interchenare Feld wird geschwächt, die Ketten stossen sich nunmehr weniger voneinander ab. Je nachdem

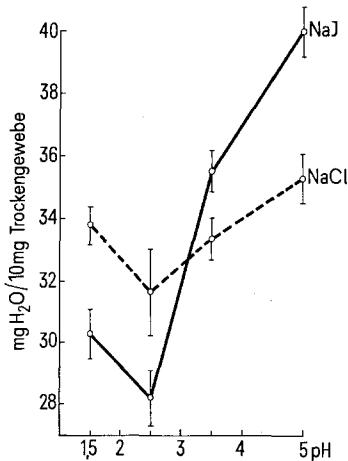


Fig. 1. Wassergehalt elastischen Gewebes (Ordinate) nach 60 min bei 5°C in 0,15 M wässriger NaCl- bzw. NaJ-Lösung bei verschieden starker Ansäuerung mit 0,15 N HCl. Im Paarvergleich der Anionen entscheidende Wirksamkeit des pH-Werts der Lösungen (Abszisse). Relative Anschwellung oder Schrumpfung oder (bei pH 3,1) Indifferenzpunkt der exponierten 40 bis 60 mg schweren Stücke des Lig. nuchae. Mittelwerte und deren mittlere Streuung.

also, ob die angewandte Salzlösung ihren pH-Wert diesseits oder jenseits vom Gewebe-IP liegen hat, wird Jodid entweder, wie üblich ($\text{pH} > \text{IP}$) zur Wasseraufnahme oder andernfalls umgekehrt zur Schrumpfung führen. In Richtung dieser Vorstellung vermerkt DEÁK² einen Zusammenhang zwischen der auf die Wasseraufnahme kollagenen Gewebes vorhandenen Wirksamkeit effektiv kleiner Anionen und deren verstärkter Adsorption am Fasermaterial. NINHAM und PARSEGIAN³ befassen sich formal mit der zugehörigen Frage, wie physiologische Salzlösungen das elektrostatische Potential an Zelloberflächen verändern. Die von GUSTAVSON⁴ zur gegenständlichen Erklärung der Ionenwirksamkeit diskutierte Rolle des Donnangleichgewichts könnte vielleicht mit der entwickelten Vorstellung einer ionalen Abschirmung präzisiert werden.

Material und Methodik. Das geschlachteten Rindern frisch entnommene Lig. nuchae wurde, um kollagene Anteile wegzulösen, jeweils 12 h lang in Aq. demin. gekocht. Zwischen 40 und 60 mg schwere Stücke des gekochten Gewebes blieben 60 min lang bei 5°C in verschiedenen Testlösungen. Den sich verändernden Wassergehalt des Gewebes erfassten Wägungen der einzelnen Stücke vor

² G. DEÁK, Acta morph. hung. 18, 249 (1970).

³ B. W. NINHAM und V. A. PARSEGIAN, J. theor. Biol. 31, 405 (1971).

⁴ K. H. GUSTAVSON, *The Chemistry and Reactivity of Collagen* (Academic Press, New York 1956), p. 155.

⁵ O. EICHLER, Handbuch der experimentellen Pharmakologie (Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1950), vol. 10, p. 85.

⁶ C. B. BADDIEL, D. CHAUDHURI und B. C. STACE, Biopolymers 10, 1169 (1971).

⁷ H. G. HERTZ und M. D. ZEIDLER, Ber. Bunsenges. 67, 774 (1963).

⁸ O. J. SAMOLOV, Discuss. Faraday Soc. 24, 141 (1957), zitiert nach G. PESCHEL und K. H. ADLFINGER, Mitt. dt. pharm. Ges. 304, 41 (1971).

