

## Chemie und Biosynthese der freisetzen- und hemmenden Hypothalamus-Neurohormone<sup>[\*\*]</sup>

Von Karl Folkers, Nils-Gunnar Johansson,  
Fred Hooper, Bruce Currie, Hans Sievertsson,  
Jaw-Kang Chang und Cyril Y. Bowers<sup>[\*]</sup>

Der Hypothalamus scheidet Hormone aus, welche ihrerseits die Sekretion von Hormonen aus dem Hypophysen-Vorderlappen beeinflussen. Bis jetzt rechnet man mit sieben freisetzen- und drei hemmenden Hormonen („releasing hormones“) und drei hemmenden Hormonen („inhibiting hormones“) aus dem Hypothalamus. Alle diese Neurohormone sind Oligopeptide. Sie kommen im Hypothalamus nur in Nanogramm-Mengen vor. Anhaltspunkte für ihre Wirkungsweise wurden u. a. durch das Studium synthetischer Analoga gewonnen.

### 1. Zusammenfassung

#### 1.1. Übersicht

Der Hypothalamus ist ein Bereich des Gehirns, der bei Säugetieren wesentliche physiologische Funktionen ausübt und besonders die Hormonsekretion aus dem Hypophysen-Vorderlappen beeinflusst. Die vorläufige Liste der Hypothalamus-Neurohormone umfaßt sieben freisetzen- und drei hemmende Hormone („releasing hormones“) und drei hemmende Hormone („inhibiting hormones“).

Das Thyreotropin-freisetzen- Hormon (TRH) und das Hormon, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt

(LHRH), sind isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt worden. TRH ist ein Tripeptid, pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>, und LHRH ist ein Decapeptid, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>. TRH und LHRH sind durch Kombinationen von klassischen Reaktionen und Festphasensynthesen dargestellt worden.

Es wurde allgemein angenommen, daß eine „einheitliche“ Beziehung zwischen den Hormonen des Hypothalamus und denen der Hypophyse besteht, d. h. daß ein Hypothalamus-Hormon ein Hypophysen-Hormon reguliert. Von diesem „Einheitskonzept“ könnte es jedoch auch Ausnahmen geben.

LHRH setzt sowohl das Luteinisierende Hormon (LH) als auch das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) frei und wurde deswegen als Gonadotropin-freisetzen- Hormon bezeichnet. TRH setzt Thyreotropin und Prolactin frei; derzeit wird geprüft, ob es für beide dieser Hypophysen-Hormone der wesentliche Regulator ist.

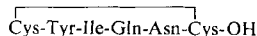
Ein aus dem Hypothalamus isoliertes Peptid, Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala, wurde als Hormon (GHRH) vorgeschlagen, welches das Wachstumshormon (GH) freisetzt, doch ist dieses Decapeptid bei radioimmunologischen Tests auf die Freisetzung des Wachstumshormons

[\*] Dr. K. Folkers, N.-G. Johansson, F. Hooper, B. Currie,  
H. Sievertsson und J.-K. Chang  
Institute for Biomedical Research,  
The University of Texas at Austin  
Austin, Texas 78712 (USA)  
C. Y. Bowers  
Tulane University, School of Medicine  
New Orleans, Louisiana 70112 (USA)

[\*\*] Hypothalamus-Hormone, 42. Mitteilung. Dieser Fortschrittsbericht ist eine erweiterte und auf den neuesten Stand gebrachte Fassung eines Vortrages von K. Folkers bei der Quebec Conference and Exhibition in Canada am 5. Juni 1972.

im wesentlichen inaktiv; das Peptid scheint also nicht als GHRH zu fungieren.

