at pH=6	41% PO [⊖] in equ. with free K [⊖] -ions,
	18% PO [⊖] bound to K [⊖] -ions,
	41% PO [⊖] bound to H [⊖] -ions;
at pH=5	6% PO [⊖] in equ. with free K [⊖] -ions,
	0,6% PO [⊖] bound to K [⊖] -ions,
	94% PO [⊖] bound to H [⊖] -ions.

From the comparison of these ion concentrations it is evident that the pump can only work in the small pH range from pH=8 down to pH=4,5 (range of regulation), because only in this pH range an exchange between K[⊖] and H[⊖] is possible. At pH values smaller than 4,5 there exist only HPO-groups on the inner thylacoid surface, at pH values greater than 8 there are only K[⊖]-ions in equilibrium with

the fixed inner PO[⊖]-groups. Such a pH dependence of the active proton transport was recently found by RUMBERG et al.⁵. With rising H[⊖]-concentration in the inner water phase of the thylacoid the pump is slowed down because of the 5 times greater energy requirement for the liberation of H[⊖] instead of K[⊖] from the inner PO[⊖]-group. Thus the proton pump postulated in this paper is a self-regulating system that depends on the inner pH.

For stimulating discussions I am indebted to Prof. H. T. WITT, Dr. H. RÜPPEL and Dr. W. JUNGE. Many thanks also to Miss G. HOFFMANN for drawing the pictures.

Zur alkylierenden Wirkung von Trichlorphon in Warmblütern

I. Untersuchungen in vitro in Humanserum mit ¹⁴C-Trichlorphon

WOLFGANG DEDEK und KARLHEINZ LOHS *

Institut für Biophysik der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch,
Abteilung Chemische Toxikologie, Leipzig

(Z. Naturforsch. **25 b**, 94—96 [1970]; eingegangen am 28. August 1969)

¹⁴C-Trichlorphon (¹⁴CH₃O-markiert) wurde mit Humanserum 3 h bei 37,5 °C inkubiert. Das gefällte Protein wurde hydrolysiert und die Aminosäuren getrennt. Im Eluat sind mindestens 3 scharfe Maxima der ¹⁴C-Aktivität vorhanden. Es wird angenommen, daß Methylierungs-Reaktionen an definierten Substraten einen wesentlichen Bestandteil der komplexen Wirkung toxischer Organophosphor-Verbindungen darstellen.

Zahlreiche Organophosphor-Verbindungen (OPV) besitzen stark alkylierende Eigenschaften, die für die präparative Chemie ausgenutzt werden können¹. Auch insektizid wirksame OPV zeigen derartige alkylierende Eigenschaften, die in biologischen Systemen die Bildung der entsprechenden Desalkyl-Verbindungen bewirken¹. Im allgemeinen ist die alkylierende Wirkung bei den Methylestern der Phosphor-, Thiophosphor- oder Phosphonsäure am stärksten ausgeprägt.

Die Bildung von Desmethyl-OPV wurde von zahlreichen Autoren bei unterschiedlichen insektizid wirksamen OPV festgestellt^{1, 2}. Die Frage nach den

in biologischen Systemen wirksamen Acceptoren für die Methylgruppe wurde bisher nur am Beispiel des Trichlorphons (*O,O*-Dimethyl-(1-hydroxy-2,2,2-trichloräthyl)-phosphonat) näher untersucht; HASSAN, ZAYED et al.³⁻⁷ nehmen an, daß als primäres Reaktionsprodukt Methanol entsteht, das im Stoffwechsel weiter zu CO₂ oxydiert wird. Der Anteil der Spaltung der PO—CH₃-Bindung am Metabolismus des Trichlorphons ist unterschiedlich groß; in Mikroorganismen wird dieser Abbauweg bevorzugt⁶, während er in Warmblütern nur eine weniger häufige Spaltung neben anderen Abbaureaktionen darstellt⁷. Unter Verwendung von ¹⁴C—CH₃O-mar-

* Anschrift der Verfasser: Dr. rer. nat. habil. W. DEDEK und Prof. Dr. habil. KH. LOHS, X 705 Leipzig, Permoserstr. 15.

¹ G. SCHRADER, Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester, Monographie, Verlag Chemie, Weinheim 1963.

² G. KÜHN, KH. LOHS u. G. W. FISCHER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **300**, 363 [1967].

³ A. HASSAN u. S. M. A. D. ZAYED, Canad. J. Biochem. **43**, 1271 [1965].

⁴ A. HASSAN, S. M. A. D. ZAYED, and F. M. ABDEL-HAMID, Biochem. Pharmacol. **14**, 1577 [1965].

⁵ A. HASSAN, S. M. A. D. ZAYED, and I. Y. MOSTAFA, Z. Naturforsch. **21 b**, 498 [1966].

