

Tab. IV. Relative activity of catalase and peroxidase in seedlings treated with 250 ppm GK and 500 ppm Amo-1618 (activity in water controls taken as 100.0)

	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity
Cotyledon	117.3	94.8
Hypocotyl	113.8	83.6
Radicle	163.2	252.3
L.S.D. * 5%	12.1	16.2
L.S.D. * 1%	18.3	28.1

* L.S.D. = least significant difference

significantly higher than that of leaves treated with GK. The untreated controls had an intermediate activity. This effect of Amo-1618 was counteracted by spraying with half the concentration of GK.

The results reported here indicate that both gibberellin and Amo-1618 influence peroxidase and catalase activity. Their inverse effect was mutually counteracted and it thus seems that they affect the same sites of plant growth. Peroxidase is usually considered to be a part of the IAA oxidase system⁹. Direct or indirect effect of

gibberellin on auxin level was suggested as a possible mechanism of their interaction¹⁰. It may similarly be suggested that Amo-1618 affects auxin level in the reverse direction.

Zusammenfassung. Gibberellin beschleunigt das Wachstum von Hypokotylen bei Gurkensämlingen und verlangsamt die Katalase- und Peroxydasetätigkeit in Hypokotylen und Kotyledonen. Amo-1618 verlangsamt das Wachstum, beschleunigt jedoch die Tätigkeit dieser Enzyme in Hypokotylen, Kotyledonen und Wurzelanlagen. Das Ausmass der durch Gibberellin verursachten Verlangsamung, bzw. der durch Amo-1618 verursachten Beschleunigung stand zum Effekt auf die Hypokotyl-Elongation in entsprechender Konzentrationsabhängigkeit. Gleichzeitige Anwendung beider Substanzen führte zu Aufhebung des Retardierungseffektes.

A. H. HALEVY

The Hebrew University, Faculty of Agriculture, Rehovot (Israel), October 24, 1961.

⁹ P. M. RAY, Ann. Rev. Plant Phys. 9, 81 (1958).

¹⁰ P. W. BRIAN, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 34, 37 (1959).

Blutagglutinierende und toxische Eiweissfraktionen aus Bohnen

Seit langem ist das Vorkommen von Haemagglutininen in Bohnen und andern Hülsenfrüchten bekannt¹; jedoch sind die Ansichten über die Anzahl der aktiven Fraktionen, ihre Zuordnung zu Albuminen oder Globulinen, sowie ihre mögliche Giftigkeit widersprechend².

In einer früheren Arbeit haben wir über Versuche zur Darstellung von Phyttagglutininen aus schwarzen Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) berichtet³. Durch Ausziehen der fein gemahlenen Samen mit 1% Kochsalzlösung wurde zunächst eine Rohlösung erhalten, die nach Zentrifugierung dialysiert wird, wobei eine Euglobulinfraktion ausfällt. Diese kann nach der Vorschrift von GOA und STRID⁴ oder durch 5 maliges Lösen in 1% Kochsalzlösung und Fällung durch Dialyse gereinigt werden. Es wird eine schwerlösliche Fraktion D erhalten, die dem Legumin von DANIELSON⁵ entsprechen dürfte und wegen seiner Unlöslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung nicht biologisch untersucht werden konnte und eine lösliche Fraktion, die wir E genannt haben und die dem Vicelin entspricht. Sie war bei der Prüfung mit der Papierelektrophorese nicht ganz einheitlich. Eine kaum mit Amidoschwarz anfärbbare Komponente trennte sich von einer stark gefärbten, wobei die erstere den grössten Teil der Agglutinierungsaktivität enthält. Durch andere Verfahren gelang ihre Abtrennung nicht.

Aus der salzfreien Lösung wurden bei pH 6 drei weitere Fraktionen durch 0,55, 0,7 und Ganzsättigung mit Ammoniumsulfat erhalten. Dieselben wurden durch 3 malige Wiederholung der Fällung und jeweiliges Lösen durch Dialyse gereinigt. Die bei 70%iger Sättigung gewonnene Fraktion wurde Phaseolotoxin A genannt. Sie war bei Prüfung in der Ultrazentrifuge, sowie in der Tiselius- und Papierelektrophorese rein. Die Sedimentationskonstante S_{20} wurde mit $6,04 \times 10^{-13}$, der isoelektrische Punkt bei 5,9 und das Molekulargewicht bei 126 000 gefunden.

