Bestimmung von alpha-Amanitin durch Hemmung der RNA-Polymerase II

Astrid Meyboom, Herwig Weißer und Walter Martz

1. Einleitung

Der gefährlichste aller Giftpilze ist der Grüne Knollenblätterpilz oder Gichtschwamm (*Amanita phalloides*) mit meist grünlichem Hut, häufig mit Hautlappen, mit lappiger Hautscheide am Stielgrund und hornartigem Geruch (Abbildungen finden sich u. a. bei Bresinsky und Besl, Giftpilze, WVG). Es reicht ein einziger Pilz, um einen Menschen zu töten. Die wirksamen Gifte sind die Amatoxine, die über 90% aller tödlich verlaufenden Pilzvergiftungen verursachen (Faulstich, 1979, Wieland und Faulstich 1991[3,12]).

Erste Beobachtungen zur Wirkung von alpha-Amanitin wurden von Fiume und seinen Mitarbeitern Mitte der sechziger Jahre in Bologna gemacht. (Fiume *et al.* (1965) [4] und Fiume *et al.* (1966)[5]).

Spätere Untersuchungen zeigten, daß das Toxin die Synthese von messenger-RNA-Molekülen (mRNA) als Vorlagen für die Proteinbiosynthese verhindert. Amanitin schädigt zunächst die Darmepithelzellen. Da die Halbwertszeiten von Proteinen *in vivo* zwischen einigen Stunden und mehreren Tagen liegen, kommt es erst nach einer relativ langen Latenzphase von 6 bis 24 Stunden zu schwerem Erbrechen und starken Durchfällen. Der damit verbundene Wasser- und Elektrolytverlust kann zu einem Kreislaufzusammenbruch führen. Nach etwa 24 Stunden ist das choleraartige Stadium überwunden und das Befinden bessert sich scheinbar (2. Latenzphase). Allerdings wird nun die Proteinneubildung in der Leber verhindert und es entwickelt sich ein Ikterus als Zeichen einer Schädigung, so daß schon nach weiteren 12 Stunden Leber-, aber auch Nierenversagen zum Tode führen können. Die Konzentration des Amanitins im Blut bleibt zunächst über einen längeren Zeitraum hoch, da das Toxin im Darm ständig und schnell resorbiert wird. Außerdem kommt es zu einem ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf des Giftes. Die Therapie der Vergiftung besteht daher darin, die Resorption zu verhindern, u. a. durch Beeinflussung der Resorptionsrate mittels Gabe von Aktivkohle, Hämoperfusion, Hämodialyse, Duodenalsonde etc..

Zur Diagnostik steht ein kommerziell erhältlicher Radioimmunoassay (RIA) zur Verfügung, bei dem ^{125}I-markiertes Amanitin als Tracersubstanz eingesetzt wird. Die Vorteile dieses Assays liegen in der einfachen und schnellen

Durchführbarkeit, der hohen Empfindlichkeit (ab etwa 2 ng/ml Urin) und geringen Störanfälligkeit. Nachteilig ist die kurze Halbwertszeit des ^{125}I-markierten Tracers (60 Tage), die eine häufige Nachmarkierung erfordert. Diese ist aber nur in den Herbst- und Wintermonaten, d.h. während der Pilzsaison, wirtschaftlich rentabel. Etwa von Januar bis Juli steht der RIA nicht zur Verfügung. Treten in dieser Zeit Vergiftungen, etwa durch eingefrorene Pilze auf, so können sie nicht durch Amanitinnachweis in Körperflüssigkeiten diagnostiziert werden.

Dieser Aspekt führte uns zur Suche nach anderen Nachweismöglichkeiten für Amanitin. Neben chromatographischen Nachweisen mittels HPLC/UV oder neuerdings LC/MS sollte auch ein enzymatischer Test, der die biologische Wirkung der Amatoxine ausnutzt, zur Anwendung kommen können.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation von Zellkernen

Schweineleber wird nach der Schlachtung entnommen und nach Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe eines Fleischwolfs zerkleinert. Der Zellaufschluß erfolgt durch Homogenisation im Warring Blendor (3 x 15 s mit 3 Volumina 0,32 M Saccharose, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7). Das Homogenat wird filtriert und 10 Minuten bei 4 °C und 1000*g zentrifugiert (Pellet: Rohe Kernfraktion). Die Zellkerne werden in 3 Volumina 2,2 M Saccharose, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7,0 homogenisiert und auf ein Kissen dieses Saccharosemediums geschichtet, wobei das Volumenverhältnis Homogenat zu Kissen etwa 5:1 betragen sollte. Zur Sedimentation der Zellkerne (Pellet: Reine Kernfraktion) zentrifugiert man 1 Stunde bei 45.000 - 50.000*g und 4 °C. Die Zellkerne werden 2 x in isotonem Saccharosemedium gewaschen und bei -80° C in 43,5% Glycerin eingefroren.

