

Discussion. During the differential centrifugation all fractions were tested for enzymatic activity. There was no activity found in any of the discarded fractions.

In the authors' experience this method has proven rapid, reliable, and simple to perform. The Table demonstrates that after 6 months and 13 months the enzymatic activity was essentially unchanged from the initial determination. The acetone-powder method produces a relatively unstable preparation in Warburg blanks, whereas our method showed no activity in the enzyme blanks. In addition, the influence of acetone on monoaminoxidase is still in doubt³. Finally, preparation of the enzyme from the 'large granular fraction'⁵ where it is found seems a more logical approach than utilizing whole kidney tissue.

Monoaminoxidase activity before and after prolonged storage

Preparation rabbit kidney	Microliters of O ₂ uptake per mg N ₂					% N ₂ per mg dry pre- paration
	10 min	20 min	30 min	60 min	Q_{O_2} (N)	
1.	23	20	24	73	140	4.8
2.	26	25	27	70	148	5.1
3.	20	27	25	76	148	5.3
4.	21	24	24	74	143	5.0
5.	28	31	29	80	168	5.6
6.	25	28	26	74	153	5.0
after 6 months	25	30	26	66	147	5.0
after 13 months	30	29	26	66	151	5.0
7.	26	29	23	78	156	5.1
after 6 months	21	25	28	76	150	5.1
Mean	24.5	26.8	25.8	73.3	150.4	5.1
S. D.	3.2	3.2	1.8	4.8	7.3	0.2

C. GIORDANO, J. BLOOM,
and J. P. MERRILL

Renal Laboratory, Peter Bent Brigham Hospital and Harvard Medical School, Boston (Mass.), December 15, 1959.

Zusammenfassung

Eine einfache Methode zur Gewinnung eines Extraktes (Pulver) von starker Monoaminoxidase-Aktivität aus Hunde- oder Kaninchennieren wird beschrieben. Differenziales Zentrifugieren und rasches Einfrieren sind die wichtigsten Schritte dieser Methode. Die enzymatische Aktivität des Präparates bleibt über mehrere Monate erhalten.

Struktur und Wirkung von muscarinähnlichen Verbindungen

In früheren Arbeiten wurde die grosse Ähnlichkeit der Wirkung des Muscarins und seiner Isomeren mit der des Acetylcholins beschrieben^{1,2}. Besonders Muscaron, welches eine Carbonyl- an Stelle der Hydroxylgruppe im Muscarin besitzt, ist auffallend aktiv auf cholinergische Synapsen im Bereich des peripheren Parasympathicus, der autonomen Ganglien und der Muskelendplatten. Daraus lassen sich Vorstellungen über die Bindung dieser Stoffe am cholinergischen Rezeptor ableiten, nach denen mindestens 3 pharmophore Gruppen (Carbonyl- oder Hydroxylgruppe, Äther-Sauerstoff und quartärer Stickstoff) für eine maximale Wirkung notwendig sind. Diese funktion-

nellen Gruppen müssen in eine mehr oder weniger starke Bindung mit den Pharmorezeptoren bestimmter Substrate treten, damit eine pharmakologische Wirkung zustande kommt.

Wir haben eine Reihe weiterer muscarinähnlicher Verbindungen, bei denen der Tetrahydro-Furanring durch den Thiophanring ersetzt, die Methylseitenkette fehlt oder verlängert oder der Ring nur teilweise hydriert ist, untersucht und können unsere früheren Schlussfolgerungen bestätigen und erweitern.

Zur Prüfung verwendeten wir Katzen als Ganztiere (für die Messung des Carotis-Blutdruckes, der Atmung, der Nickhautkontraktion mit und ohne präganglionäre Sympathicusreizung sowie der Gastrocnemius-Muskelzuckungen nach Reizung des N. ischiadicus) und isolierte Froschorgane ($1/4$ Lähmung des perfundierten Herzens nach STRAUB und submaximale Kontraktion des M. rectus abdominis entsprechend 5 γ /ml Acetylcholin).

Das Ergebnis dieser Versuche ist in der Tabelle zusammengefasst. Wird das Sauerstoffatom im heterocyclischen Ring durch Schwefel ersetzt, sinkt die Wirksamkeit bedeutend, auf 1/1500, ab. Gleichzeitig ist auch der Unterschied zwischen der Wirksamkeit des Thio-Analogon des Muscarins (II) mit Substituenten entsprechend der Konformation im natürlich vorkommenden Muscarin und seiner Epi-Verbindung (III) (Hydroxylgruppe in *cis*-Stellung zu einer der Seitenketten) nicht mehr 100–300fach (Muscarin/Epi-Muscarin¹), sondern nur noch 1,7–2fach. Ein ähnliches Verhalten ist bei *trans*- und *cis*-Desmethyl-Muscarin (VI, VII) und den entsprechenden Thio-Analoga zu beobachten, indem hier der Wirkungsunterschied von 7 auf 2 vermindert wird.