Es wurden zwei Peptide isoliert, welche die Freisetzung des Melanocyten-stimulierenden Hormons (MSH) hemmen. Das eine ist Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, das andere Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>. Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> konnte allerdings bei den Versuchen anderer Forscher die MSH-Freisetzung nicht hemmen. Diese Bearbeiter schlossen, daß die Natur des hemmenden Hormons (MRIH) unsicher ist, daß es sich aber bei der Ratte um Tocinsäure



oder ein verwandtes Peptid handeln könnte. Tocinsäure hemmt die Freisetzung von MSH in Amphibien-Hypophysengewebe nicht. Das Pentapeptid H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-OH ist dagegen in der Lage, das Melanocyten-stimulierende Hormon freizusetzen.

Versuche zur Biosynthese von TRH und LHRH mit markierten Aminosäuren in Systemen aus Hypothalamusgewebe ergaben, daß daran anscheinend lösliche Enzyme, aber keine DNA/RNA-abhängigen Reaktionen beteiligt sind.

Das Tetrapeptid pGlu-Tyr-Arg-Trp-NH<sub>2</sub> war das erste synthetische Peptid mit LHRH-Aktivität. Das ist bemerkenswert, denn die Positionen von Tyr- und Trp- in diesem Tetrapeptid unterscheiden sich von denen in LHRH. Bei TRH könnten sowohl die  $\pi$ -Elektronen als auch die Basizität von protoniertem His- notwendig für die Thyreotropin-Freisetzung sein; die Freisetzung könnte auf einer Komplexbildung und/oder einem ionischen Mechanismus unter Beteiligung eines negativ geladenen Receptors beruhen. Die Arg<sup>8</sup>-Gruppierung in LHRH ist anscheinend wichtig für die Aktivität und die Stärke dieses freisetzenden Hormons. Das protonierte Arg- im LHRH könnte aufgrund seiner positiven Ladung eine ähnliche Rolle wie protoniertes His- in TRH bei der Freisetzung nach einem ionischen Mechanismus spielen.

Bei den TRH- und LHRH-Analoga lassen sich zwei Kategorien unterscheiden. Einige Analoga sind in bis zu 100-fach stärkerer Dosierung als das natürliche Hormon aktiv. Aktivitätsdifferenzen in dieser Größenordnung könnten vor allem auf der Struktur der Analoga beruhen. Wird die 10000-fache oder eine noch höhere Dosis der Analoga benötigt, könnten die unterschiedlichen Aktivitäten auf Änderungen des Hormonmoleküls und des Receptors zurückzuführen sein.

Substanz P wurde als Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> erkannt; als Bestandteile von Neurokinin wurden pGlu-, 1 Lys-, 2 Arg-, 1 Asp-, 1 Glx-, 2 Pro-, 1 Ile-, 2 Leu- und 2 Tyr- mitgeteilt. Diese beiden Peptide werden zwar nicht den Hypothalamus-Neurohormonen zugerechnet, lassen sich aber aus Hypothalamusgewebe und anderen Geweben aus dem Zwischenhirn erhalten. Die Neurokinin-Sequenz beginnt mit pGlu-. Substanz P fördert die Speichelabsonderung, Neurokinin wirkt u. a. blutdrucksenkend.

Die neuen Hypothalamus-Neurohormone lassen neue therapeutische Fortschritte erwarten.

## 1.2. Hypothalamus und Hypophyse

Der Hypothalamus ist ein kleines Gebiet des Zwischenhirns (Diencephalon), welches den hinteren Teil des Prosencephalons bildet<sup>[1]</sup>. Das Prosencephalon besteht aus Hypothalamus, Thalamus, Metathalamus und Epithalamus. Der Hypothalamus wird nicht als abgegrenztes Organ angesehen, sondern vielmehr als ein Bereich des Gehirns, der viele physiologische Aspekte der Säugetiere wesentlich beeinflusst.

Vom Hypothalamusgewebe scheinen hormonale Wirkungen auszugehen, die zur Regulation vieler grundlegender Lebensfunktionen beitragen und außerdem das Verhalten beeinflussen. Während die Hypothalamusregion des Gehirns nur ein Teil eines komplizierten anatomischen Systems ist, sind ihre Funktionen von strategischer Bedeutung, so daß eine Störung schwerwiegende Folgen haben kann. Der Hypothalamus muß als Bestandteil einer Anzahl komplizierter neuraler Systeme betrachtet werden, die Hirnstamm, Großhirnhälften und andere Teile des Zwischenhirns umfassen. Vermutlich wird er durch die großen sensorischen Systeme des Gehirns beeinflusst, wobei auch Einflüsse von Thalamus und Großhirnrinde eine Rolle spielen, die für Verhaltensweisen und autonome Reaktionen verantwortlich sind.