2.2. Präparation von RNA-Polymerase II

Eine gereinigte Kernfraktion wird in 40 ml 50 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 30 % (w/w) Glycerin, pH 7,9 (TG-Puffer) aufgenommen und mit 3,4 ml 4 M Ammoniumsulfatlösung versetzt. Die Zellkerne werden mit Ultraschall aufgeschlossen und die freigesetzten Nucleinsäuren mit Benzonase (Merck) abgebaut. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 4° C, 10000*g) fällt man die im Überstand enthaltenen Proteine durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (50% Sättigung) und sedimentiert sie durch Zentrifugation (30 Minuten, 4° C, 23500*g). Das Pellet wird in 10 ml TG-Puffer gelöst und auf eine Sephadex-G50-Säule (V=100-150 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgt mit TG-Puffer. Der erste eluierte Proteinpeak wird auf eine DEAE-Fractogel Säule aufgetragen. Nach Waschen mit 0,08 M Ammoniumsulfat in TG-Puffer eluiert man gebundenes Protein mit einem linearen Gradienten von 0,08 bis 0.5 M Ammoniumsulfat in TG-Puffer. Das Elu-

tionsvolumen wird in 2 ml Fraktionen aufgefangen und jede zweite Fraktion auf Polymeraseaktivität untersucht. Aktive Fraktionen werden vereinigt und konzentriert (Centriprep, Amicon; Sephadex G-25). Zur Stabilisierung der Enzymaktivität setzt man Glycerin (final max. 60%) zu. Die Proben werden schockgefrostet und bei -80° C gelagert.

2.3. Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Aktivität von RNA-Polymerasen in Kernfraktionen wird die zu testende Probe in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit Reaktionspuffer (40 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 40 mM KCl, 5 mM DTT, 60 mM NH_4SO_4, 3 mM $MnSO_4$, 25 µg/ml BSA, 300 µM ATP, 300 µM GTP, 300 µM CTP, 30 µM UTP, 1 µCi [5,6-^{3}H]Uridin 5'-triphosphat, 0,2 mg/ml hitzedenaturierte Kalbsthymus DNA, pH 7,9) 30 Minuten bei 30° C inkubiert. Um die benötigte Menge an radioaktivem ^{3}H-UTP zu verringern, wird zum Test von Fraktionen gereinigter RNA-Polymerase eine Reaktionsmischung mit 50 mM Tris, 1 mM $MnSO_4$, 2 mM $MnCl_2$, 600 µM ATP, 600 µM GTP, 600 µM CTP, 50 µM UTP, 0,72 mg/ml 0,2 µCi [5,6-^{3}H]Uridin 5'-triphosphat verwendet (modifiziert nach Bitter (1983) [1], Inkubation s.o.). Nach 30 Minuten pipettiert man den gesamten Reaktionsansatz auf ein Whatman GF/C-Filter über einer Nutsche mit Absaugvorrichtung. Mit 2 ml 12,5%iger Trichloressigsäure werden Proteine und Nukleinsäuren gefällt. Unter Wasserstrahlvakuum wäscht man dann das Filter mit der Probe dreimal mit 1 ml 5 % Trichloressigsäure und saugt es nach Zugabe von zweimal 1 ml Ethanol weitgehend trocken. Zur vollständigen Trocknung überführt man nach Fällung aller Proben die Filter in einen Trockenschrank und trocknet sie 15 Minuten bei 80 °C. Die auf den Filtern gebundene Radioaktivität wird anschließend in Mini-Vials mit 4 ml Szintillator (Quickszint 501, Toluolszintillator, Zinsser) in einem Beckman Flüssigszintillationszähler LS5000 CE bestimmt. Kontrollen zeigen, daß Mononukleotide nicht an das Filter mit einer Porengröße von 1,2 µm binden bzw. durch die Waschschritte effektiv entfernt werden können, die gemessenen Kontrollwerte lagen im Bereich der Null-Zählrate des ß-Zählers. Als Einheit der Aktivität der RNA-Polymerase aus Schweineleber sei die Enzymmenge definiert, die unter den gegebenen Bedingungen (30 Minuten bei 30 °C) 1 pmol UTP in RNA einbaut.

3. Ergebnisse

3.1. Stabilität und Amanitinhemmbarkeit der RNA-Polymerase in Zellkernen aus Schweineleber

Ca. 3 Mio. Schweineleberkerne einer Präparation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf ihre Aktivität und Amanitinhemmbarkeit (durch 25 µg/ml Amanitin im Ansatz) untersucht. Dabei galt es, inbesondere die Stabilität der

Polymeraseaktivität in eingefrorenen Zellkernen zu prüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

