



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 ARNOLD³ 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, AXELROD⁷ 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 explana-

tion 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 significative 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 débilmente los de noradrenalina en la preparación de tiras aisladas de aorta de conejo. Los efectos de acetilcolina no son potenciados en la misma preparación.

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

⁷ 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 -- (WIELAND¹) wurde es zerstört. Sein Anteil an der Gesamttoxizität grüner Knollenblätterpilze (für Mäuse i.p.) betrug in unserem Ausgangsmaterial 40–75 % (Tabelle).

Material und Methoden. Zur Isolierung wurde Phallolysin aus kalt-wässrigen Extrakten lyophilisierter Pilze mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt und durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (0,03 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0; 2°C) und wiederholte Gelchromatographie an Biogel P-30 (0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 5,5, NaCl ad 0,3 M; 2°C) gereinigt. Zur Reinheitsprüfung diente Celluloseacetat-Elektrophorese (pH 8,5), Standard-Disk-Elektrophorese (pH 4,0; pH 8,5) und Natriumdodecylsulfat (SDS)-Disk-Elektrophorese; gefärbt wurde mit Coomassie Brilliant Blue. Das apparetive Molekulargewicht ermittelten wir durch gelchromatographischen Vergleich mit Standardproteinen an Sephadex G-75, den Isoelektrischen Punkt durch Elektrofokussierung in Ampholine. Phosphat wurde nach AMES² bestimmt.

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 Phallolysin als zu etwa 50 % rein.

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

Phallolysin 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 Abtrennung 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 Phallolysin auf ein Protein hinwiesen, war die hämolytische Aktivität resistent gegen Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin und Pronase (48 h/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 Proteinase K (48 h/37°C). Auch durch α -Amylase oder Pankreatin (24 h/37°C) wurde Phallolysin nicht inaktiviert.

Pro Molekül eines etwa 50 % reinen Phallolysin (Mol-Gew. 30.000) wurden nur 3–4 Moleküle Phosphat nachgewiesen, die Reste nicht abgetrennter Puffersalze darstellen konnten.

Phallolysin hämolierte gewaschene Erythrocyten von Mensch, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Hund und Schwein direkt; gegen menschliche Erythrocyten war es 20 mal aktiver als Digitonin; Rinder- und Hammelerythrocyten waren weitgehend resistent. Es wurde durch Cholesterin nicht gehemmt, zeigte keine Phospholipase A-Aktivität und auch keine Phospholipase C-Aktivität³.

Es wirkte cytotoxisch auf HeLa-Zellen und Mäuse-Ascites-Tumorzellen *in vitro*⁴. Es war i.p. hoch toxisch. Die mit verschieden weit gereinigtem Phallolysin bestimmte Toxizität war nach Abtrennung der toxischen Cyclopeptide der hämolytischen Aktivität korreliert. Unabhängig vom Reinheitsgrad betrug die LD₅₀ für Mäuse (i.p.) ca 1000 hämolytische Einheiten/kg. (Eine Hämolytische Einheit hämoliert 1 ml 1 %ige Suspension gewaschener Kaninchenerthrocyten bei 37°C innerhalb von 2 h total.); je nach Aktivität des Materials waren dies 0,3–0,6 mg isoliertes, lyophilisiertes Phallolysin.

In grünen Knollenblätterpilzen von verschiedenen Fundorten und Jahren wurde Phallolysin konstant und in hoher Aktivität nachgewiesen⁵. Infolge seiner Thermo- und Säurelabilität dürfte dieses Toxin jedoch an der Knollenblätterpilzvergiftung des Menschen nicht beteiligt sein. Eine eingehende Darstellung erfolgt an anderer Stelle.

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

RUTH SEEGER⁶
unter Mitarbeit von
H. SCHARRER⁷ und MELITTA HAUPT

*Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Universität,
Koellikerstrasse 2, D-8700 Würzburg (Germany),
10. Februar 1973.*

¹ TH. WIELAND, Fortschr. Chem. org. Natstoffe 25, 214 (1967).

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

³ R. SEEGER, G. BURKHARDT and G. NEEB, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. 277, R 72 (1973).

⁴ D. LEHMANN, Zahnmed. Diss. Würzburg, in Vorbereitung.

⁵ R. SEEGER, H. KRAUS and R. WIEDMANN, Archs Toxic. 30, 215 (1973).

⁶ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

⁷ Ein Teil der Ergebnisse entstammt der Dissertation von H. SCHARRER.

	LD ₅₀ (mg/kg ^a) mit Vertrauengrenzen
Pilztrockenpulver (in Agar suspendiert)	26,0 (22,2–30,5)
Äthanolisches Extrakt (50% Äthanol, 25°C)	112,0 (102,0–123,0)
Wässriger Extrakt (2 × 24 h, 2°C)	20,2 (15,6–26,1)

^a Ausgedrückt als Pilztrockenpulver.

Changes of the β -Receptor Binding Sites of the Rabbit Ileum under the Influence of High Temperature

Several authors observed that an elevation of temperature was accompanied by a decrease of the affinity for sympathomimetic drugs to the β -receptors on the isolated guinea-pig atrium^{1–5} and on the rabbit ileum⁶.

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-