

m.p. 162–163°, *hexahydro-I* (XII) m.p. 158–159°, and *octahydromorellin* (XIII) m.p. 151–152°. Uptake of hydrogen by (I) in glacial acetic acid above 4M is slow and indefinite but an amorphous *decahydromorellin* (XIV) could be recovered from the reaction product. A stable crystalline *decahydromorellin* (XV) m.p. 125–126° (cf. m.p. 110–111° given by BRINGI et al.<sup>2</sup>) different from (XIV) results by drastic reduction with Raney nickel in ethanol according to the method of MOZINGO et al.<sup>8</sup>. Treatment of (XIV) with nickel under similar conditions gives a *dodecahydromorellin*  $C_{33}H_{48}O_7$  (XVI) m.p. 107°. Reduction of the *bromocompound*  $C_{33}H_{45}O_6Br$  (XVII) m.p. 125–130° (decomposed) resulting from interaction of (XV) and  $PBr_3$  yields a *deoxydecahydromorellin*  $C_{33}H_{46}O_6$  (XVIII) m.p. 141–142° different from the *deoxy compound*  $C_{32-33}H_{44-46}O_6$  (XIX) m.p. 174° formed on treatment of (I), (II), (XIII) or (XIV) with Raney nickel in boiling phenol or cyclohexanol. While (XIV), on alkaline permanganate oxidation, yields acetic (0.33 to 0.4M), *isovaleric* (0.42M) and *isocaproic* (0.48M) acids and a volatile lactone  $C_6H_{10}O_2$  (b.p. 90–95°/30–35 mm, 0.1M) besides  $\alpha$ -methylglutaric acid and other unidentified acids (XV) and (XVIII) form acetic (0.16M) and *isocaproic* (0.46M) acids and only traces of *isovaleric* acid but none of the volatile lactone. Formation of nearly 1M of the combined *isocaproic* and *isovaleric* acids indicates the presence in (XIV) of two distinct aliphatic side chains in contrast to (XV), where the moiety yielding *isovaleric* acid has apparently re-

arranged during the MOZINGO treatment. An *acidic phenol*  $C_{16}H_{22}O_4$  (XX) m.p. 159° (*dimethyl ether*  $C_{18}H_{26}O_4$  (XXI) m.p. 159°), isolated from products of alkali fusion of (XIV) at 290° for 20 min, reacts with semicarbazide and periodic acid, and, on oxidation with alkaline permanganate, splits into  $\alpha$ -hydroxy-*isobutyric* acid. In addition to (XX), a second, neutral *phenol*  $C_{24}H_{30}O_5$  (XXII) m.p. 161° results from (XV) on treatment with ethanolic KOH at 180° for 2 h.

Apart from their similar biological properties, the close structural relationship of morellin to guttiferins<sup>7</sup> is borne out from the formula (I).

**Zusammenfassung.** In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Strukturformel (I) für Morellin vorgeschlagen, die mit der Summenformel  $C_{33}H_{38-38}O_7$  übereinstimmt. Neben der strukturellen Ähnlichkeit zeigen auch biologische Eigenschaften des Morellins (I) dessen Verwandtschaft mit Guttiferin.

D. V. KRISHNA MURTHY and P. L. NARASIMHA RAO

Antibiotics Laboratory, Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore (India), March 13, 1961.

<sup>8</sup> R. MOZINGO, C. SPENCER, and K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. 66, 1859 (1944).

## Über den Einbau $^{14}C$ -markierter Aminosäuren in Zellkernfraktionen aus Meerschweinchenleberzellen *in vitro*

Wie schon früher berichtet wurde<sup>1</sup>, besitzen isolierte Zellkerne aus der Thymusdrüse und Leber der Ratte die Fähigkeit, in Anwesenheit von Glucose radioaktive Aminosäuren in Proteine einzubauen. Dass Aminosäuren auch *in vitro* in verschiedene durch Desoxycholan und Lubrol erhaltene Zellkernfraktionen eingebaut werden, wurde unlängst von RENDI festgestellt<sup>2</sup>.

In dieser Mitteilung berichten wir über den Einbau markierter Aminosäuren in einzelne Zellkernfraktionen, die nach Aufschliessung der Kerne durch fraktioniertes Zentrifugieren erhalten wurden. Der Einbau von  $^{14}C$ -markierten Aminosäuren in diese Fraktionen wurde *in vitro* durchgeführt bei Verwendung intakter Zellkerne, ihrer Homogenate sowie isolierter Zellkernfraktionen. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte nach HOGEBOOM et al.<sup>3</sup>. Das Verfahren verlangte zusätzlich ein 5 min langes Zentrifugieren bei 60 g, um die noch vorhandenen intakten Zellen zu entfernen. Das Zellkernpräparat liess mikroskopisch nicht mehr als 2–3% ganze Zellen erkennen.