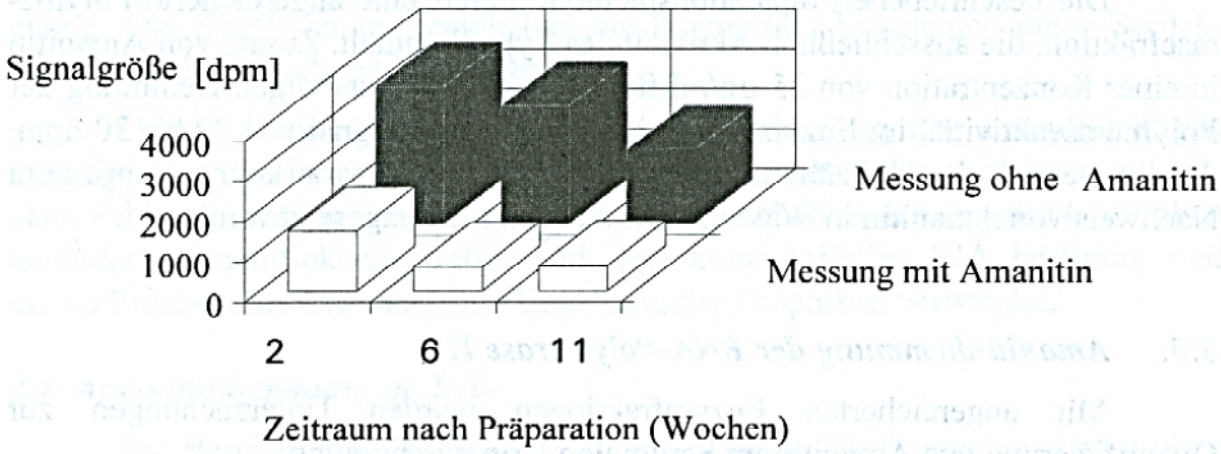

Abb.1: Haltbarkeit der RNA-Polymerase in Zellkernen aus Schweineleber

3.2. Partielle Hemmung der Polymeraseaktivität

Die Hemmung von RNA-Polymerase II in Zellkernen aus Ratten- bzw. Schweineleber wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Amanitinkonzentrationen untersucht. Dazu wurde jeder Reaktionsansatz mit 15 µl amanitinhaltiger

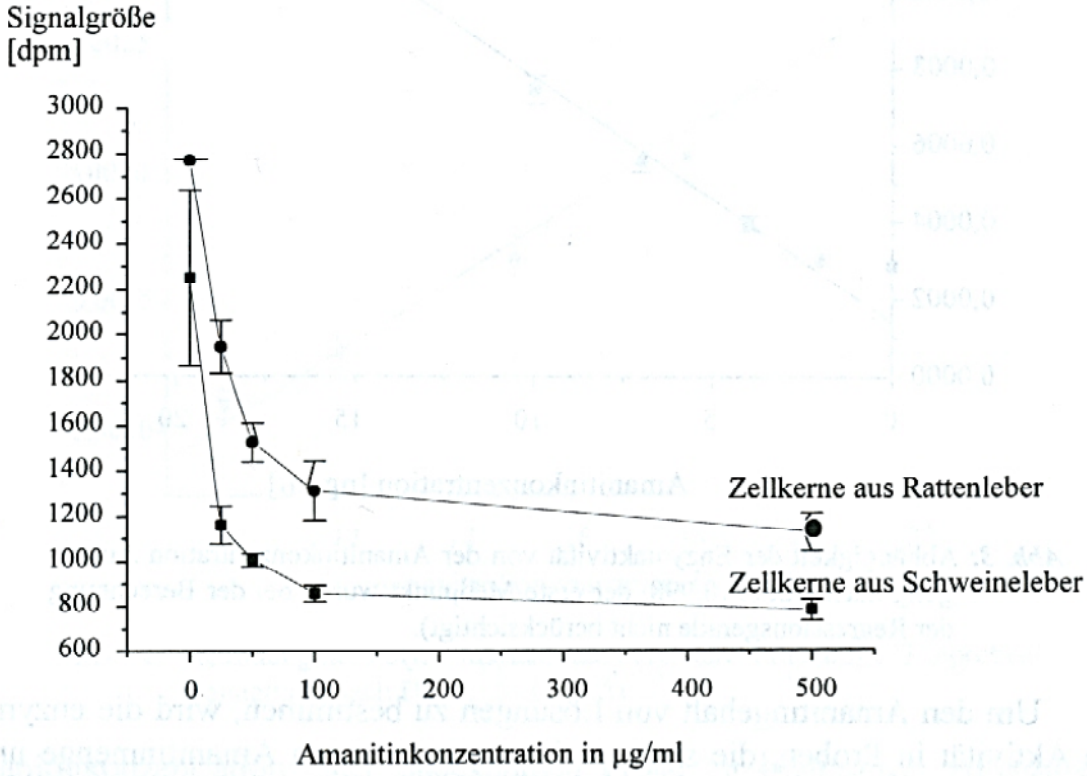

Abb. 2: Hemmung der Polymeraseaktivität in Ratten- und Schweineleber bei verschiedenen Amanitinkonzentrationen.

Lösung der angegebenen Konzentration versetzt. Die Anzahl der Zellkerne betrug etwa 365.000 aus Ratten- und 600.000 aus Schweineleber. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die beschriebene Präparationsmethode liefert eine angereicherte Polymerasefraktion, die ausschließlich Aktivität des Typs II enthält. Zusatz von Amanitin in einer Konzentration von 25 µg/ml führte zu einer vollständigen Hemmung der Polymeraseaktivität, im Enzymtest erhielt man ein Meßsignal von 20 bis 30 dpm, das im Bereich der Nullzählrate liegt. Das erhaltene Präparat konnte damit zum Nachweis von Amanitin in Wasser, Urin oder Plasma eingesetzt werden.

