

Um festzustellen, inwiefern die Aminosäureeinbaufähigkeit in zerstörten Zellkernen erhalten bleibt, wurden die Zellkerne mechanisch aufgeschlossen und mit ^{14}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 einzubauen⁷.

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.

Summary. The incorporation of ^{14}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. SZAFRAŃSKI und H. WEHR

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

⁷ G. F. KALF und M. V. SIMPSON, *J. biol. Chem.* 234, 2943 (1959).

Tab. II. Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in die RNP-Partikel in Anwesenheit 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}C -markierte Aminosäuren (13,5 μC). 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 β -Hydroxylation of Phenylethyl Amines¹

It has previously been reported that several phenylethylamines inhibit the conversion of dopamine to norepinephrine, by dopamine- β -oxidase. In order to establish the nature of the inhibition, three of the amines, namely phenylethylamine, 3-methoxydopamine, and *dl*- p -hydroxy- α -methylphenyl-4-ethylamine (*p*-hydroxyamphetamine) were investigated as possible substrates of dopamine- β -oxidase. These amines were added to a mixture which contained the following components (in μM): 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 added² 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

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 H^+ column and the absorbed amines were eluted with 3 N NH_4OH . 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).

¹ This work was supported by grants from the National Institutes of Health.

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

Hydroxylation of 3-Methoxy- H^3 dopamine⁴. The deproteinized incubation mixture which contained 3-methoxy- H^3 dopamine as a substrate was adjusted to pH 4 and the amines present in the mixture were separated as previously described⁶. The acetylated amines were chromatographed in the Bush C solvent system and were scanned for radioactive zones. Two radioactive zones were detected. One radioactive zone had the same mobility as acetylated 3-methoxy dopamine, and the other as acetylated 3-methoxy norepinephrine. The radioactive zone with the same mobility as 3-methoxy-norepinephrine was eluted and diluted with non-radioactive acetylated 3-methoxy norepinephrine and rechromatographed in the Bush C solvent system. All the radioactivity was found to be associated with acetylated 3-methoxy norepinephrine.

Hydroxylation of Hydroxyamphetamine. The amines present in the deproteinized incubation mixture which contained hydroxyamphetamine as a substrate were acetylated and subsequently chromatographed in the Bush C solvent system. A spot having the same Rf value and yielding the same color with diazotized sulfanilic acid as authentic *p*-hydroxyphenyl propanolamine was obtained (Table).

Chromatographic separation of substrate from enzymatic formed β -hydroxylated product

Substrate	Product	Rf value		Color reaction on paper	
		Substrate	Product	Substrate	Product
Phenylethyl amine	phenyl-ethanol amine (α -phenyl- β -amino ethanol)	0.63 ^a	0.55 ^a	brown	blue
3-methoxy- H^3 dopamine	3-methoxy- H^3 norepinephrine	0.9 ^b	0.42 ^b	—	—
<i>dl-p</i> -hydroxy- α -methyl-phenylethylamine (<i>p</i> -hydroxy-amphetamine)	<i>dl-p</i> -hydroxy- α -methyl-phenyl- β -amino ethanol	0.75 ^b	0.31 ^b	red	yellow

^a The solvent system was butanol acetic acid water.

^b The acetylated compounds were chromatographed in the 'C' solvent system of Bush¹⁰.

The *in vitro* β -hydroxylation of phenylethylamine, 3-methoxy dopamine and *p*-hydroxyamphetamine may also occur *in vivo* and represent an important metabolic path for these compounds. It is possible that the pharmacological activity of phenylethylamine and *p*-hydroxyamphetamine is a result of the β -hydroxylation of these compounds to the corresponding hydroxy derivatives. In this connection it may be interesting to report that rats pretreated with ipronazid and then treated with phenylethanolamine or with phenylethylamine show severe excitation.

Although the conversion of 3-methoxy dopamine to 3-methoxy-norepinephrine occurs to a lesser degree than the conversion of dopamine to norepinephrine⁷, it is possible that some of the 3-methoxy norepinephrine formed *in vivo* derives from the 3-methoxy dopamine and not as previously assumed only from norepinephrine.

Since it has been previously shown that amphetamine like *p*-hydroxyamphetamine inhibits the conversion of dopamine to norepinephrine⁸ it may be assumed therefore that amphetamine is also a substrate of dopamine β -oxidase.

