

lytic activity with increasing distance between $-OAc$ and $-NMe_3$ functions beyond that of a single $-CH_2CH_2-$ unit.

Recent pharmacological data for these muscarine derivatives^{6,7} show that the muscarines are quite stereospecific in their actions on a diversity of pharmacological preparations, whereas the muscarones are not. This parallels the present findings that the enzyme responds *in vitro* more sensitively to stereochemical differences in the muscarine than in the muscarone series. In contrast to this parallel, the muscarones are much more active in stimulating smooth muscle⁷ and with respect to intrinsic nicotinic power^{6,7} than are the muscarines.

The examination of Stuart-Briegleb models of the muscarine isomers leads to one interesting possibility for differentiation. In the natural series as compared with *allo*, there appears to be a closer approach to coplanarity of the hetero ring with both the quaternary N and hydroxyl O atoms, which could in turn lead to additional binding strength in the muscarines if the ring (through its high electron-density locus) supplements the normal bifunctional⁸ binding through the two polar groups. This would imply that the subtle changes in AChE binding strengths observed for these compounds are the result of the net steric influences on 3-pointed binding afforded by the three substituted ring positions, and directly mirrors the corresponding conclusions of WASER⁶ regarding the geometry of interactions with the cholinergic receptor.

B. WITKOP*, R. C. DURANT**, and S. L. FRIESS**

National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases,
National Institutes of Health* and Naval Medical Research Institute**, Bethesda (Md.), April 28, 1959.

Zusammenfassung

Die Anticholinesterase-Wirkung von synthetischem D,L-Muscarin und weiteren 9 Derivaten wurde an einem hochgereinigten, aus *Electrophorus electricus* gewonnenen Enzympräparat durch Titration bei konstantem pH ermittelt. Als wirksamster Hemmstoff erwies sich O-Acetyl-D,L-muscarin, das als Substrat ungeeignet ist. Die enzymatischen werden mit den pharmakologischen Befunden verglichen.

⁶ P. G. WASER, Exper. 14, 356 (1958).

⁷ L. GYERMEK and K. R. UNNA, paper presented to the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Aug. 25, 1958, Ann Arbor (Mich.).

⁸ D. NACHMANSOHN and I. B. WILSON, Adv. Enzymol. 12, 259 (1951).

Preliminary Note on Certain Pharmacological Properties of 3 β ,16 α -Dihydroxyallopregnan-20-one

Recently 3 β ,16 α -dihydroxyallopregnan-20-one has been isolated from hog adrenals (NEHER, DESAULLES, VISCHER, WIELAND, and WETTSTEIN¹) as well as from the urine in certain human cases of adreno-genital syndrome of the salt-losing type (NEHER, MEYSTRE, WETTSTEIN²). As it could be supposed that this compound might be

responsible for the augmented salt loss observed in this type of syndrome (WILKINS and LEWIS³, KLEIN *et al.*⁴), we first studied its effects in water and salt metabolism. The present note is intended to give an account on this particular aspect of its action.

Methods. All experiments were performed on adrenalectomized rats of the same breed, in order to avoid strain-bound differences in sensitivity. The method used has been described in detail elsewhere (DESAULLES and MEIER⁵), the only difference being that instead of collecting urine from the 4–6th h after treatment and salt loading (I), we collected it immediately after loading and treatment for 4 h consecutively (II) (Fig. 1).

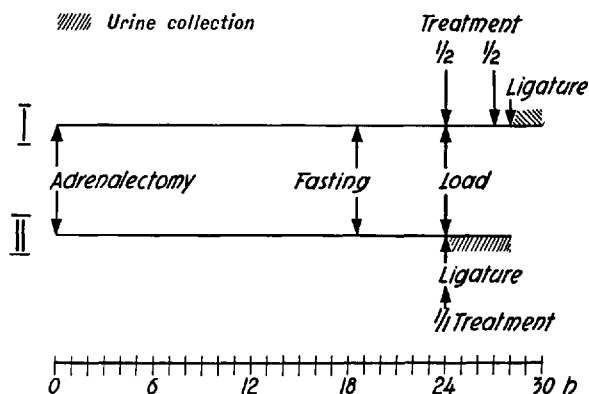


Fig. 1.—Diagrams of the experimental procedure.

The substance to be tested was given by intramuscular injection in a dose-range varying from 0.2 to 25 $\mu\text{g/kg}$.

Experimental results involve a collective of over 550 rats. We have compared the sodium excretion of treated animals with that of untreated control animals studied simultaneously (Fig. 2).

Sodium excretion in control animals varies over a wide range and shows a typical one-tailed form of distribution characteristic for our animal colony. Nevertheless, most of the individual values obtained are smaller than 6.0 $\text{mg}\%/4\text{h}$. The mean value amounts to 4.82 $\text{mg}\%/4\text{h}$.