Die Leberzellkerne wurden mit radioaktiven Aminosäuren, bei Zusatz von gepufferter Glucose als Energiequelle, inkubiert<sup>1</sup> und nach 30 min in einem Glashomogenisator bei 1500 U/min und 0° 4 min lang homogenisiert. Das Homogenat wurde nachher mit einer gekühlten Zentrifuge in 3 Fraktionen zerlegt. Die erste Fraktion bestand aus unzerstörten Zellen und grösseren Zellbestandteilen, die zweite aus im Mikroskop gut sichtbaren und bei 40000 g während 1,5 h sedimentierenden Partikeln. Die Analyse von Ribonucleinsäure (RNS)<sup>4</sup> und Eiweiss<sup>5</sup> in diesen Partikeln ergab ein Verhältnis (RNS zu Eiweiss) von 0,22. Weder durch Extraktion mit heisser Trichloroessigsäure noch durch die Feulgensche Nuclealreaktion konnte die Anwesenheit von Desoxyribonucleinsäure

nachgewiesen werden. Diese Zellkernteilchen nennen wir Ribonukleoproteid-Partikel (RNP). Der Sedimentüberstand stellte Fraktion 3 dar. Durch Resuspendierung der zwei ersten Fraktionen in Wasser und Zufügen von Trichloroessigsäure zu sämtlichen Fraktionen bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 5% konnten die Proteine abgeschieden und nachher mit den üblichen Methoden<sup>6</sup> gereinigt werden. Ihre Menge wurde bestimmt und die Radioaktivität in einer unendlich dünnen Schicht mit einem Geiger-Müller-Fensterzählrohr gemessen. Die erhaltenen Zahlenwerte sind in Tabelle I A aufgeführt.

Tab. I. Einbau  $^{14}C$ -markierter Aminosäuren in Zellkernfraktionen aus intakten und zerstörten Zellkernen *in vitro*

Nr.	Fraktion	Impulse/h/mg Protein	
		(A) Inkubierung intakter Kerne	(B) Inkubierung zerstörter Kerne
1	Sediment bei 600 g	70	962
2	Sediment bei 40000 g	254	1973
3	Überstand	680	2753

1 ml der Inkubationsmischung hatte folgende Zusammensetzung: 0,5 ml einer Suspension von Zellkernen (intakte oder zerstörte) in 0,25 M Rohrzuckerlösung, die aus 0,5 g Lebergewebe erhalten wurden, 0,25 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3 in 0,25 M Rohrzuckerlösung, 0,2 ml 0,1 M Glucose mit 0,75 mg NaCl, 0,05 ml  $^{14}C$ -markierte Aminosäuren (0,675  $\mu$ C). Inkubiert wurde 30 min bei 37° in offenen Reagenzgläsern.

<sup>1</sup> V. G. ALLFREY, A. E. MIRSKY und S. OSAWA, J. gen. Physiol. 40, 451 (1951).

<sup>2</sup> R. RENDI, Exp. Cell Res. 19, 489 (1960).

<sup>3</sup> G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER und M. J. STRIEBICH, J. biol. Chem. 196, 111 (1952).

<sup>4</sup> M. OGUR und G. ROSEN, Arch. Biochem. 25, 262 (1950).

<sup>5</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

<sup>6</sup> J. L. SIMKIN und T. S. WORK, Biochem. J. 65, 307 (1957).

Um festzustellen, inwiefern die Aminosäureeinbaufähigkeit in zerstörten Zellkernen erhalten bleibt, wurden die Zellkerne mechanisch aufgeschlossen und mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Aminosäuren und Glucose unter den obigen Bedingungen inkubiert, dann fraktioniert und die Radioaktivität der Proteinfraktionen gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle I B zu sehen.

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, haben zerstörte Zellkerne unter den obigen Bedingungen ihre Fähigkeit, Aminosäuren einzubauen, nicht eingebüsst. Dieser Befund weist eindeutig auf das Intaktbleiben des glykolytischen Systems hin. Bemerkenswert ist auch die höhere Einbauintensität zerstörter Zellkerne im Vergleich mit den unbeschädigten Kernen. Diesen Befund konnte man mit der Entfernung einer Barriere, die wahrscheinlich die Zellkernmembran den Aminosäuren gegenüber darstellt, in Zusammenhang bringen. Die grösste Radioaktivität war in beiden Fällen in den RNP-Partikeln und im Überstehenden festzustellen.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Anwesenheit aller drei Zellkernfraktionen zur Proteinsynthese notwendig ist. Die RNP-Partikel wurden zusammen mit Glucose, markierten Aminosäuren und dem Zellkernüber-

stand inkubiert. Unter denselben Bedingungen wurde auch das Überstehende ohne die übrigen Fraktionen inkubiert. Die Messwerte sind in Tabelle II zu sehen.