⁶ S. M. A. D. ZAYED, I. Y. MOSTAFA u. A. HASSAN, Arch. Mikrobiol. **51**, 118 [1965].

⁷ S. M. A. D. ZAYED, A. HASSAN u. I. Y. MOSTAFA, Isotopenpraxis **3**, 414 [1967].

kiertem Trichlorphon fanden HASSAN et al.³, daß nach i.p.-Injektion an der Ratte 28% des eingesetzten ^{14}C als $^{14}\text{CO}_2$ nach 24 h in der Atemluft ausgeschieden wurden; im Urin konnten durch Isotopenverdünnungs-Analyse 2–4% des ^{14}C als Formiat (neben 20–24% Dimethylphosphat) nachgewiesen werden (in neuesten Arbeiten über die Kinetik des Methanolumsatzes⁸ wird die Halbwertszeit der Zwischenprodukte der Methanolyxidation mit max. 1 min für Formaldehyd und 12 min (Ratte) bzw. 55 min (Mensch) für Ameisensäure angegeben). Deshalb ist die Bildung von Methanol als Metabolit beim Abbau von Methylestern der Phosphorsäuren vorläufig nur indirekt nachweisbar.

Von SCHRADER^{9, 10} und anderen Autoren¹¹ wurde bereits früher vermutet, daß als Acceptor für die Methylgruppe auch SH -, NH_2 - und OH -Gruppen von Enzymen in Frage kommen; diese Methylierungs-Reaktionen dürften neben den gleichzeitig ablaufenden Phosphorylierungen von Enzymsystemen für das komplexe Bild der akut toxischen Wirkungen biologisch aktiver OPV wesentlich sein. Zur Klärung dieser Frage wurden die hier beschriebenen Untersuchungen begonnen. Darüber hinaus sind die Methylierungseigenschaften der in Frage kommenden OPV für die Erklärung mutagener und canzerogener Effekte von besonderem Interesse¹².

Material und Methoden

Radioaktiv markiertes Trichlorphon¹³ (^{32}P -markiert und ^{14}C - CH_3O -markiert) wurde in vitro mit Rinderserum bei $37,5^\circ$ inkubiert; Trennung der Metaboliten durch DC (Kieselgel G (Merck), Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 50 : 50$, Standardbedingungen¹⁴), aufgetragen wurden je 10 μl Serum.

Zur Untersuchung der an hochmolekularen Substanzen lokalisierten ^{14}C -Aktivität wurde ^{14}C - CH_3O -markiertes Trichlorphon mit Humanserum 3 h bei $37,5^\circ\text{C}$ inkubiert (Dosis 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und das gefällte Protein durch intensive Dialyse sorgfältig von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Nach 24 h Hydrolyse mit 6-n. HCl wurden die Aminosäuren im Aminosäuren-Analysator am Ionenaustauscher getrennt*. Jeweils

1 Fraktion/min wurde abgetrennt und die ^{14}C -Aktivität in einem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer bestimmt**.

Ergebnisse und Diskussion

Trennt man die Metaboliten des Trichlorphons nach Inkubation in Serum mit einem stark polaren Laufmittel, so erhält man folgende Ergebnisse¹³. Neben (Trichlorphon + *DDVP*) und Dimethylphosphat tritt ein mit der Zeit stark zunehmender Metabolit auf, der als Desmethyl-Trichlorphon identifiziert werden konnte¹³. Die am Startpunkt lokalisierte Aktivität nimmt sowohl beim ^{32}P - als auch beim ^{14}C -markierten Trichlorphon ständig zu; vermutlich stammt diese Aktivität von den an hochmolekularen Substanzen stattfindenden Phosphorylierungen (^{32}P)- bzw. Methylierungs-Reaktionen (^{14}C). Zur weiteren Identifizierung dieser ^{14}C -Aktivität wurden die Aminosäuren der Serumproteine ge-

Abb. 1. ^{14}C -Aktivität der Aminosäuren-Fractionen nach Trennung der hydrolysierten Serumproteine im Aminosäuren-Analysator.

⁸ N. RIETBROCK, Vortrag Pharmakologenkongreß, Düsseldorf 1968; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **263**, im Druck.

⁹ G. SCHRADER, Z. Naturforsch. **18b**, 965 [1963].

¹⁰ G. SCHRADER, Vortrag VI. Internationaler Pflanzenschutzkongreß Wien 1967, publ. in: Pflanzenschutzberichte [Wien] **36**, Sonderheft [1967], S. 26.

¹¹ W. DEDEK u. H. SCHWARZ, Atompraxis **12**, 603 [1966].

¹² W. GIBEL u. KH. LOHS, Arch. Geschwulstforsch., im Druck.