Treatment with 3 β ,16 α -dihydroxyallopregnan-20-one enhances sodium excretion. The mean values of the treated groups rise moderately at the 0.2 $\mu\text{g/kg}$ dose level (mean amounting to 7.89 $\text{mg}\%/4\text{h}$) and attain maximal intensity at a dosage of 1.0 $\mu\text{g/kg}$ (mean amounting to 9.38 $\text{mg}\%/4\text{h}$). Higher dose levels of the substance cause no further increase in sodium excretion, the mean for which remains practically at the same level as that produced by the injection of 1.0 $\mu\text{g/kg}$ of the substance.

When the individual values are examined, it will be seen that they are more evenly distributed: the total number of high sodium values increases consistently, while the number of low excretion values diminishes but does not disappear completely, about one-third of the animals showing no effect on sodium excretion following treatment with even the highest dosage. 3 β ,16 α -dihydroxyallopregnan-20-one does not significantly affect

³ L. WILKINS and R. A. LEWIS, Trans. 17th Meet. Conf. on Metab. Aspects of Convalescence (J. Macy Jr. Found., New York 1948), p. 168.

⁴ R. KLEIN, P. TAYLOR, C. PAPADATOS, Z. LARON, D. KEELE, J. FORTUNATO, C. BYERS, and C. BILLINGS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 863 (1958).

⁵ P. DESAULLES and R. MEIER, Schw. Med. Wschr. 86, 1060 (1956).

¹ R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND, and A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 61, 1667 (1958).

² R. NEHER, CH. MEYSTRE, and A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 62, 132 (1959).

the urinary volume and potassium excretion of the rats in this kind of experiment of short duration.

The complex type of response elicited leads us to think that we are probably dealing with only one of the many factors involved in this type of sodium excretion and that one or other factors prevent or inhibit this response in a certain percentage of animals even in a seemingly identical setup.

According to statistical analysis⁶, treated groups show a normal distribution type, whereas control values, on the other hand, show high skew distribution. To compare data from controls and treated groups, medians and their 95 confidence limits have therefore been used. As is apparent from the Table, the confidence limits of all the treated groups do not overlap the confidence limits of the controls. It may be concluded from this that any of the treated groups differ significantly from the control groups, at least at a 95% level of significance.

Doses μg/kg	Number of animals	Medians	95% Confidence limits
Controls	339	2.9	2.6– 3.7
0.2	65	7.7	4.3–10.6
1.0	53	9.2	8.1–11.7
5.0	54	8.5	6.2–10.2
25.0	55	9.0	6.0–11.7

When a non-parametric test of significance is applied to the results yielded by treatment with a dose of 1.0 μg/kg producing the effect of greatest intensity, it is apparent that the median for the treated group is very significantly larger than the median for control animals ($p < 0.001$).

In conclusion, small doses of 3β,16α-dihydroxyallopregnan-20-one have an ability to induce sodium excretion in adrenalectomised, sodium-loaded rats which cannot at present easily be compared with the effects of other sodium-mobilising substances. The fact that only a proportion of about 70% of animals respond to treatment means that large groups of animals have to be used

⁶ I wish to thank Mrs. H. SYLWESTROWICZ (statistician CIBA Laboratories, Summit N.J.) for her very valuable help in doing the statistical analysis of the experimental results.