Aus den erhaltenen Resultaten kann man schliessen, dass zum Einbau der Aminosäuren in Zellkernproteine nicht unbedingt sämtliche Zellkernbestandteile notwendig sind. Die Proteinsynthese in den RNP-Partikeln erfolgt schon in Anwesenheit des Zellkernüberstandes, welcher – wie weitere Versuche ergaben – mit dem cytoplasmatischen Überstand ersetzt werden kann. Wie aus Tabelle II zu ersehen ist, baut auch der Zellkernüberstand nach Entfernung der RNP-Partikel Aminosäuren mit grosser Intensität in die Proteine ein. Obwohl man diesen Einbau auch auf eine unvollkommene Abscheidung der RNP-Partikel zurückführen könnte, so weist doch die weitaus grössere Aktivität des Überstandes gegenüber der der RNP-Partikel auf einen engen Zusammenhang der Aktivität mit den löslichen Proteinen hin. Dieser Befund stimmt gut überein mit den Resultaten von KALF und SIMPSON, anhand welcher der Überstand von zerstörten Mitochondrien nach achtstündigem Zentrifugieren bei 105 000  $g$  die Fähigkeit besass, radioaktives Valin im Verlauf von ein paar Stunden in Proteine einzubauen<sup>7</sup>.

Unsere Versuche weisen darauf hin, dass die durch Zentrifugieren zerstörter Leberzellkerne erhaltenen RNP-Partikel fähig sind Aminosäuren in einem zellfreien System in Proteine einzubauen. Ausserdem deuten sie auch auf das Vorhandensein eines löslichen Systems in den Kernen hin, das fähig ist, die Proteinsynthese in Abwesenheit der Partikel durchzuführen.

Tab. II. Einbau  $^{14}\text{C}$ -markierter Aminosäuren in die RNP-Partikel in Abwesenheit des Zellkernüberstandes und in den Zellkernüberstand allein

Fraktion	Impulse/min/mg Protein			
	Inkubationszeit in min			
	1	10	20	40
RNP-Partikel	48	85	113	148
Zellkernüberstand	276	301	506	407

Zusammensetzung von 10 ml Inkubationsmischung: 1,5 ml in 0,1  $M$  Phosphatpuffer, bei pH 7,3 suspendierte RNP-Partikel (11 mg Eiweiss), 5,4 ml Überstand (6,5 mg Eiweiss), 2,1 ml 0,1  $M$  Glucose mit 7,9 mg NaCl, 1 ml  $^{14}\text{C}$ -markierte Aminosäuren (13,5  $\mu\text{C}$ ). Dieselbe Zusammensetzung hatte auch der Zellkernüberstandansatz, jedoch ohne die RNP-Suspension. Inkubiert wurde bei 37° in offenen Reagenzgläsern. In den entnommenen Proben wurden die RNP-Partikel nach vorheriger dreimaliger Verdünnung mit 0,25  $M$  Rohrzuckerlösung unter Zusatz von nicht-radioaktiven Aminosäuren abzentrifugiert.

## Studies on Enzymic $\beta$ -Hydroxylation of Phenylethyl Amines<sup>1</sup>

It has previously been reported that several phenylethylamines inhibit the conversion of dopamine to norepinephrine, by dopamine- $\beta$ -oxidase. In order to establish the nature of the inhibition, three of the amines, namely phenylethylamine, 3-methoxydopamine, and *dl*- $p$ -hydroxy- $\alpha$ -methylphenyl-4-ethylamine (*p*-hydroxyamphetamine) were investigated as possible substrates of dopamine- $\beta$ -oxidase. These amines were added to a mixture which contained the following components (in  $\mu M$ ): potassium phosphate buffer, pH 6.4, 100; (1-methyl-2-phenyl)-ethyl hydrazine hydrochloride, 1.3; ascorbic acid, 6; fumaric acid, 10; ATP, 12.5. To this mixture 0.2 ml of the enzyme was added<sup>2</sup> and the final volume was adjusted with phosphate buffer pH 6.4 to 1 ml. The reaction mixture was incubated for 20 min at 37°C using air as a gas phase. At the end of the period of the incubation, the reaction

**Summary.** The incorporation of  $^{14}\text{C}$ -amino acids into ribonucleoprotein particles obtained by differential centrifugation of mechanically disintegrated liver cell nuclei was demonstrated *in vitro*. Nuclear supernatant revealed also very remarkable incorporation.

P. SZAFAŃSKI und H. WEHR

*Institut für Biochemie und Biophysik, Polnische Akademie der Wissenschaften und Lehrstuhl für physiologische Chemie, Medizinische Hochschule, Warschau (Polen), 16. Januar 1961.*

<sup>7</sup> G. F. KALF und M. V. SIMPSON, J. biol. Chem. 234, 2943 (1959).

was stopped by the addition of 0.5 ml of 3% trichloroacetic acid. The precipitated proteins were removed by centrifugation and the supernatant fluid was assayed for the reaction products.

**Hydroxylation of Phenylethylamine.** The deproteinized incubation mixture which contained phenylethylamine as a substrate was passed through a Dowex-50  $\text{H}^+$  column and the absorbed amines were eluted with 3*N*  $\text{NH}_4\text{OH}$ . After evaporation in vacuum, the residue was submitted to two dimensional chromatography using butanol acetic acid and isopropyl alcohol-aqueous ammonia as solvent systems. A spot having the same  $R_f$  value and yielding the same color reaction with ninhydrin as authentic phenylethanolamine was obtained (Table).

<sup>1</sup> This work was supported by grants from the National Institutes of Health.

<sup>2</sup> The enzyme was prepared by the method of E. Y. LEVIN et al.<sup>3</sup> but the purification on calcium phosphate gel was omitted.