Tab. I. Wirksamkeit der Anionen (a) entsprechend ihrer effektiven (einschliesslich Hydrathülle betrachteten) Grösse, gemessen als τ , bzw. entsprechend dem Schema der lytropen Reihe

a)											
pH	Na^+/Li^+	F^-	JO_3^-	CH_3COO^-	BrO_3^-	Cl^-	ClO_3^-	Br^-	ClO_4^-	J^-	SCN^-
7	Na^+	- 1,5	- 0,8	- 0,6	- 0,3	0	+ 0,5	+ 0,4	+ 1,7	+ 2,4	+ 2,6
7	Li^+	- 0,5*				0					+ 5,4
2	Na^+	+ 1,4				0		- 1,4		- 2,4	- 4,6
2	Li^+	+ 2,3*				0				- 5,2	
τ		60				10		7		4	

b)							
pH	Cl^-/F^-	Li^+	Na^+	K^+	Cs^+	NH_4^+	$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$
7	Cl^-	- 0,2	0	+ 0,1	- 0,7		0,0
7	F^-	- 0,0*	0	+ 1,3		+ 0,8	
2	Cl^-	+ 1,0	0	+ 0,5	+ 1,4	+ 0,9	
2	F^-	+ 1,9*	0	+ 1,3		+ 1,6*	+ 0,6
τ		40	30	10	4		

Irreguläre Wirksamkeit der Kationen (b). Konzentrationen 0,15 M und ausnahmsweise (*) 0,05 M. Anschwellung (+) oder Schrumpfung (-) der exponierten Präparate des Lig. nuchae bezogen auf deren Volumen in NaCl bzw. LiCl (Nullwerte in a) und in NaCl bzw. NaF (Nullwerte in b). Messungen beiderseits des IP (Lösungen: pH 7 und pH 2) und sowohl bei relativ kleinem Gegenion (Na^+ bzw. Cl^-) wie auch bei grossem Gegenion (Li^+ bzw. F^-). Werte als arithmetische Mittel aus jeweils 10 bis 30 Vergleichspaaren. Mittlere Verweilzeit der Wassermoleküle an den Ionen⁷ angegeben als τ in sec $\times 10^{-12}$ und zwar als Äquivalent der exakt metrisch nicht fassbaren Ionengrösse. Vergleichbare Äquivalente: Platzwechselselfrequenz der Wassermoleküle⁸ und elektrostatische Dichte⁵.

den Expositionen, nachher, fallweise nach zusätzlicher Vakuumtrocknung bei 10^{-3} Torr, stets aber nach zusätzlicher Eluierung der Stücke in Aq. demin. und schliesslicher Vakuumtrocknung, wobei vor den Wägungen die feuchten Stücke äusserlich mit Filterpapier getrocknet waren. Die 2malige Vakuumtrocknung diente der Bestimmung des Salzgehalts. Dieser wurde fallweise noch isotopentechnisch mit ^{22}Na - und ^{131}J -Markierungen kontrolliert. Die Werte für den Wassergehalt der Gewebe sind einheitlich auf 10 mg Trockensubstanz bezogen.

Zwecks orientierender IP-Messung des nicht homogenisierten Lig. nuchae wurde in ein U-förmig gebogenes Glasrohr das Gewebe so eingebracht und der Faserrichtung nach vorgeschoben, dass es an einer sich verjüngenden Stelle festsass. Vorbehandlungs- und Umgebungsflüssigkeit war eine mit 0,15 N HCl verschieden stark versetzte 0,15 molare NaCl-Lösung. Diese reichte nach gänzlicher Ausfüllung des verschlossenen Rohres bis in den Mittelbereich graduierter Kapillaren, von denen jede gemeinsam mit einem chlorierten Silberdraht von aussen her in die Flüssigkeit des Lumens je eines Schenkels tauchte. An den beiden Drähten des horizontal liegenden U-Rohres befanden sich 4,5 bis 54 V Gleichspannung. Der pH-Wert der Flüssigkeit, bei dem eine alternierende Polung den Meniskus in den beiden Kapillaren nicht änderte, galt als der elektroendosmotisch erfasste Gewebe-IP.