Bemerkenswert ist die 3fache *Wirkungssteigerung* durch Entmethylierung bei den Thio-Analoga (IV, V), während wir früher für die gleiche Veränderung bei Muscarin und dessen Derivaten 100fache Verminderung feststellten³. Kettenverlängerung bis zur Propyl- oder Isobutylgruppe (VIII, IX, X) verkleinert die Aktivität entsprechend dem Volumen und der sterischen Stellung der Substituenten.

Trans-4, 5-Dehydro-Muscarinjodid (XI) ist etwa gleich wirksam wie D,L-Muscarin. Die isomere *cis*-Verbindung (XII) ist etwas weniger aktiv, wobei diese Verminderung ähnlich, aber umgekehrt wie beim Wechsel von Allo-Muscarin zu Epiallo-Muscarin ist.

Diese Resultate können wie folgt diskutiert werden:

Die von JELLINEK⁴ mit Röntgenanalyse ermittelte Raumform des Muscarins ergab, dass das O-Atom des Tetrahydrofuranringes mit den benachbarten C-Atomen einen Bindungswinkel von 109° bildet und von diesen 1,47 Å entfernt ist. Beim 1,4-Dithion beträgt der Bindungswinkel des S-Atoms zu den C-Atomen 99° und die Distanz 1,81 Å⁵. Für das Thio-Analogon des Muscarins (II) ist daher anzunehmen, dass das S-Atom in einem etwas spitzeren Winkel weiter aus dem 5-Ring herausragt als beim Muscarin (Abb.). Dazu kommt, dass der van-der-Waals-Radius für Schwefel 1,85 Å beträgt, für Sauerstoff nur 1,4 Å⁶, so dass das Thiophanringsystem ca. 35% grösser ist.

¹ P. G. WASER, *Exper.* 14, 356 (1958).

² L. GYERMEK und K. R. UNNA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. 98, 882 (1958).

³ G. ZWICKY, P. G. WASER und C. H. EUGSTER, *Helv. chim. Acta* 42, 1177 (1959).

⁴ F. JELLINEK, *Acta cryst.* 10, 277 (1957).

⁵ R. E. MARSH, *Acta cryst.* 8, 91 (1955).

⁶ L. PAULING, *The Nature of the Chemical Bond* (Cornell University Press, Ithaca 1944), p. 64 und 189.

Wirksamkeit bei Katzen, γ /kg i. v. (Minimaldosen)						bei isolierten Froschorganen γ /ml Perfusions- oder Badflüssigkeit	
	Formeln	Blutdruck- senkung	Atmungs- ver- stärkung	Nickhaut- kontrak- tion	Muskel- lähmung (atropinisiert)	Froschherz $\frac{1}{4}$ Lähmung	Froschrectus submaximale Kontraktion
I ^a		0,01	0,05	1,2	>10000	0,02	> 500
II ^b III ^b		15,0 25,0	250 500	>4000 >5000	> 4500 > 5000	500 1000	>2000 >1000
IV ^c V ^c		5,0 10,0	300 200	200 200	> 3000 > 5000	100 200	>1000 >1000
VI ^c VII ^c		1,0 7,0	20 200	100 800	>10000 2000	30 400	— —
VIII ^d IX ^d		0,5 30–100	2 2000	> 200 >2000	> 200 > 2000	50 1000	— —
X ^e		200–400	1–4000	>4000	> 4000	>1000	—
XI ^f XII ^f		0,01 0,02	0,2–1,0 1,0	3 5	> 500 > 500	0,2–0,3 0,4	50 > 100

Die Verbindungen II, III, IV, V, VIII, IX, X wurden von C. H. EUGSTER und K. ALLNER synthetisiert und uns in verdankenswerter Weise zur pharmakologischen Prüfung zur Verfügung gestellt. Für die Verbindungen XI und XII danken wir Herrn Dr. F. HÄFLIGER, J. R. Geigy AG., Basel.

^a D,L-Muscarinjodid [C. H. EUGSTER, *Helv. chim. Acta* 40, 2462 (1957)]. ^b Stellung der Methylgruppe noch nicht abgeklärt. ^c *trans*- und *cis*-Desmethylmuscarinjodid [G. ZWICKY, P. G. WASER und C. H. EUGSTER, *Helv. chim. Acta* 42, 1177 (1959)]. ^d Nicht vollständig isomerenfrei. ^e Transreiches Isomerengemisch. ^f *Trans*- und *cis*-4,5-Dehydromuscaronjodid [R. DENSS, E. GIROD, F. HÄFLIGER und C. H. EUGSTER, *Helv. chim. Acta* 42, 1191 (1959)].

