



Fig. 2. A) Concentration-activity curves obtained with adrenaline and noradrenaline of 2 successive dose-response control curves. Each point represents the mean of 4 experiments  $\pm$  SEM. B) Concentration activity curves obtained with acetylcholine in both control conditions and in presence of pyrogallol ( $10^{-5}$ ). Each point represents the mean of 5 experiments  $\pm$  SEM. All drug concentrations are expressed in g/ml.

**Discussion.** WYLIE, ARCHER and ARNOLD<sup>3</sup> suggest that the increase of adrenaline effects by polyphenols is probably due to an increased life-span of the adrenaline because of a reduced rate of methylation. This reduced rate explains the difference between adrenaline and noradrenaline, because noradrenaline has a greater affinity for COMT than does adrenaline and is more difficult to displace by a competitive inhibitor, while under in vitro conditions these polyphenols inhibited methylation of both amines.

On the other hand, AXELROD<sup>7</sup> found that the methylation of adrenaline in vivo occurred in 2 phases which differed in velocity; there was a phase of rapid methylation in which more than half (60 to 70%) of the injected amine was methylated within 10 min, the remaining methylation being extended over 3 or more h. In the case of noradrenaline, less than half was immediately methylated and the major portion was slowly liberated and methylated.

This difference in affinity of the 2 amines for binding sites might explain the differences obtained in our experiments on rabbit aortic strips, since the inhibition of COMT prevents the methylation of the major portion of adrenaline (60 to 70%) in the first phase, which is responsible for potentiation. The absence of potentiation in the last doses of the curve might be explained by the fugacity of action of pyrogallol. Another possible explanation

for this difference could be that the difference of uptake between adrenaline and noradrenaline into adrenergic nervous endings, influences the difference of potentiation of the two amines after inhibition by polyphenols, since COMT is an extraneuronal enzyme.

A possible significant spontaneous potentiation by an increase of sensitivity of the aortic strips in 2 successive dose-response curves, is discarded. The absence of potentiation of responses to acetylcholine, which is not affected by COMT, supports the specificity of this potentiation for substances metabolized by COMT.

**Resumen.** El Pyrogallol potencia claramente los efectos de adrenalina y debilmente los de noradrenalina en la preparaci3n de tiras aisladas de aorta de conejo. Los efectos de acetilcolina no son potenciados en la misma preparaci3n.

P. LORENZO FERNÁNDEZ,  
A. MEDIAVILLA MARTÍNEZ and  
B. LORENZO-VELÁZQUEZ

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,  
Medical School, Ciudad Universitaria,  
Madrid 3 (Spain), 11 December 1972

<sup>7</sup> J. AXELROD, *Physiol. Rev.* 39, Part D, 751 (1959).

## Phallolysin, ein hochmolekulares Toxin aus *Amanita phalloides*

Aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. konnten wir durch wässrige Extraktion Phallolysin, ein hochmolekulares, hämolytisch wirkendes Toxin gewinnen. Es war alkohollabil; bei der methanolischen Extraktion zur Isolierung der bekannten

Knollenblätterpilzgifte – Phalloidin, Amanitine, weitere toxische Cyclopeptide – (WIELAND<sup>1</sup>) wurde es zerstört. Sein Anteil an der Gesamtoxität grüner Knollenblätterpilze (für Mäuse i.p.) betrug in unserem Ausgangsmaterial 40–75 % (Tabelle).

**Material und Methoden.** Zur Isolierung wurde Phallo-  
lysin aus kalt-wässrigen Extrakten lyophilisierter Pilze  
mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt und durch Ionenaus-  
tauschchromatographie an DEAE-Cellulose (0,03 M  
Tris-HCl-Puffer pH 8,0; 2°C) und wiederholte Gelchro-  
matographie an Biogel P-30 (0,1 M Na-Phosphatpuffer  
pH 5,5, NaCl ad 0,3 M; 2°C) gereinigt. Zur Reinheits-  
prüfung diente Celluloseacetat-Elektrophorese (pH 8,5),  
Standard-Disk-Elektrophorese (pH 4,0; pH 8,5) und  
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Disk-Elektrophorese; ge-  
färbt wurde mit Coomassie Brilliant Blue. Das apparente  
Molekulargewicht ermittelten wir durch gelchromatogra-  
phischen Vergleich mit Standardproteinen an Sephadex  
G-75, den Isoelektrischen Punkt durch Elektrofokussie-  
rung in Ampholine. Phosphat wurde nach AMES<sup>2</sup> be-  
stimmt.

**Ergebnisse und Diskussion.** Die hämolytische Aktivität  
liess sich aus Celluloseacetat-Elektropherogrammen und  
Polyacrylamidgelen eluieren und entsprach einer mit  
Coomassie Blue färbbaren Bande. Bei der SDS-Disk-  
Elektrophorese erwies sich das isolierte Phallo-  
lysin als zu etwa 50 % rein.

Bei der Elektrophorese verhielt es sich basisch, der Iso-  
elektrische Punkt lag bei 8,25. Es war nicht dialysabel.  
Für das native Hämolsin wurde ein Molekulargewicht  
von 30.000 ermittelt.

Phallo-  
lysin wurde durch 0,1 % Natriumdodecylsulfat  
(60 min/37°C) vollständig und irreversibel inaktiviert.  
Durch 8 M Harnstoff wurde es langsam inaktiviert (nach  
24 h bei 20°C Restaktivität < 1–15 %). Dabei verschwand  
mit der hämolytischen Aktivität auch die Toxizität. Der  
inaktivierte Anteil liess sich nicht reaktivieren durch  
Dialyse, Verdünnung oder gelchromatographische Ab-  
trennung des Harnstoffs.