Zwischen Hypothalamus und Hypophyse befindet sich ein weiteres Gewebe<sup>[1]</sup>.

Der Hypothalamus beeinflusst die Sekretion des Hypophysen-Vorderlappens. Diese Beziehung zwischen Hypothalamus und Hypophyse wirkt sich auf Schilddrüse, Nebennieren, Hoden, Eierstöcke, Knochen usw. aus.

Hypothalamus und Hypophyse stehen durch neurale Sekretionen oder Neurohormone miteinander in Beziehung. Vom Hypothalamus ausgehende Nervenfasern – beim Mensch schätzungsweise 100000 – enden im Hypophysen-Hinterlappen und setzen dort die Nonapeptide Vasopressin und Oxytocin frei. Andere vom Hypothalamus ausgehende Nervenfasern enden im Gewebe zwischen Hypothalamus und Hypophyse in der Nähe von Kapillaren, die mit den Blutgefäßen des Hypophysen-Vorderlappens in Verbindung stehen. Der Blutstrom in ihnen befördert die freisetzenden und hemmenden Hormone, denen dieser Fortschrittsbericht gewidmet ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Nonapeptide Vasopressin und Oxytocin Neurohormone sind, die von Nervenzellen abgesondert werden und im Hypophysen-Hinterlappen wirken. Die freisetzenden und hemmenden Hormone werden durch ein Netzwerk von Kapillaren transportiert und wirken im Hypophysen-Vorderlappen. Vasopressin, Oxytocin, TRH und LHRH sind Peptide von relativ niedrigem Molekulargewicht, d. h. sie bestehen aus neun, neun, drei bzw. zehn Aminosäuren.

## 2. Freisetzende und hemmende Hypothalamus-Hormone

Die Neurohormone aus dem Hypothalamus, die im Hypophysen-Vorderlappen wirken, wurden von *Hinsey*<sup>[2]</sup> sowie *Green* und *Harris*<sup>[3]</sup> postuliert und zwischen 1937 und 1949

von vielen Forschern untersucht. Während der nächsten zwanzig Jahre nahm man aufgrund biologischer Daten über die Freisetzung der entsprechenden Hormone aus dem Vorderlappen sieben Hypothalamus-Hormone an. Zusätzlich wurden drei Faktoren oder Hormone aus dem Hypothalamus postuliert, welche offensichtlich die Freisetzung der entsprechenden Hormone aus dem Vorderlappen unterbinden. Jahrelang war man allgemein der Ansicht, daß jeweils ein Hypothalamus-Hormon ein Hormon im Hypophysen-Vorderlappen kontrolliert; nach neueren Ergebnissen könnte dieses „Einheitskonzept“ jedoch Ausnahmen haben, und zwar derart, daß ein Hypothalamus-Hormon die beiden Hypophysen-Hormone LH und FSH (Luteinisierendes Hormon bzw. Follikel-stimulierendes Hormon) und ein anderes Hypothalamus-Hormon Thyreotropin und Prolactin freisetzt. Die Beweise für diese beiden Fälle doppelter Freisetzung könnten aber noch unvollständig sein, so daß das „Einheitskonzept“ nicht notwendigerweise durchbrochen sein muß.