3.3. Amanitinhemmung der RNA-Polymerase II

Mit angereicherten Enzymfraktionen wurden Untersuchungen zur Quantifizierung von Amanitin im Serum und Urin durchgeführt.

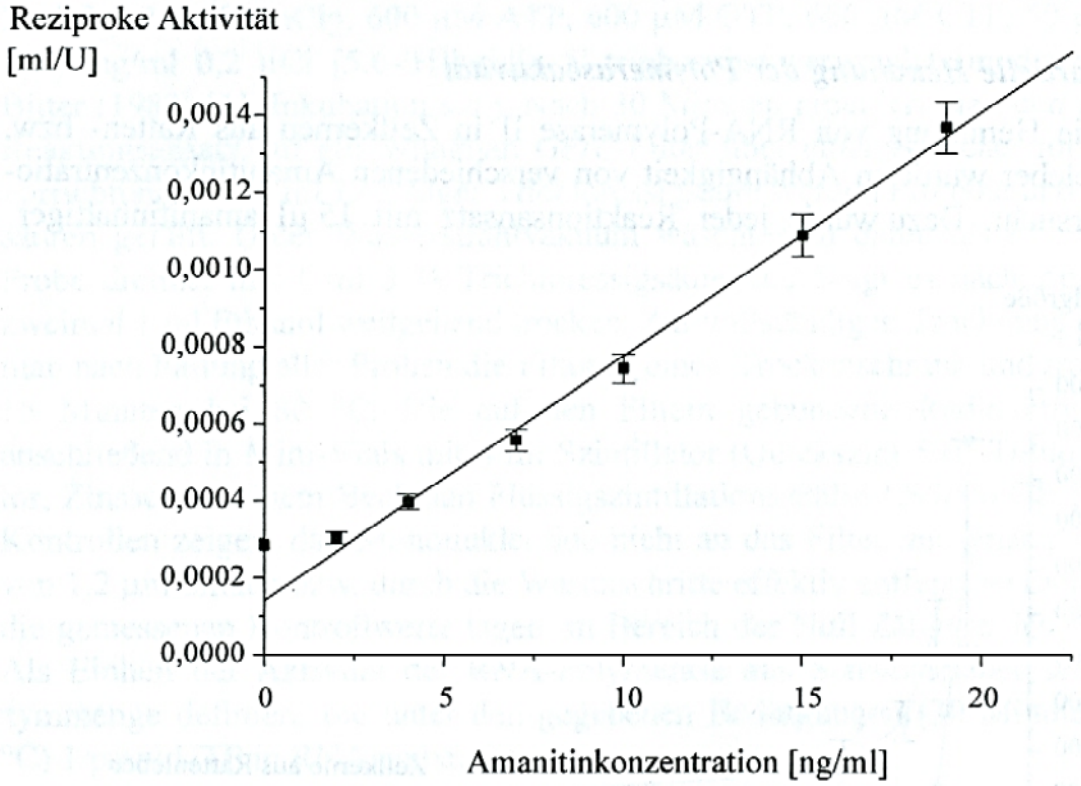

Abb. 3: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Amanitinkonzentration Auftragung nach Dixon (0,998, der erste Meßpunkt wurde bei der Berechnung der Regressionsgerade nicht berücksichtigt).

Um den Amanitingehalt von Lösungen zu bestimmen, wird die enzymatische Aktivität in Proben, die sich nur in der zugesetzten Amanitinmenge unterscheiden, untersucht.

Die inhibitorische Wirkung von alpha-Amanitin kann - unabhängig vom vorliegenden Hemmtyp - nach Dixon in einem Diagramm 1/v versus Inhibitorkonzentration linearisiert werden (Dixon und Webb (1963) [2]). Diese Darstellung beruht auf einer Umformung der doppelt-reziproken Michaelis-Menten Gleichung. Die Koeffizienten beeinhalten die kinetischen Konstanten unter Berücksichtigung des jeweiligen Hemmtyps.

Da die Einwaage und anschließende Verdünnung der amanitinhaltigen Lösungen bei den hier verwendeten geringen Konzentrationen mit einem erheblichen Fehler verbunden sein kann, wurde die tatsächlich in den zugesetzten Proben enthaltene Amanitinkonzentration mit dem kommerziellen RIA bestimmt und dieses Ergebnis als Grundlage zur Erstellung der Graphiken verwendet.

3.4. Amanitinhemmung im Urin

Im Bereich von 10 bis 22 ng/ml wurden Meßwerte in Urinproben aufgenommen, die bei der Darstellung nach Dixon linearisiert werden können (Abbildung 4). Anhand einer solchen Eichgerade ist es dann auch möglich, die