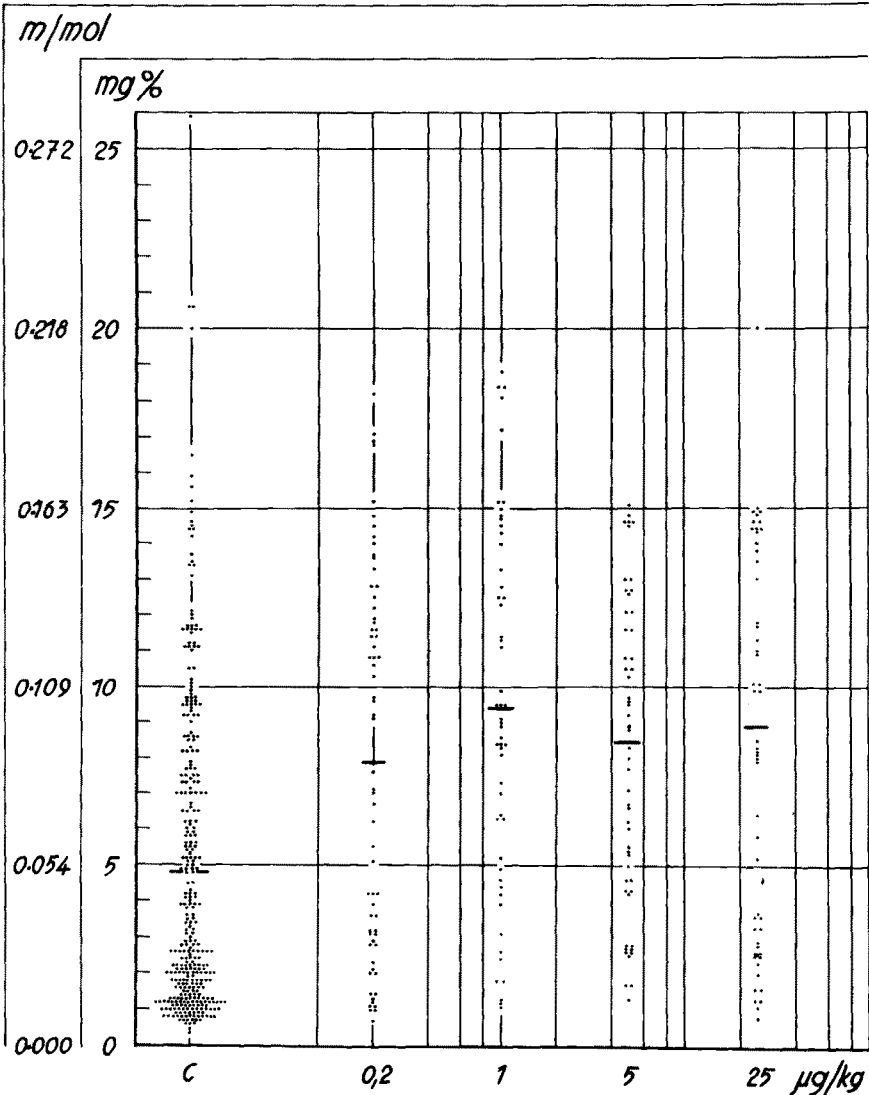


Fig. 2.—Urinary sodium excretion in comparison to controls. Abscissa: Dosis of 3β,16α-dihydroxyallopregnan-20-one in μg. Ordinate: Quantity of sodium excreted. Each dot represents one animal.

in order to demonstrate its effects. The nature and cause of the lack of sensitivity shown by a proportion of the experimental animals is under study, as well as the way in which the sodium-mobilisation occurs.

Acknowledgement. I should like to express my thanks to Mr. H. D. PHILIPS (M. A. Cantab.) for his kind assistance in the preparation of the English text of this paper.

P. A. DESAULLES

Research Laboratories of the Pharmaceutical Department of CIBA Limited, Basle (Switzerland), June 5, 1959.

Zusammenfassung

3 β ,16 α -Dihydroxyallopregnan-20-one hat die Eigenschaft, bei der Mehrzahl adrenopriver, salzbelasteter Ratten im Harn eine Natrium-Mehrausscheidung hervorzurufen.

Ein Virus als Erreger der Rollkrankheit der Rebe

Bei der rollkranken Rebe fällt auf, dass sich die Blätter eindrehen und die Triebe nach unten biegen. Die Verfärbung des Laubes setzt schon Ende Juni ein. Die Früchte sind unvollkommen entwickelt, wenig süß und klein.

Die gefürchtete Rollkrankheit ist in allen Weinbaugebieten der Erde weit verbreitet. SCHEU¹ erachtet 80% aller in Deutschland wachsenden Rebstöcke als rollkrank. Dieser Prozentsatz dürfte zu hoch sein für das Weinbauggebiet von Rheinland-Pfalz, das ich während vier Jahren sorgfältig auf Rebkrankheiten überprüfte. Nach SCHEU soll die Rollkrankheit in gewissen Jahren die Erträge auf etwa die Hälfte vermindern.

Die Ursache der Rollkrankheit war bis jetzt nicht bekannt, obschon zahlreiche Autoren sich mit diesem Problem befassten. SCHEU nahm ein Virus als Erreger an, da sich die Krankheit als pfpflansteckend erwies. Auf dem internationalen Virologenkongress in Conegliano 1955 wurde sie jedoch mehrheitlich nicht als virös, sondern als physiologisch standortbedingt beurteilt. WILHELM² berichtete 1957: «Wir haben auf Grund verschiedener Beobachtungen überhaupt nicht den Eindruck, dass es sich bei dem Blattrollen der Form, die im badischen Weinbauggebiet vorkommt, um eine übertragbare Form handelt.» «Die sogenannte Blattrollkrankheit ist eine ursächlich noch ungeklärte Erscheinung.» «In der Erforschung des Wesens der Blattrollkrankheit bleibt noch so gut wie alles zu tun.» GOHEEN, HARMON und WEINBERGER³ stellten fest, dass die in Kalifornien gehäuft auftretende, verheerende Rollkrankheit durch Pfpflanzen auf den gesunden Teil übergeht, und schlossen daraus auf eine Virose; nach Ansicht dieser Autoren stellt diese Krankheit eines der wichtigsten derzeitigen Probleme des Weinbaues dar.