Ergebnisse und Diskussion. Rolle des pH-Werts (Figur 1). Isomolar auf NaCl bezogen, führt 0,15 M NaJ, je nach pH-Wert dieser rein wässrigen Lösungen, entweder zur Anschwellung oder zur Schrumpfung der exponierten Präparate des Lig. nuchae des Rindes. Der oben skizzierten Vorstellung entspricht nicht nur die Richtung sondern auch der Umschlagspunkt dieser Wirksamkeit. Denn mit etwa pH 3,1 liegt die Überschneidung der Kurvenzüge nahe der Stelle, wo die elektroendosmotische Messung des Gewebes in 0,15 M NaCl auch den IP finden liess (pH 2,5). Die für die untersuchte Jodidwirksamkeit jedenfalls zu postulierende relative oder absolute Negativierung des interchenaren elektrischen Feldes liesse sich aber nicht

nur einseitig elektrostatisch aus der genannten Abschirmung der positiven Ladung betreffender basischer AS-Seitengruppen erklären sondern auch aus einer vom Jodid induzierten Konformationsänderung, verbunden mit einem Hervortreten negativer (saurer) Gruppen oder umgekehrt mit einem Zurücktreten basischer Gruppen. Die Konformationsänderung selbst könnte wohl auch zu einer Änderung des Gewebevolumens führen und könnte somit den Punkt der Richtungsumkehr der Jodidwirkung verschieben, liese aber an sich unerklärt, warum überhaupt Jodid, bezogen auf Chlorid, einmal zur Wasseraufnahme und einmal zur Schrumpfung führt.

Einseitig elektrostatisch beurteilt, müsste der genannte Schnittpunkt (Figur 1) als die Stelle präzisiert werden, wo eine schwache Überschussladung an den Strukturproteinen besteht und zwar eine positive bei Chloridexposition und eine gleich schwache negative bei Jodidexposition. So gesehen, hat die Überkreuzung einen pH-Wert zwischen den nahe aneinander gelegenen IP-Werten, die das Gewebe einerseits für das in der Umgebungslösung enthaltene NaCl und andererseits für das NaJ zeigt.

Rolle der Konzentration (Figur 2). Bei pH 2 isomolar auf NaCl bezogen, führt NaJ, in niedriger wässriger Konzentration angewandt, zur Schrumpfung des elastischen Gewebes, ab etwa 0,7 M hingegen zur Wasseraufnahme. Dieser alternierende Befund im elektropositiven Grenzbereich der Faserproteine bestätigt die gedankliche Basis der Prüfung. Zwar sind hier einseitig die Anionen betrachtet, doch lässt vielleicht die noch darzustellende relative Unwirksamkeit der Kationen (Tabelle b) eine solche Beobachtung als näherungsweise zulässig erscheinen. Für den Kreuzungspunkt der beiden Kurvenzüge kann aber jedenfalls ausgesagt werden, dass einerseits NaCl den bei pH 2 vorhandenen elektropositiven Überschuss an den AS-Ketten nicht gänzlich beseitigt, und dass andererseits NaJ zur bereits effektiven Negativierung führt. Diese Negativierung ist im Kreuzungspunkt offenbar gleich gross wie die vom NaCl belassene positive Überschussladung.

Vergleich der Wirksamkeit innerhalb der Anionenreihe (Tabelle a). Je effektiv (einschliesslich Hydrathülle) grösser das einwertige Anion von Salzlösungen mit einheitlichem Kation ist, bzw. je längerdauernd die Wassermoleküle an den Ionen verbleiben (je stärker τ anwächst), desto weniger gequollen zeigt sich das exponierte elastische Gewebe bei pH 7 und desto mehr gequollen bei pH 2. So gilt, erweitert auf die gesamte lyotrope Anionenreihe nach Hofmeister, der oben für den NaJ/NaCl-Vergleich beschriebene Gegensatz der Wirkungsrichtungen, je nachdem, ob die Salzlösung ihren pH-Wert diesseits oder jenseits vom IP des Gewebes liegen hat. Erwartungsgemäss verstärken sich sowohl Anschwellung wie auch Schrumpfung des Gewebes, wenn nicht Na^+ der Partner des einwirkenden Anions ist sondern das extrem grosse Li^+ . Überdies bedeutet die mit 0,05 M kleinere Salzkonzentration bei der Messung der Vergleichspaaire LiF/LiCl, $\text{NH}_4\text{F}/\text{NaF}$ und LiF/NaF eine relativ etwas zu schwache Wirksamkeit dieser (teils sehr schlecht löslichen) Verbindungen gegenüber sonst (bei 0,15 M) betrachteten Salzen.