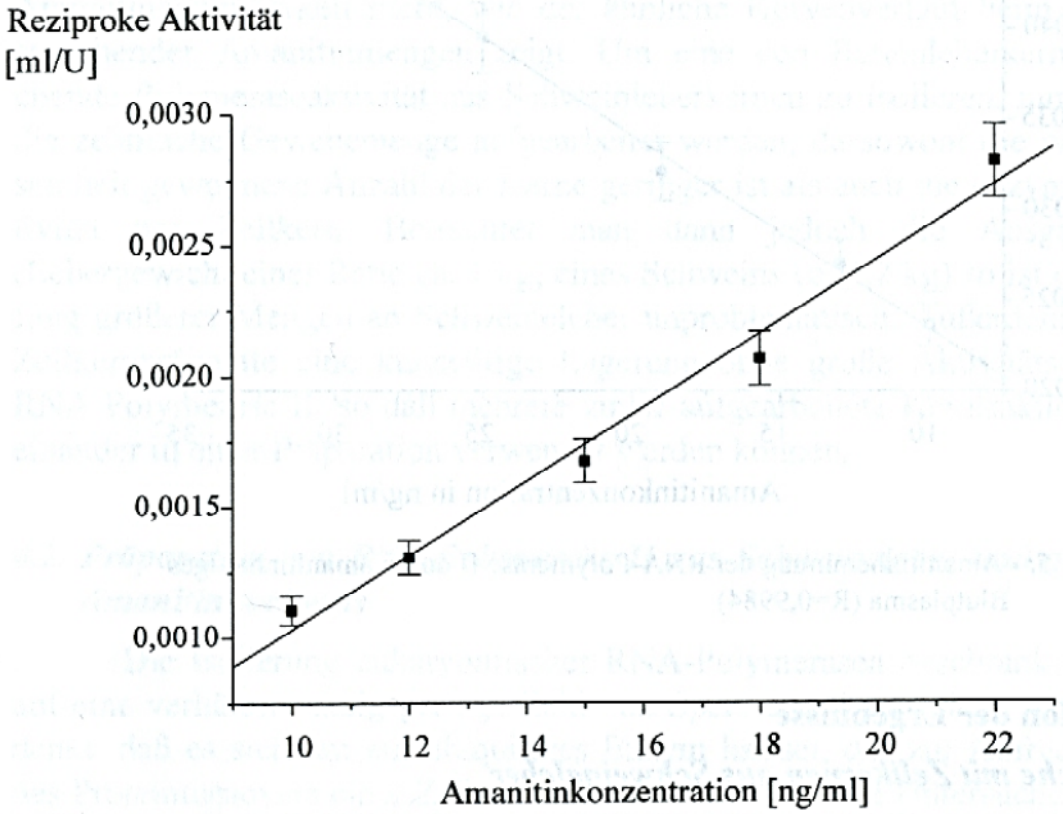

Abb. 4: Hemmung der Polymeraseaktivität durch amanitinhaltige Urinproben Darstellung nach Dixon (R=0,9928)

Amanitinkonzentration einer unbekannten Probe zu bestimmen. Allerdings ist auch hier für jede Messung eine Standardkurve zu ermitteln.

3.5. Amanitinhemmung im Plasma

Für die Amanitinbestimmung in Plasmaproben erhält man ein entsprechendes Ergebnis, das in Abbildung 5 dokumentiert ist. Die Eichkurve umfaßt hier Proben zwischen 10 und 35 ng/ml. Durch die Hemmbarkeit der RNA-Polymerase II lassen sich damit hinreichend kleine Amanitinkonzentrationen in Urin oder Plasma quantitativ erfassen. Der Nachweis ist einfach und relativ schnell durchführbar. Allerdings muß das Enzym stets in hinreichender Aktivität zur Verfügung stehen, d.h. es muß kontinuierlich präpariert werden, da der Verlust bei Lagerung in TG-Puffer (30 % Glycerin) bereits nach drei Wochen bei -80 °C etwa 50 % beträgt. Ein teilweiser Ausgleich ist dann durch Verwendung von mehr Enzymlösung und Zugabe von Glycerin als Stabilisator möglich.