¹³ W. DEDEK, Habilitationsschrift, Leipzig 1966.

¹⁴ E. STAHL, Z. analyt. Chem. **234**, 1 [1968]; W. FRESSENIUS u. E. STAHL, **234**, 11 [1968].

* Herrn Dr. MÜLLER und Herrn Chem.-Ing. DETMER, Institut für Biophysik, Berlin-Buch, danken wir für die Durchführung der Aminosäuren-Trennung.

** Herrn Dr. WANGERMANN, Robert-Rössle-Klinik, Berlin-Buch, danken wir für die Durchführung der Aktivitätsmessungen.

trennt und die ^{14}C -Aktivität der Fraktionen bestimmt, wie unter 1 beschrieben. Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß sowohl im Eluat der basischen als auch der sauren und neutralen Aminosäuren insgesamt mindestens 3 scharfe Maxima der ^{14}C -Aktivität über einem diffusen Untergrund von ca. 15 Ipm auftreten. Der ^{14}C -Gehalt des Aminosäurehydrolysats betrug ca. 15% der im Trichlorphon eingesetzten ^{14}C -Aktivität.

Auf Grund unserer Arbeitshypothese sollten diese Maxima ^{14}C -methylierten definierten Acceptoren zugeordnet werden; als solche wären demzufolge Hydrolyseprodukte hochmolekularer Serumbestandteile, d. h. in erster Linie Aminosäuren zu betrachten. Da uns methylierte Vergleichssubstanzen vorerst nicht zur Verfügung stehen, kann über die mögliche Struktur der ^{14}C -markierten Abbauprodukte noch nichts ausgesagt werden.

Die Wirkung hoher Salzkonzentration auf die Permeabilität der pflanzlichen Zellmembran

JOSEF WEIGL

Botanisches Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

(Z. Naturforsch. 25 b, 96—100 [1970]; eingegangen am 16. Oktober 1969)

Using the device of Fig. 1 (this paper and l. c.³) efflux of Cl^- across the plasma membrane of root cortex cells was found to increase with increasing external concentration of various salts. We conclude that non-specific (passive) plasma membrane permeability(!) to anions increases with increasing external concentration of salts. As a primary result passive efflux of anions, which is downhill in the electrical gradient, increases.

Efflux of Rb^+ across the plasma membrane is only slightly stimulated by external KCl and is inhibited by Ca^{2+} .

The decrease in electrical potential with increasing external salt concentration is a consequence of the increase in passive plasma membrane permeability to anions.

Interaction of salts with charged groups of the plasma membrane is not unlikely to be the reason for the increase of the permeability to anions and for the multiple hyperbolic influx isotherm observed at high external concentrations (1—100 mM). We want to emphasize that a multiple hyperbolic isotherm may be considered a feature of *passive* ion movement across a barrier of different charged groups.

Es muß erwartet werden, daß Ionen bei der Permeation durch Membranen in Wechselwirkung mit den geladenen Komponenten der Membranen treten. Fixe Einlagerungen von geladenen Gruppen können Donnan-Phänomene hervorrufen, bewegliche Gruppen können als Austauschträger wirken. Das Prinzip der Austauschdiffusion von Ionen (USSING¹) scheint an tierischen Objekten verwirklicht zu sein. Daß dieses Problem jedoch nicht abgeklärt ist, kann man aus einer Arbeit von KEYNES² entnehmen.

Das Studium der Permeationsmechanismen an pflanzlichen Zellen ist schwieriger, da die pflanzliche Zelle einem aus zwei ineinandergeschachtelten, ungleich großen Zellen gebildeten Systeme gleicht (PFEFFER). Der Efflux von Ionen aus der Pflanzenzelle wird schon nach einer kurzen Anfangsphase

durch das innere Membransystem, den Tonoplasten, limitiert. Es ist somit schwer, einen Einfluß externer Salze eindeutig als direkte Stimulierung des Efflux zu erkennen. Wir haben den Versuch unternommen, durch folgende experimentelle Anordnung eine Bearbeitung des Problems zu erreichen: Wenn man eine abgeschnittene Wurzel in eine Trennwand zwischen zwei Außenräume einspannt (Abb. 1), dann kann man zwei Effluxkomponenten studieren:

1. den Efflux aus den Rindenzellen ins Milieu der Rinde (Flux 2, Abb. 1),
2. den Efflux über das Xylem in den benachbarten Raum (Flux 3, Abb. 1).

Bei dieser Versuchsanordnung besteht die Hoffnung, einen direkten Effekt externer Salze auf den

¹ H. H. USSING, Physiol. Rev. 29, 127 [1949].

² R. D. KEYNES, in: Ion transport in excitable cells, Symposium on Biophysics and Physiology of Biological Transport, Springer-Verlag, Wien-New York 1967.