Es war thermolabil und verlor bei 65°C innerhalb von  
5 min 90 % seiner Aktivität. Es war säurelabil und wurde  
bei pH 2,0 bei 37°C innerhalb von 10 min inaktiviert; in  
der Kälte war es gegen Säure beständiger. Gegen Alkali  
war es stabiler.

Obwohl die physikalisch-chemischen Eigenschaften von  
Phallo-  
lysin auf ein Protein hinwiesen, war die hämolyti-  
sche Aktivität resistent gegen Pepsin, Trypsin, Chymo-  
trypsin, Subtilisin und Pronase (48h/37°C). Dabei hemmte  
es die Aktivität dieser Proteasen gegen andere Substrate  
nicht; auch änderte unter der Enzymbehandlung die der

hämolytischen Aktivität entsprechende Bande ihr disk-  
elektrophoretisches Verhalten nicht. Die hämolytische  
Aktivität war auch resistent gegen Bromelin und Protei-  
nase K (48 h/37°C). Auch durch  $\alpha$ -Amylase oder Pankrea-  
tin (24 h/37°C) wurde Phallo-  
lysin nicht inaktiviert.

Pro Molekül eines etwa 50 % reinen Phallo-  
lysin (Mol-  
Gew. 30.000) wurden nur 3–4 Moleküle Phosphat nach-  
gewiesen, die Reste nicht abgetrennter Puffersalze dar-  
stellen konnten.

Phallo-  
lysin hämolytierte gewaschene Erythrocyten  
von Mensch, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte,  
Hund und Schwein direkt; gegen menschliche Erythro-  
cyten war es 20 mal aktiver als Digonin; Rinder- und  
Hammelerythrocyten waren weitgehend resistent. Es  
wurde durch Cholesterin nicht gehemmt, zeigte keine  
Phospholipase A-Aktivität und auch keine Phospholi-  
pase C-Aktivität<sup>3</sup>.

Es wirkte cytotoxisch auf HeLa-Zellen und Mäuse-  
Ascites-Tumorzellen in vitro<sup>4</sup>. Es war i.p. hoch toxisch.  
Die mit verschieden weit gereinigtem Phallo-  
lysin bestimmte Toxizität war nach Abtrennung der toxischen  
Cyclopeptide der hämolytischen Aktivität korreliert.  
Unabhängig vom Reinheitsgrad betrug die LD<sub>50</sub> für  
Mäuse (i.p.) ca 1000 hämolytische Einheiten/kg. (Eine  
Hämolytische Einheit hämolytiert 1 ml 1 %ige Suspen-  
sion gewaschener Kaninchenerythrocyten bei 37°C inner-  
halb von 2 h total.); je nach Aktivität des Materials waren  
dies 0,3–0,6 mg isoliertes, lyophilisiertes Phallo-  
lysin.

In grünen Knollenblätterpilzen von verschiedenen Fund-  
orten und Jahren wurde Phallo-  
lysin konstant und in  
hoher Aktivität nachgewiesen<sup>5</sup>. Infolge seiner Thermo-  
und Säurelabilität dürfte dieses Toxin jedoch an der  
Knollenblätterpilzvergiftung des Menschen nicht betei-  
ligt sein. Eine eingehende Darstellung erfolgt an anderer  
Stelle.

**Summary.** Phallo-  
lysin, a toxic hemolysin of high  
molecular weight, was isolated from aqueous extracts of  
*Amanita phalloides*. Its properties are discussed.

RUTH SEEGER<sup>6</sup>

unter Mitarbeit von

H. SCHARER<sup>7</sup> und MELITTA HAUPT

*Institut für Pharmakologie und*

*Toxikologie der Universität,*

*Koellikerstrasse 2, D-8700 Würzburg (Germany),*

*10. Februar 1973.*

	LD <sub>50</sub> (mg/kg*) mit Vertrauensgrenzen	
Pilztrockenpulver (in Agar suspendiert)	26,0	(22,2–30,5)
Äthanolischer Extrakt (50% Äthanol, 25°C)	112,0	(102,0–123,0)
Wässriger Extrakt (2 × 24 h, 2°C)	20,2	(15,6–26,1)

\* Ausgedrückt als Pilztrockenpulver.

<sup>1</sup> TH. WIELAND, Fortschr. Chem. org. NatStoffe 25, 214 (1967).

<sup>2</sup> B. N. AMES, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. N. COLOWICK and  
N. O. KAPLAN; Academic Press, New York), vol. 8, p. 115 (1966).

<sup>3</sup> R. SEEGER, G. BURKHARDT and G. NEEB, Naunyn-Schmiedebergs  
Arch. Pharmak. 277, R 72 (1973).

<sup>4</sup> D. LEHMANN, Zahnmed. Diss. Würzburg, in Vorbereitung.

<sup>5</sup> R. SEEGER, H. KRAUS und R. WIEDMANN, Archs Toxic. 30, 215  
(1973).

<sup>6</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>7</sup> Ein Teil der Ergebnisse entstammt der Dissertation von H. SCHAR-  
ER.

## Changes of the $\beta$ -Receptor Binding Sites of the Rabbit Ileum under the Influence of High Temperature

Several authors observed that an elevation of tempe-  
rature was accompanied by a decrease of the affinity for  
sympathomimetic drugs to the  $\beta$ -receptors on the  
isolated guinea-pig atrium<sup>1–5</sup> and on the rabbit ileum<sup>6</sup>.

On rabbit ileum, this decrease of affinity was much more  
pronounced than on guinea-pig atrium. The diminution  
of affinity caused by high temperature was found to be  
completely reversible by the metabolic inhibitor iodoace-