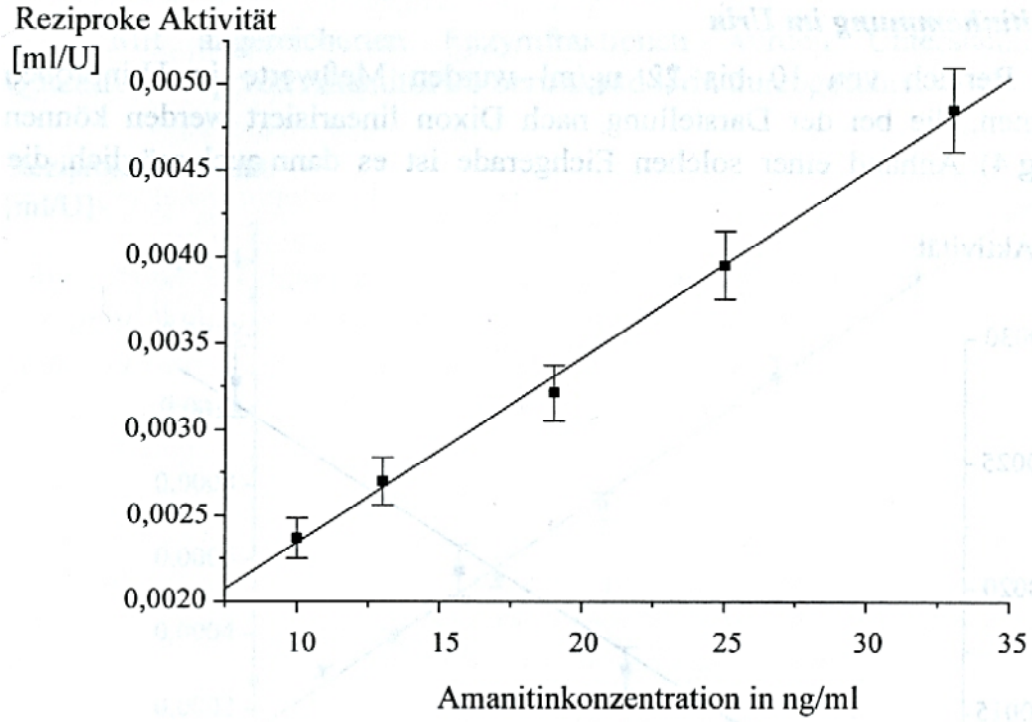

Abb. 5: Amanitinhemmung der RNA-Polymerase II durch amanitinhaltiges Blutplasma (R=0,9984)

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Versuche mit Zellkernen aus Schweineleber

An isolierten Zellkernen ist die Hemmung der RNA-Polymeraseaktivität durch Amanitin deutlich nachweisbar. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen macht die hemmbare Polymeraseaktivität etwa 60 % der Gesamtaktivität aus. Eine derartig starke Hemmung erzielten Machiao und Sonnenbichler in ihren Versuchen zur Hemmbarkeit der Polymeraseaktivität in Zellkernen von Rattenleber nicht (Machiao und Sonnenbichler (1977)[8]), sie betrug dort nur 50 %, da

von jenen Autoren zur Erhöhung der Ionenstärke nur 125 mM Natriumchlorid im Vergleich zu 40 mM Kaliumchlorid und 60 mM Ammoniumsulfat im hier benutzten Reaktionsansatz verwendet wurde. Die höhere Ionenstärke führt aber zu einer Stimulation der Aktivität von RNA-Polymerase II, wie Roeder und Rutter bereits 1969 [11] feststellten, so daß auch deren Hemmung verstärkt wird. Diese ist schon bei extrem kleinen Amanitinkonzentrationen feststellbar, 15 µl zugesetzter Amanitinlösung einer Konzentration von 25 ng/ml entsprechen im Reaktionsansatz mit 100 µl Volumen einer Konzentration von 3,75 ng/ml. Diese führt sowohl bei Schweine- als auch bei Rattenleberkernen zu einer Verminderung der amanitinhemmbaren Aktivität um etwa 50 %. Bereits bei einer Konzentration von 100 ng/ml (dies entspricht 15 ng/ml im Ansatz) erfolgt der Übergang in einen quasi-Sättigungsbereich, d.h. auch bei starker Erhöhung der Inhibitorkonzentration sinkt die Enzymaktivität nur geringfügig, da nur noch wenige hemmbare Moleküle in der Lösung enthalten sind. Bei 100 ng/ml im Ansatz ist nach Definition von Hodo und Blatti mit einer vollständigen Hemmung der RNA-Polymerase II zu rechnen (1977) [6].

Grundsätzlich unterscheiden sich Schweine- und Rattenleberkerne in ihrer Amanitinhemmbarkeit nicht, wie der ähnliche Kurvenverlauf beim Zusatz entsprechender Amanitinmengen zeigt. Um eine den Rattenleberkernen entsprechende Polymeraseaktivität aus Schweinleberkernen zu isolieren, muß allerdings die zehnfache Gewebemenge aufgearbeitet werden, da sowohl die pro Gewichtseinheit gewonnene Anzahl der Kerne geringer ist als auch die enzymatische Aktivität pro Zellkern. Betrachtet man dann jedoch die Ausgangsmengen (Lebergewicht einer Ratte ca. 10 g, eines Schweins ca. 1,2 kg) so ist die Beschaffung größerer Mengen an Schweineleber unproblematisch. Außerdem überstehen Zellkernpräparate eine kurzzeitige Lagerung ohne große Aktivitätsverluste der RNA-Polymerase II, so daß mehrere zuvor aufgearbeitete Kernfraktionen nebeneinander in einer Präparation verwendet werden können.

4.2. Präparation von RNA-Polymerase II aus Schweineleber und quantitativer Amanitinnachweis

Die Isolierung eukaryontischer RNA-Polymerasen beschränkt sich bisher auf eine verhältnismäßig geringe Zahl von Spezies und Geweben, wenn man bedenkt, daß es sich um ein ubiquitäres Enzym handet, das zur Aufrechterhaltung des Proteinturnovers einer Zelle essentiell ist. Die meisten Untersuchungen liegen zu DNA-abhängigen RNA-Polymerasen II aus Kalbsthymus, Weizenkeimen und Hefe vor, die aus diesen Geweben recht früh und in großem Maßstab aufgereinigt wurden. Aus Wirbeltieren isolierte man daneben die Enzyme aus menschlicher Plazenta, Rattenleber und Hennenovidukt sowie aus verschiedenen Zellkulturen (z.B.: MOPC 315). Außerdem hat man Insekten (*Drosophila melanogaster*), Pilze

(*Aspergillus nidulans*) und höhere Pflanzen (Sojabohnen, Blumenkohl) bezüglich ihrer RNA-Polymerasen untersucht.