Viel wichtiger ist die grössere Elektronegativität des Ring-Sauerstoffs (3,5) gegenüber Schwefel (2,5), die ersteren befähigt, mit benachbarten Aminen oder Hydroxylgruppen stabile Wasserstoffbrücken zu bilden, die anscheinend für die biologische Wirkung wesentlich sind. Zum S-Atom sind nur sehr schwache Wasserstoffbrücken möglich.

Die 3mal stärkere Wirksamkeit der stereoisomeren Desmethylverbindungen gegenüber den Thio-Analoga des Muscarins kann auch damit erklärt werden, dass die geometrischen Verhältnisse des Thiophanrings verschieden von denen des Tetrahydro-Furanrings sind und damit der Methylsubstituent in einer anderen Lage ist. Vielleicht wird durch die Wasserstoffbrücke des Äther-Sauerstoffs im Muscaron das Rezeptorprotein so deformiert, dass die Methylgruppe des Muscarons genau hineinpasst und diese Deformierung verstärkt. Desmethyl-Muscarin ist dementsprechend 50mal weniger aktiv. Eine Verlängerung der

Acetylcholin-Kette im Muscarin (Propyl- und Isobutylverbindungen) vermindert ebenfalls die Wirkung, wobei anscheinend eine gewisse Stereospezifität gewahrt bleibt. Diese Resultate stimmen mit der für maximale cholinergische Wirkung notwendigen 5-Atomketten-Regel von ALLES und KNOEFEL⁷ sowie ING⁸ überein, ohne dass damit der Methylgruppe eine pharmophore Funktion zugesprochen werden muss⁹.

Aromatisierung des Tetrahydro-Furanrings verändert die Wirksamkeit wenig, wie schon von ING *et al.* für

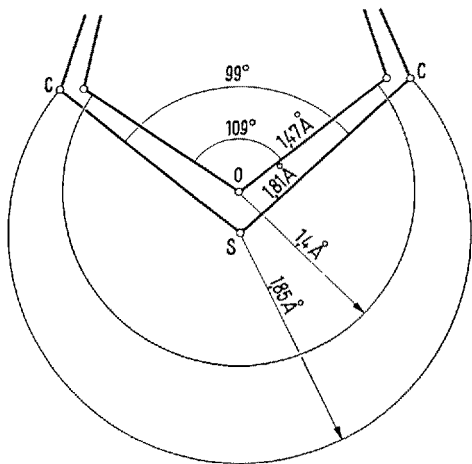
⁷ G. A. ALLES und P. K. KNOEFEL, *Univ. Calif. Publ. Pharmacol.* 1, 187 (1939).

⁸ H. R. ING, *Science* 109, 264 (1949).

⁹ L. GYERMEK und K. R. UNNA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. 128, 30, 37 (1960).

¹⁰ H. R. ING, P. KORDIK und D. P. H. TUDOR WILLIAMS, *Brit. J. Pharmacol.* 7, 103 (1952).

Furfurylverbindungen (5-Methylfurfuryltrimethylammonium und Furfuryltrimethylammonium) festgestellt wurde¹⁰. *Trans*-(4,5)-Dehydro-Muscarin (XI) ist etwa gleich wirksam wie das vollständig hydrierte Muscarin, die *cis*-Verbindung analog dem Epi- oder Epiallo-Muscarin weniger aktiv. Die Stellung der beweglichen basischen Seitenkette hat auf die Wirksamkeit wenig Einfluss, sofern sie nicht in *cis*-Stellung zur Hydroxylgruppe steht. Ähnliche Überlegungen gelten für die Stellung der Methylseitenkette.



Struktur des Tetrahydrofuranringes im Muscarin verglichen mit der wahrscheinlichen Struktur des Tetrahydro-Thiophenhomologen.

P. G. WASER

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich,
18. März 1960.

Summary

Replacing the tetrahydrofuran ring in muscarine by tetrahydrothiophene results in a markedly reduced biological activity. This may be explained by the inability of the sulfur atom to form hydrogen bonds with the cholinergic receptor group. The increase in ring size also affects the position and biological function of the neighbouring methyl group. Aromaticity of the furan ring has little effect on biological activity of muscarine, in contrast to the striking decrease which occurs when methyl or trimethylammonium groups are in *cis*-position with respect to the hydroxy-group.