Die bei Ganzsättigung mit Ammoniumsulfat ausfallende Fraktion B war nicht einheitlich. Durch Elektrophorese oder Chromatographie an CM-Cellulose zwischen pH 4

und 10 konnten 3 Fraktionen erhalten werden, von denen keine mit der Fraktion A identisch ist. Sie wurden in den vorliegenden Versuchen nicht einzeln geprüft.

Ebenso war in der bei der Ammoniumsulfatfraktionierung zuerst ausfallenden Fraktion C das Vorhandensein von 3 verschiedenen Komponenten nachweisbar, die durch Chromatographie an DEAE-Cellulose getrennt werden konnten. Sie waren von allen oben beschriebenen Fraktionen verschieden. Auch in diesem Falle wurde die Rohfraktion für die hier beschriebenen Versuche verwandt, weil die Verluste bei der Chromatographie sehr gross waren und außerdem diese die biologischen Eigenschaften (Toxizität) ändern kann, wie es zum Beispiel kürzlich für Chlostridiumtoxin beschrieben wurde⁶ und wir es auch bei reinem Phaseolotoxin A beobachtet haben (Tabelle I).

Die Agglutinierung wurde mit gewaschenen Erythrocyten auf der Tüpfelplatte bestimmt. Für die toxiologischen Untersuchungen wurden weisse Mäuse eigener Zucht beiderlei Geschlechts von 6–9 Wochen verwandt. Die zu prüfenden Lösungen wurden in einer Dosis intraperitoneal gespritzt, wobei die Konzentration so gewählt wurde, dass für 10 g Mäusegewicht stets 0,25 ml der in 0,85% Kochsalzlösung enthaltenen Fraktion appliziert wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle I zusammengefasst.

Alle 4 Fraktionen zeigten sowohl haemagglutinierende wie auch toxische Wirkungen, jedoch waren die beiden Aktivitäten nicht streng proportional, soweit die Genauigkeit der Technik diesen Schluss zulässt. Die Toxizität von Phaseolotoxin A war bei einer LD₅₀ von etwa 50 mg/kg Maus ungefähr 1/700 der toxischen Dosis von

¹ K. LANDSTEINER und L. RAUBITSCHER, Zbl. Bakt. 45, 660 (1907).

² M. KRÜPE, *Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweisskörper (Phyttagglutinine)* (Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1956).

³ W. G. JAFFÉ und K. GAEDÉ, Nature 183, 1329 (1959).

⁴ J. GOA und L. STRID, Arch. Mikrobiol. 33, 235 (1959).

⁵ C. E. DANIELSON, Biochem. J. 44, 387 (1949).

⁶ E. J. SCHANTZ, D. STEFAYE und L. SERO, J. biol. Chem. 235, 3489 (1960).

Tab. I. Vergleich der Agglutin- und Giftwirkung von Bohnenfraktionen

Fraktion	Agglutinierung von Mäuseblut	Dosis/kg Maus mg	Anzahl der gestorbenen Tiere/injizierte Tiere
A	1:64000	100	10/10
		75	10/10
		60	10/10
		50	19/20
		40	5/20
B	1:16000	250	9/20
		200	1/10
C	1:16000	200	14/20
		150	12/20
		125	5/10
E	1:8000	500	9/10
		250	10/10
		200	5/20
A (an DEAE-Cellulose chromatographiert)	1:16000	60	0/5
		100	3/7

Tab. II. Toxizität der Bohneneiweißfraktion A in Mäusen verschiedener Herkunft

Verwendete Mäuse	Dosis/kg Maus mg	Anzahl der gestorbenen Tiere/injizierte Tiere	Agglutinierung der Erythrocyten der Mäuse
Weisse Mäuse (MPI)	150	1/5	1:64000
	300	11/11	
Braune Mäuse (Heston)	100	2/9	1:64000
	125	3/7	
Weisse Mäuse (MPI) mit Papillomen	100	0/10	1:64000
	200	0/12	
	400	8/12	

Ricin und 1/40 der von Diphtherietoxin⁷. In den von ihm hergestellten Bohnenfraktionen fand PIERKARSKI⁸ die entsprechenden toxischen Dosen zwischen 25 mg und 500 mg/kg Maus.