Tabelle 1. Vorläufige Liste der freisetzenden und hemmenden Hypothalamus-Hormone (Literaturzitate siehe Text).

| Freisetzende Hormone (oder Faktoren) („releasing hormones“)  |                 |
|--|-----------------|
| Name   | Abkürzung       |
| 1. Thyreotropin-freisetzendes Hormon (Thyrotropin releasing hormone)   | TRH, TRF        |
| 2. Hormon, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt (Luteinizing hormone releasing hormone)                      | LRH, LHRH, LRF  |
| 3. Hormon, welches das Follikel-stimulierende Hormon freisetzt (Follicle stimulating hormone releasing hormone)      | FRH, FSHRH, FRF |
| 4. Corticotropin-freisetzendes Hormon (Corticotropin releasing hormone)  | CRH, CRF        |
| 5. Wachstumshormon-freisetzendes Hormon (Growth hormone releasing hormone)   | GRH, GHRH, GRF  |
| 6. Prolactin-freisetzendes Hormon (Prolactin releasing hormone)  | PRH, PRF        |
| 7. Hormon, welches das Melanocyten-stimulierende Hormon freisetzt (Melanocyte stimulating hormone releasing hormone) | MRH, MSHRH, MRF |
| Hemmende Hormone (oder Faktoren) („inhibiting hormones“)   |                 |
| Name   | Abkürzung       |
| 1. Hormon, welches die Freisetzung des Wachstumshormons hemmt (Growth hormone inhibiting factor)                     | GIF             |
| 2. Hormon, welches die Prolactin-Freisetzung hemmt (Prolactin inhibiting factor)                                     | PIF             |
| 3. Hormon, welches die Freisetzung des Melanocyten-stimulierenden Hormons hemmt (Melanocyte inhibiting factor)       | MRIF, MIF, MRIH |

Die Neurohormone des Hypothalamus sind unter der Bezeichnung „Faktoren“ bekannt geworden; da aber Chemie und Biologie dieser Substanzen die Bedingungen für Hormone erfüllen, sollte die alte Nomenklatur modernisiert und der Name „Hormone“ verwendet werden.

In Tabelle 1 sind die sieben postulierten, von vielen Forschern untersuchten freisetzenden Hormone zusammengestellt. Diese Liste basiert auf dem Konzept, daß ein Hypo-

thalamus-Hormon ein Hypophysen-Hormon freisetzt. Man darf erwarten, daß der Liste weitere Hypothalamus-Hormone hinzugefügt werden können, wenn sie sich biologisch charakterisieren lassen. Auch die drei hemmenden Hypothalamus-Hormone sind in Tabelle 1 aufgeführt. Diese Zusammenstellung basiert ebenfalls auf dem „Einheitskonzept“.

## 2.1. Freisetzende Hypothalamus-Hormone mit gesicherter Struktur

### 2.1.1. Isolierung

Die Isolierung selbst des ersten dieser Hypothalamus-Hormone in reiner Form gelang erst nach vieljährigen Bemühungen. Schuld an den außerordentlichen Schwierigkeiten trugen mindestens zwei Situationen: Im Hypothalamusgewebe eines Tieres scheinen nur Nanogramm-Mengen der freisetzenden Hormone vorzuliegen, und außerdem wiegt das Hypothalamusfragment z. B. eines Schweins höchstens 500 mg. Demnach mußten im Schlachthof hunderttausende der korrekten, winzigen Gewebestückchen von der entsprechenden Anzahl Schweine, Schafe oder anderer Schlachttiere entnommen werden. Die Isolierung von Milligramm-Mengen eines reinen Hormons aus diesen hunderttausenden Hypothalami – eine Voraussetzung für die Strukturaufklärung – war eine mühevoll Aufgabe.

Mit der schwierigen Isolierung verknüpft war das Problem von in-vivo- und/oder in-vitro-Testverfahren für die biologische Überwachung der chemischen Isolierung. Diese Tests mußten entworfen und verfeinert werden; oft waren sie kompliziert und manchmal von zweifelhafter Signifikanz oder sogar Spezifität. Es ist richtig vorausgesagt worden, daß zuerst die chemische Struktur des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (TRH) aufgeklärt werden würde, denn es hatte sich aus den Untersuchungen vieler Forscher ein guter Test ergeben, der als Wegweiser bei der Isolierung dieses Hormons dienen konnte.