Zur Gewinnung einer angereicherten Polymerasefraktion, mit der Amanitin über die Hemmung der RNA-Polymerase II quantitativ bestimmt werden kann, wurde das von Kedinger *et al.* 1972 [7] publizierte Verfahren zur Gewinnung von RNA-Polymerase II aus Kalbsthymus modifiziert: Als Ausgangsmaterial diente anstelle von Thymushomogenat eine Kernfraktion aus Schweinelebergewebe. Die daraus hervorgegangene, hier dargestellte Präparation einer angereicherten RNA-Polymerase aus einer reinen Kernfraktion ist in der Literatur in dieser Form nicht beschrieben. Lange bekannt ist hingegen die Stabilisierung der RNA-Polymerase durch hohe Konzentrationen an Glycerin. Stabilisiert man das Enzym nicht, kommt es selbst bei -80 °C zu einem raschen Aktivitätsverlust. Die hohen Glycerinkonzentrationen erschweren allerdings die Handhabung der Enzymlösungen. Die Pipettiergenauigkeit ist zur quantitativen Amanitinbestimung nicht ausreichend, so daß die Enzymlösung eingewogen werden muß. Auch die weiter aufgereinigte Polymerase ist zur Bestimmung der Amanitinkonzentration in Lösungen geeignet.

RNA-Polymerase aus Schweineleberkernen läßt sich im Vergleich zum entsprechenden Kalbsthymusenzym stärker anreichern. Eine Ursache hierfür ist die bessere Elution der Polymerase II vom Anionenaustauscher (DEAE-Cellulose). Während die Schweineleberpolymerase in einem scharfen Peak mit der Proteinfront von der Säule entfernt wird, steigt die Aktivität der Kalbsthymuspolymerase nur langsam an und zeigt einen breiten Peak, der den Proteinpeak überlagert. Da sich die Enzymaktivität aus Kalbsthymus auf zahlreiche Fraktionen verteilt, wird bei der Vereinigung auch deutlich mehr Fremdprotein eingetragen, als dies bei dem schmalen Aktivitätspeak der Leberpolymerase der Fall ist, bei der durch die Chromatographie an DEAE-Cellulose eine gute Aufreinigung erzielt werden kann. Das Elutionsprofil des Kalbsthymusenzyms wird durch das Vorkommen zweier Isoformen der RNA-Polymerase II hervorgerufen, während in Schweineleberkernen anhand des Elutionsprofils von einer homogenen Fraktion auszugehen ist.

In der Literatur ist die Bestimmung von Amanitin durch einen Bioassay bei Preston et al. (1975) [10] beschrieben. Er verwendete zur Quantifizierung von alpha-Amanitin eine nach der Methode von Kedinger et al. angereinigte Kalbsthymuspolymerasefraktion, die unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,08 bis 0,5 M Ammoniumsulfat von der DEAE-Cellulose eluiert wurde. Unter den von ihm gewählten Bedingungen ist eine Linarität des Meßsignals in Abhängigkeit von der Zeit nur bei kurzer Inkubation bis zu 10 Minuten gegeben, folglich nutzte der Autor dieses Zeitintervall für die Polymerasereaktion. Die Verwendung einer geänderten Reaktionsmischung ermöglicht durch Ausdehnung der Reaktionszeit auf 30 Minuten eine Erhöhung des Meßsignals. Den Reaktions-

ansätzen wurden wie bei Preston wäßrige amanitinhaltige Lösungen in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 15 ng Amanitin/ml zugesetzt und die Meßsignale (cpm) durch Auftragung nach Dixon linearisiert (cpm: gemessene Zählrate, dpm: absolute Zählrate, cpm/Zählausbeute = dpm).

Entsprechendes war auch bei der Verwendung des angereicherten Extraktes von Schweineleberpolymerase möglich. Neben wäßrigen Proben wurden insbesondere auch amanitinhaltige Urin- und Plasmaproben untersucht, bei denen ebenfalls die Aufnahme entsprechender Geraden möglich war. Um allerdings eine Probe mit Hilfe des Bioassays zu quantifizieren, muß stets eine Kalibrierung mit amanitinhaltigen Proben bekannter Konzentration durchgeführt werden, da die enzymatische Aktivität der RNA-Polymerase II innerhalb einer Charge stark schwankt. Dann lassen sich aber auch geringe Amanitinkonzentrationen nachweisen. Die Empfindlichkeit des verwendeten Testsystems entspricht der des Radioimmunoassays. Der überprüfte Meßbereich (ca. 10 bis 40 ng/ml) war zwar geringer als der des RIAs (1,5 bis 400 ng/ml), da aber als Kriterium einer Amanitinintoxikation der Nachweis von Konzentrationen über 10 ng/ml Urin erforderlich ist, konnte auch mit dem Enzymtest der relevante Konzentrationsbereich erfaßt werden. Vorteilhaft ist der geringere Zeitaufwand, verglichen mit der Durchführung des quantitativen Amanitin-RIAs. Allerdings stellen die Präparation des Enzyms und dessen Handhabung bzw. Stabilität ein Problem bei der routinemäßigen Anwendung dar. Außerdem wurde bisher nicht untersucht, inwiefern die enzymatische Aktivität durch weitere in Plasma- oder Urinproben enthaltene Komponenten (Alkohol, Toxine) beeinflußt wird, wobei dieses Problem unter Umständen durch weitgehende Verdünnung im Reaktionsansatz (Zusatz von 5 µl amanitinhaltiger Probe zu 95 µl Reaktionsansatz) zufriedenstellend gelöst werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Hemmung von RNA-Polymerase II durch alpha-Amanitin diente als Grundlage zur Entwicklung eines Bioassays alternativ zum Radioimmunoassay, der am häufigsten zur Amanitin-Diagnostik verwendet wird. Zu diesem Zweck war es notwendig, ein partiell angereichertes Präparat von eukaryontischer RNA-Polymerase II darzustellen.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Verfahren (Kedinger 1972, Preston 1975) wurde in der vorliegenden Arbeit von einer Zellkernpräparation aus Leber, dem Zielorgan, ausgegangen. Wegen der Vergleichbarkeit des Verdauungssystems erschien uns die Spezies Schwein besonders geeignet.