Bei einem Aufenthalt in München hatten wir Gelegenheit, einige weitere Versuche an Mäusen von 2 verschiedenen Stämmen sowie an Mäusen mit Papillomen zu machen. Wie aus den Daten der Tabelle II hervorgeht, lag die toxische Dosis in diesen Fällen höher als in der ersten Versuchsreihe, was zeigt, dass ein Vergleich zwischen Daten verschiedener Provenienz nicht unbedingt möglich ist. Am höchsten lag die Dosis bei den Versuchen mit Mäusen, in denen durch Behandlung mit Crotonölfaktionen Papillome erzeugt worden waren. Obwohl die Unterschiede gegenüber den Tieren des gleichen Stammes

bei der geringen Zahl nicht unbedingt als gesichert angesehen werden können, erschien die Beobachtung erwähnenswert, da NUNGESTER und VON HALSEMA⁹ in haemagglutinierenden Bohnenextrakten eine inaktivierende Wirkung auf Flexner-Sobling Karzinomzellen bei Ratten beobachtet haben, was mit der Bindung von Phytagglutinin an Zellrezeptoren der Krebszellen in Zusammenhang gebracht wird.

Einen Unterschied in der Agglutinierbarkeit der Blutzellen der verschiedenen untersuchten Mäusestämme konnten wir nicht feststellen.

Über die Wirkungsweise der Bohnentoxine können wir noch keine Aussagen machen. Lediglich haben wir als Erklärung der beobachteten Wachstumshemmung nach oraler Applikation eine Reduktion der Darmabsorption zeigen können^{10,11}. Wir vermuten, dass die parenterale Toxizität mit einer Reaktion der untersuchten Phytotoxine mit Zellrezeptoren ähnlich denen der Erythrocyten zusammenhängt. Über die anatomisch-pathologischen Befunde soll später berichtet werden.

Unsere Ergebnisse – zusammen mit denen von LIENER über das toxische Soyabohnenagglutinin¹² – lassen weitere toxikologische Untersuchungen an andern bisher als ungiftig angesehenen Phytagglutininen wünschenswert erscheinen¹³.

Summary. Soluble proteins from black beans (*Phaseolus vulgaris*) have been separated into 4 fractions, one soluble in 1% NaCl-solution and 3 water soluble. The latter were separated by ammonium sulfate fractionation. The haemagglutination of these fractions is compared with their toxicity in mice when applied by intraperitoneal injection. The LD₅₀ of the most active fraction was about 50 mg/kg. When used in mice of different strains, the toxicity was not the same while the blood cells were agglutinated by the same final concentration. Croton-oil-induced papilloma-bearing mice were slightly more resistant than normal animals.

W. G. JAFFÉ

Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Caracas (Venezuela), August 7. 1961.

⁷ W. E. VAN HEYMINGEN, in H. NEURATH und K. BAYLEY, *The Proteins* (New York 1954).

⁸ L. PIERKARSKI, *Dissertationes Pharmaceuticae* 9, Heft 4 (Krakau 1957).

⁹ W. J. NUNGESTER und G. VAN HALSEMA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 83, 863 (1953).

¹⁰ W. G. JAFFÉ, *Arzneimittelforsch.* 10, 1012 (1960).

¹¹ W. G. JAFFÉ und G. CAMEJO, *Acta Cient. Venezolana* 12, 59 (1961).

¹² I. E. LIENER, *J. Nutr.* 49, 527 (1953).

¹³ Wir danken dem Consejo del Desarrollo Científico y Humanístico der Venezolanischen Zentraluniversität sowie der Fundación Creole, Caracas, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Dr. E. HAECKER und Frl. I. BRACHMANN, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, danken wir für die freundliche Überlassung der im 2. Versuch verwendeten Mäuse.

Potentiation of Bradykinin Action on Smooth-Muscle by Cysteine

In the course of experiments performed to test purified substrates for bradykinin-releasing enzymes¹, it was necessary to inhibit kininase, a plasma peptidase that rapidly destroys bradykinin. When cysteine^{2,3} was used, it was confirmed that it potentiated the smooth-muscle stimulating action of bradykinin, a fact already reported by

LEWIS⁴. Such potentiation occurred on the isolated guinea-pig ileum as well as on the rat uterus preparation, two

¹ OLGA B. HENRIQUES, MARIA C. F. OLIVEIRA, and ZULEIKA P. PICARELLI, in press.

² E. K. FREY, H. KRAUT, and E. WERLE, *Kallikrein* (Padutin) (F. Enge-Verlag, Stuttgart 1950).

³ M. ROCHA e SILVA, in *Polypeptides which Stimulate Smooth Muscle* (E. and S. Livingstone Ltd., London 1955), p. 20.

⁴ G. P. LEWIS, *Physiol. Rev.* 40, 647 (1960).