Reihe der Kationen (Tabelle b). Der Befund einer der Hofmeister'schen Reihe nicht folgenden und wenig ausgeprägten Wirksamkeit der Kationen beruht vielleicht auf geringer Zugänglichkeit der negativen Ladungsstellen am Strukturprotein (große Hydrathülle der Carboxylgruppe), so dass übrige und an sich nur schwach wirksame Mechanismen nunmehr hervortreten. Bei EICHLER⁵ finden sich bereits Überlegungen, warum die lyotropen Eigenschaften der Kationen von denen der Anionen abweichen. Infrarotspektren und magnetische Kernresonanzspektren bestätigen in Modellsystemen die vermutete wasseran-

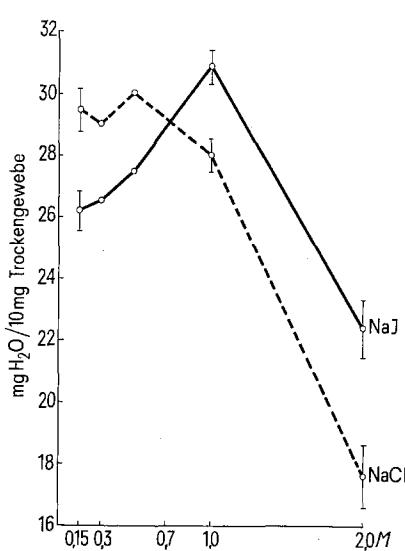


Fig. 2. Wassergehalt elastischen Gewebes (Ordinate) nach 60 min bei 5°C in einheitlich (mit HCl) auf pH 2 gebrachte Lösung verschiedener wässriger NaCl- und NaJ-Konzentrationen (Abszisse). Isomolar auf Cl^- bezogen, entwässert J^- bei niedriger Salzkonzentration das Gewebe und wirkt ab $\sim 0,7 \text{ M}$ anschwellend (Überschneidung der Kurvenzüge bei $\sim 0,7 \text{ M}$). Mittelwerte und deren mittlere Streuung.

ziehende Kraft der Carboxylgruppen in den Aminosäureketten, wobei die Nachbarschaft hydrophober Gruppen verstärkend wirkt⁵. Das oben beschriebene reguläre Verhalten der Anionen wäre sinngemäß mit deren Möglichkeit erklärbar, sich den weniger hydratisierten positiven Ladungsstellen (Ammoniumgruppen) genügend zu nähern, um sie elektrostatisch abschirmen zu können.

Summary. Taking the effect of NaCl as a basis, isomolar NaJ leads either to swelling or shrinking of elastic tissue dependent on salt concentration and pH of the aqueous

medium. Close to the isoelectric point, the effect turns in the opposite direction. Corresponding to Hofmeister's lyotropic series, the same inversion also applies to the other monovalent anions measured at pH 7 and 2.

H. HELLAUER und R. WINKLER

Physiologische Abteilung, Paracelsus Institut,
Parkstrasse 10, A-4540 Bad Hall, (Oesterreich),
17. Juli 1971.