Paper Electrophoresis of Soluble Proteins of Rat Liver Mitochondria

The presence of soluble proteins in mitochondria has been described recently by several authors. HOGEBOM and SCHNEIDER¹ have succeeded in separating 4 protein components from rat liver mitochondria by ultra-centrifugation of sonically disrupted particles. DE LAMIRANDE *et al.*² have found by free electrophoresis 5 protein fractions in extracts of rat liver mitochondria obtained by incubating the particles for several hours in a barbiturate buffer. CONGIU^{3,4} has recently succeeded in separating by free electrophoresis at least 7 protein components from mitochondria disrupted by a non-ionic tensioactive substance, Triton X-100.

The present paper deals with the paper electrophoresis of soluble proteins from rat liver mitochondria. The

results obtained show the presence in these particles of at least 5 protein components, of 3 lipoproteins, and of 3 glycoproteins.

14 Wistar albino rats were used weighing 160 ± 15 g and fed on a semi-synthetic diet. They were killed by bleeding. The liver was immediately removed and transferred in the cold room at 2°C. Mitochondria were isolated from 5 g of the organ by centrifugation of 25% homogenates prepared in a Potter-Elvehjem type apparatus with 0.25 M sucrose. The centrifugation scheme was the same as that used by CONGIU³. No attempt was made to collect separately the mitochondrial fractions as suggested by DE DUVE *et al.*⁵. Mitochondria were washed once with 0.25 M sucrose and then suspended in 0.5 ml of the Michaelis buffer, prepared according to GRASSMANN *et al.*⁶. Its ionic strength was 0.1 μ and the pH was 8.6. 0.1% Triton X-100 was added to this buffer in order to disrupt mitochondria. The final volume was 1.8 ml. The mixture was stored at 2°C for 15 min and then centrifuged at 20000 g for 15 min. The supernatant fluid was used for paper electrophoresis, immediately after this time. In fact, incubation at room temperature for short time results in a rapid aggregation of the proteins. Whatman No. 1 paper strips 25 cm long and 4 cm wide were used. The extract was placed on previously moistened strips in the amount of 10 μ l in the case of total proteins, of 40 μ l in that of lipo- and glycoproteins. Electrophoresis was run in a plexiglass box with platinum wire electrodes. Michaelis barbiturate-acetate-HCl buffer, ionic strength 0.1 μ and pH 8.6, was the fluid phase. The applied current was 0.2 mA, at 125 V for 12 h at 2°C in the cold room. The strips were then removed and dried in an oven at 95°C for 15 min. Staining of the proteins was made by 1% bromophenol blue in ethanol saturated with HgCl₂. Differentiation of the spots was carried out with 0.1% acetic acid. Lipoproteins were stained by a saturated solution of Sudan Black B in 60% ethanol and differentiated by 60% ethanol. Glycoproteins were detected according to the method of ROMANI⁷.

The optical density of the spots was then read in an Elphor apparatus after treatment of the strips with vaseline oil. Diagrams were constructed with the results obtained. The percentage distribution of single fractions was estimated by measuring on each diagram the area of the Gauss curves corresponding to each peak. The form of the patterns is given in the Figure, in which each of them represents the average of at least 5 measurements.

Paper electrophoresis pattern of total proteins consists of at least 5 components. Relative percentages, $\pm$ standard deviation, were: 15.3 ± 7.4 for peak No. 1, 16.3 ± 5.1 for No. 2, 19.5 ± 1.8 for No. 3, 45.2 ± 12.2 for No. 4, 3.8 ± 2.8 for No. 5. The form of the pattern is comparable with that obtained by CONGIU, who used free electrophoresis. The number of peaks is, however, less than that described by this author. It seems probable that peaks No. 2, 3, and 4 of paper electrophoresis correspond to those described as 'central group' by CONGIU. The form of

¹ G. H. HOGEBOM and W. C. SCHNEIDER, *Science* 113, 355 (1951).

² G. DE LAMIRANDE, C. ALLARD, and A. CANTERO, *Cancer* 6, 179 (1953).

³ L. CONGIU, *G. Biochim.* 8, 261 (1959).

⁴ L. CONGIU, *G. Biochim.*, in press.

⁵ C. DE DUVE, R. GIANETTO, F. APPELMANS, and R. WAITIAUX, *Nature* 172, 1143 (1953).

⁶ W. GRASSMANN, K. HANNIG, and M. KNEDEL, *Dtsch. med. Wschr.* 76, 333 (1951).

⁷ D. ROMANI, *Pr. méd.* 62, 1578 (1954).

⁸ M. A. DIANZANI MOR, *Exper.* 15, 461 (1959).