Der maximale Anreicherungsfaktor des Enzympräparats betrug 85, bezogen auf die aufgeschlossene Kernfraktion. Bei Stabilisierung der Polymerase mit 59% (w/v) Glycerin ist das Enzym ohne nennenswerten Aktivitätsverlust bei -80° C mindestens 50 Tage haltbar.

Die Aktivität von RNA-Polymerase II wurde anhand des Einbaus von ^{3}H-markiertem Uridintriphosphat unter Verwendung einer Matrize von DNA aus Kalbsthymus bestimmt. Bei Einwirkung von alpha-Amanitin unterbleibt die Synthese von Polynukleotiden. Diese Hemmbarkeit der RNA-Polymerase ist für die Quantifizierung von alpha-Amanitin in biologischem Material (Plasma/Urin) prinzipiell geeignet. Der Empfindlichkeitsbereich beträgt bei exakter Kalibrierung mittels Standardproben 10 bis 40 ng Amanitin pro ml Probe. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Hemmung und Konzentration.

Die Empfindlichkeit des Polymerase-Hemmtests liegt im Erfassungsbereich der kommerziellen RIA-Methode.

6. Literaturverzeichnis

[1] G. A. Bitter: Purification of DNA-Dependent RNA-polymerase II from Saccharomyces cerevisiae. Anal. Biochem. 128 (1983) 294 ff.

[2] M. Dixon, E. C. Webb: in: Enzymes 2nd edition Longmans(1963), London, 296 ff.

[3] H. Faulstich: Amatoxine und Knollenblätterpilzvergiftung. Naturwissenschaften 66 (1979) 410 ff.

[4] L. Fiume, R. Laschi: Lesioi ultrastrutturali prodotte nelle cellule parenchimali epatiche dalla phalloidina e dalla alpha-amanitina. Sperimentale 115 (1965) 288 ff.

[5] L. Fiume, F. Stripe: Decreased RNA content in mouse liver nuclei after intoxication with alpha-amanitin. Biochem. Biophys. Acta, 123 (1966) 643 ff.

[6] H. G. Hodo, S. P. Blatti: Purification using polyethylenimine precipitation and low molecular weight subunit analyses of calf thymus and wheat germ DNA-dependant RNA-polymerase II Activity. Biochemistry, 16/11 (1977) 2334 ff.

[7] Cl. Kedinger, F. Gissinger, M. Gniazdowski, J.-L. Mandel, P. Chambon: Animal DNA-dependent RNA polymerases: 1. Large-scale solubilization and separation of A and B calf-thymus RNA-polymerase. Eur. J. Biochem. 28 (1972)269 ff.

[8] F. Machicao, J. Sonnenbichler: Mechanism of the stimulation of RNA-synthesis in rat liver nuclei by silybin. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für biologische Chemie 358 (1977)141 ff.

[9] M. Meilhac, Cl. Kedinger, P. Chambon, H. Faulstich, M.V. Govidan, Th. Wieland: Amanitin bindung to calf thymus RNA-polymerase B. FEBS Lett. 9 (1970) 258 ff.

[10] J. F. Preston, H. J. Stark, J. W. Kimbrough: Quantitation of amanitins in Amanita verna with calf thymus RNA-polymerase B. Lloydia 38/2 (1975)153 ff.

[11] R. G. Roeder, W. J. Rutter: Multiple Forms of DNA-dependent RNA Poly merase in Eukaryotic Organisms. Nature 224 (1969) 234 ff.

[12] Th. Wieland, H. Faulstich: Fifty years of amanitin. Experientia 47/1 (1991)186 ff.

Astrid Meyboom
Institut f. med. Physik und Biophysik
Humboldt-Universität
Ziegelstr. 5-9
10098 Berlin

Dr. Herwig Weißer
Institut f. Physiologische Chemie,
Medizinische Hochschule
Carl Neuberg Str. 8
30623 Hannover

Dr. Walter Martz
Institut f. Rechtsmedizin,
ZKH St. Jürgen
St. Jürgen Str. 1
28205 Bremen