Relationship Between the Ion-Equilibrium Constants and the Sulphur and Magnesium Contents of Plants

According to our analytical investigations, a mathematical relationship was found between the different anion and cation equilibrium constants of plants. After HOLST's¹ equation for the calculation of ion-equilibrium constants (i), the ion-equivalents of 4 macro anions and of 4 macro cations was enough:

$$i = \frac{\Sigma^- - \Sigma^+}{2(\Sigma^- + \Sigma^+)} \\ \Sigma^- = \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{PO}_4^- + 1/2 \text{SO}_4^{2-} + \text{Cl}^- \\ \Sigma^+ = \text{K}^+ + 1/2 \text{Ca}^{2+} + 1/2 \text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$$

The magnesium requirement of plants was better characterized with the aid of magnesium coefficients (z) than the percentage of their content. The coefficient is a quotient between the magnesium content and total cations.

$$z = \frac{\text{Mg}}{\Sigma^+}$$

The relationship between magnesium coefficients and the ion-equilibrium constants varied with the sulphur content, or to be more exact with the quotient of sulphur and magnesium content. It follows as a consequence

that there is a possibility of establishing 3 equations in accordance with the 3 groups of the plants:

$$z = i^2 + 0.1 \quad \text{when } \text{S/Mg} > 1 \\ z = 4.i^2 + 0.1 \quad \text{when } \text{S/Mg} = 0.7 - 1.0 \\ z = 17.i^2 + 0.1 \quad \text{when } \text{S/Mg} < 0.7$$

According to our results the culture plants can be distributed into the following 3 groups: sulphophil, normal and magnesiophil respectively.

Zusammenfassung. Unter der Ionengleichgewichtsberechnung von HOLST wurde eine annähernd mathematische Beziehung zwischen dem Magnesiumbedarf einer Pflanze und dem Quotienten aus Schwefel- und Magnesiumgehalt des Pflanzenmaterials ermittelt.

S. A. KISS

Borsodi Vegyi Kombinát, Kazincbarcika (Hungary),
6 March 1972.

¹ G. HOLST, Angew. Bot. 40, 97 (1966).

Intestinal Monosaccharide Transport in Experimental Protein Deprivation

Disturbances of intestinal sugar absorption are common in protein-calorie malnutrition, particularly in childhood¹, and it has been suggested that protein depletion per se damages the absorptive mechanisms of the gut². The present study investigates whether intestinal monosaccharide absorption in protein depleted rats differs from that of normal rats.

Weanling, female Wistar rats weighing 80–90 g were selected randomly for feeding ad libitum with a normal diet or a low-protein diet³ for up to 40 days. The protein content of the normal diet was 8% (NDP Cal%) and of the deficient diet was 5%⁴.

Solutions used were based on KREBS-HENSELEIT⁵ bicarbonate buffer and contained the following substrates: 4.3% D-glucose, 5.05% D-fructose or 4.63% 3-O-methyl glucose. Intestinal transport was measured by disappearance of substrate from the lumen of the gut using an in vivo closed loop technique⁶. Polyethylene glycol was used as a non-absorbable marker⁷. D-glucose was measured by a glucose oxidase method⁸, D-fructose by Roe's method⁹ and 3-O-methyl glucose according to

HSIA and INOWYE¹⁰. Results are expressed as µmoles of substrate/mg intestinal mucosa /h.

D-glucose transport was significantly increased in the protein-depleted animals at 10, 20, 30 and 40 days after commencement of the feeding experiments but no significant alteration of D-fructose transport occurred. (Table I). There was no significant alteration in intestinal transport of 3-O-methyl glucose when measured at 30 days (normal = 7.2 ± 2.0, protein depleted = 7.7 ± 3.4, $p > 0.8$).

As in previous studies^{11,12}, protein deprivation caused structural changes in the epithelium of the small bowel. The wall of the small intestine was consistently thinner in protein-depleted animals and the mucosal wet weight was significantly reduced (Table II).

These results indicate that experimental dietary protein deprivation causes increased intestinal transport of D-glucose. This is probably because of alteration of intracellular metabolism since there was no effect on the absorption of the non-metabolized sugar, 3-O-methyl glucose. The lack of effect on D-fructose may be due to