Finally, the present findings show that a quinoid structure is not a requirement for enzymic β -hydroxylation, and therefore, in its biogenesis norepinephrine need not pass through a quinoid intermediate as previously postulated⁹.

Zusammenfassung. Phenylethylamin, 3-Methoxy-dopamin und *p*-Hydroxyamphetamin werden durch Dopamin- β -oxidase in die entsprechende β -Hydroxy-Verbindung umgewandelt.

M. GOLDSTEIN and J. F. CONTRERA

Department of Psychiatry and Neurology, Neurochemistry Laboratory, New York University College of Medicine, New York, May 2, 1961.

³ E. Y. LEVIN et al., J. biol. Chem. 235, 2080 (1960).

⁴ The 3-methoxy- H^3 dopamine was prepared enzymatically by the method of J. AXELROD et al.⁵

⁵ J. AXELROD et al., J. biol. Chem. 233, 697 (1958).

⁶ M. GOLDSTEIN et al., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 137 (1960).

⁷ M. GOLDSTEIN et al., to be published.

⁸ M. GOLDSTEIN et al., Biochem. Pharmacol., in press.

⁹ S. SENOH et al., J. Amer. chem. Soc. 81, 6236 (1959).

¹⁰ I. E. BUSH, Biochem. J. 50, 370 (1951).

16- β -Methylprednisone from Hecogenin

On the basis of recent reports¹⁻³, we have studied a new synthetic way to obtain 17-hydroxy-16 β -methyl-5 α -pregnane derivatives in order to prepare 16 β -methylprednisone starting from 5 α -pregn-16-en-3 β -ol-11, 20-dione acetate (I), easily available from hecogenine⁴⁻⁶.

Compound I was methylated at C-16 both with diazomethane (through the intermediate pyrazoline) and with a new method^{7,8}. The 16-methyl-5 α -pregn-16-en-3 β -ol-11, 20-dione acetate treated with H_2O_2 in alkaline medium yielded the 16 α , 17 α -epoxy derivative (II), m.p. 178–183°, $[\alpha]_D + 88.5^\circ$ ($CHCl_3$), $+ 79.5^\circ$ (dioxane); Anal. calc. for $C_{22}H_{32}O_4$: C 73.3; H 8.95; found: C 73.51; H 8.99. When reacted upon with *p*-toluenesulfonic acid in benzene, II rearranged into 16-methylene-5 α -pregn-3 β , 17 α -diol-11, 20-dione (III), m.p. 273–278°, $[\alpha]_D - 10.2^\circ$ ($CH_3OH:CHCl_3$ 1:1), Anal. calc. for $C_{22}H_{32}O_4$: C 73.3; H 8.95; found: C 73.30; H 8.81. Hydrogenation of III with 5% palladium

on calcium carbonate in methanol gave 16 β -methyl-5 α -pregn-3 β , 17 α -diol-11, 20-dione (IV), m.p. 260–266°, $[\alpha]_D + 71^\circ$ (dioxane); Anal. calc. for $C_{22}H_{34}O_4$: C 72.89;

¹ D. TAUB, R. D. HOFFSOMMER, H. L. SLATES, C. H. KUO, and N. L. WENDLER, J. Amer. chem. Soc. 82, 4012 (1960).

² G. NOMINÉ, D. BERTIN, and A. PIERDET, Tetrahedron 8, 217 (1960).

³ D. N. KIRK, V. PETROW, M. STANSFIELD, and D. M. WILLIAMSON, J. chem. Soc. 1960, 2385.

⁴ E. M. CHAMBERLAIN, W. V. RUYLE, A. E. ERICKSON, J. M. CHERMERDA, L. M. ALMINOSA, R. L. ERICKSON, G. E. SITA, and M. TISHLER, J. Amer. chem. Soc. 73, 2396 (1951).

⁵ C. DJERASSI, E. BATRES, J. ROMO, and G. ROSENKRANZ, J. Amer. chem. Soc. 74, 3634 (1952).

⁶ A. F. B. CAMERON, R. M. EVANS, J. C. HAMLETT, J. S. HUNT, P. G. JONES, and A. G. LONG, J. chem. Soc. 1955, 2807.

⁷ P. DE RUGGIERI, Farmaco, Ed. sci. 16, 58 (1961).

⁸ K. HEUSLER, J. KEBRLE, C. MEYSTRE, H. UEBERWASSER, P. WIELAND, G. ANNER, and A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 42, 42, 2043 (1959).