Inzwischen gelang es, aus rollkranken Reben ein Virus aufzufinden und zu isolieren, das als Erreger dieser Epidemie anzusprechen ist⁴. Es war in 400 untersuchten rollkranken Stöcken nachweisbar, nicht aber in einer gleichen Anzahl gesunder Kontrollpflanzen. Man schickte

mir auch Blätter und Triebe von 94 gesunden und rollkranken Rebstöcken zur Untersuchung auf Viren. Der phänotypische Befund wurde nicht mitgeteilt und war nach dem Versand auch nicht mehr zu erkennen. Sämtliche Proben liefen lediglich unter einer Nummer⁵. Nach 6 Wochen konnte ich in 64 Fällen einen positiven Rollvirenbefund mitteilen, worauf mir bestätigt wurde, dass von den 94 untersuchten Objekten 29 von Reben mit allen morphologischen Merkmalen der Rollkrankheit stammten, bei denen ausnahmslos das Rollvirus diagnostiziert worden war. Zudem wurden 35 latent kranke Stöcke erkannt, die später, nach der Entnahme der für die Untersuchung bestimmten grünen Organe, ebenfalls sichtbar erkrankten. Die virusfrei befundenen Stöcke sahen auch neun Monate später noch gesund aus.

Das bolzenförmige, zylindrische Virus ist grösser als die früher auf der Rebe beschriebenen Virusarten⁶⁻⁸. Seine Länge beträgt 795 Å. Elektronenmikroskopisch wird es mit 14000facher Vergrößerung deutlich sichtbar. Übertragung durch Pfpflanzen steht eindeutig fest (Reproduktion über drei Passagen hinweg). In 100 Versuchen wurden je zur Hälfte einwandfreie Unterlagen mit rollkranken Edelreisern und umgekehrt gute Edelreiser mit infizierten Unterlagen kopuliert. Nach sechs Wochen liess sich bei einem Letalitätsverlust von vier Pfpflanzen in 88 Fällen der Erreger im ursprünglich intakten Partner erfassen. Nach dieser Zeit zeigten die Stöcke äusserlich noch keinerlei Symptome, sondern befanden sich in einem Latenzstadium. Frühestens 72 Tage nach der Inokulation wiesen die ersten Pflanzen schwache, aber typische Kennzeichen der Krankheit auf.

Das Virus verimpft sich nicht mit dem Preßsaft auf andere Reben. Durch diese Umstände ist auch das Fehlen eines Wirtspflanzenkreises bedingt. Keiner der zahlreichen Wirte⁹⁻¹¹ der andern drei Rebviren nahm dieses Virus auf. Weder seiner Gestalt noch den bisher ermittelten Eigenschaften nach lässt es sich in irgendeine der bekannten Virusarten einreihen. Es scheinen Stammesunterschiede vorzuliegen.

In späteren 100 Versuchen, bei denen rollkranke Unterlagen mit gesunden Edelreisern verbunden wurden, erfolgte ich täglich elektronenoptisch, wann die ersten Viren im Bild auftraten. Dabei ergab sich, dass in allen 100 Edelreisern bereits 7-14 Tage nach der Inokulation Viren gesichtet wurden.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanzierte die vorliegenden Untersuchungen.

GERTRUD OCHS

*Botanisches Institut der Universität Freiburg (Breisgau),
31. März 1959.*

Summary

A virus has been isolated from grape vines diseased with leaf roll which is the cause of this dangerous illness in vineyards. This was proved by means of electromicrographs of the virus particles in pressed juices of all the diseased vine crops examined. The virus is only transmissible by graft and not by juice.

⁵ Herrn Dr. ZIMMERMANN, dem Leiter der Landesanstalt für Rebenzüchtung, Rheinland-Pfalz, Alzey, danke ich für das überlassene Material.

⁶ GERTRUD OCHS, Vortrag 61, Bot. Tagung 1957.

⁷ GERTRUD OCHS, Z. Pflanzenkrankh. 65, 11 (1958).

⁸ GERTRUD OCHS, Weinwissenschaft 12, 26 (1959).

⁹ GERTRUD OCHS, Naturwissenschaften 45, 193 (1959).

¹⁰ GERTRUD OCHS, Mitt. Klosterneuburg 8.1, 19 (1958).

¹¹ GERTRUD OCHS, Rebe und Wein 11, 183 (1958).

¹ G. SCHEU, *Winzerbuch*, 2. Aufl. (Meininger, Neustadt 1950).

² A. F. WILHELM, *Weinwissenschaft* 11, 9 (1957).

³ A. C. GOHEEN, F. N. HARMON und J. H. WEINBERGER, *Phytopathology* 48, 51 (1958).

⁴ GERTRUD OCHS, Vortrag Bundesforschungsanstalt f. Rebenzüchtung, Siebeldingen, 17. Nov. 1958.