Die Isolierung des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (TRH) von Schweinen wurde schließlich von *Schally et al.*<sup>[4]</sup> mitgeteilt; die Isolierung des entsprechenden Hormons aus Schafs-Hypothalamusgewebe beschrieben *Burgus und Guillemin*<sup>[5]</sup>. Über die Isolierung des Hormons (LHRH) von Schweinen, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt, berichteten *Schally et al.*<sup>[6]</sup>, über die des entsprechenden Schafs-Hormons *Amoss et al.*<sup>[7]</sup>.

Nachdem nun die chemische Struktur dieser beiden freisetzenden Hypothalamus-Hormone gesichert ist, sollten die chemischen und biologischen Untersuchungen zur Strukturaufklärung der anderen Hypothalamus-Hormone leichter geworden sein – nicht nur in der Planung, sondern auch in der Ausführung im Laboratorium. Während die zahlreichen chemischen Schritte und die unzähligen biologischen Tests, die zur Gewinnung weiterer Hormone nötig sind, vielleicht etwas weniger mühselig als bei TRH und LHRH sein werden, steht es außer Frage, daß die Isolierung weiterer Hormone wahrhaft gewaltige Anstrengungen erfordern und von Schwierigkeiten aller Art begleitet sein wird. Außerdem dürfen die Probleme der Finanzierung dieser Bemühungen nicht unterschätzt werden.

### 2.1.2. Zur chemischen Struktur

Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur der freisetzenden Hypothalamus-Hormone, bei denen sie gesichert ist. Das Thyreotropin-freisetzende Hormon (TRH) ist ein Tripeptid. TRH setzt Thyreotropin aus dem Hypophysen-Vorderlappen frei, das seinerseits auf die Schilddrüse einwirkt. Später fand man, daß TRH auch Prolactin freisetzt (siehe Abschnitt 4). Das zweite freisetzende Hypothalamus-Hor-

In Abbildung 1 wurden die Strukturen von TRH und LHRH als gesichert bezeichnet. Anders ist die Situation in Abbildung 2, in der Strukturen für ein hemmendes Hypothalamus-Hormon und ein weiteres freisetzendes Hormon vorgeschlagen werden. In diesen beiden Fällen sind einige Angaben über die chemische Struktur und die Hormonwirkung nicht eindeutig, und es scheinen Artefakte möglich zu sein.

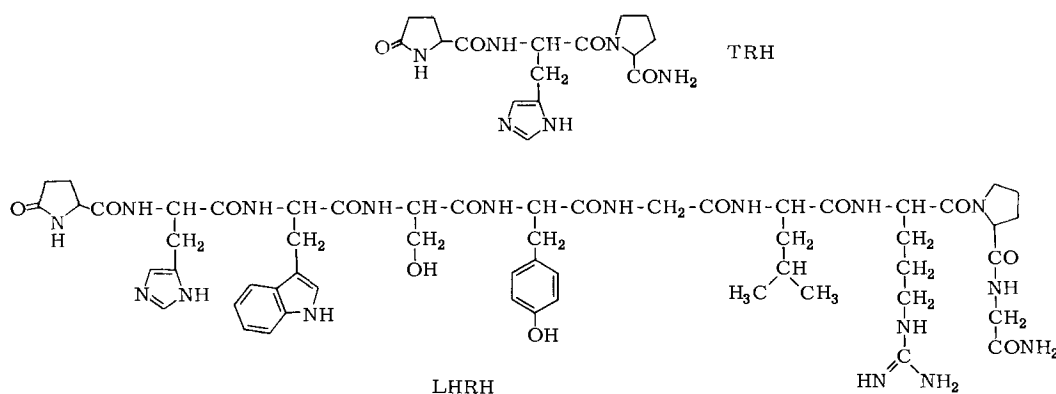


Abb. 1. Freisetzende Hypothalamus-Hormone mit gesicherter Struktur. Oben: Thyreotropin-freisetzendes Hormon (TRH), pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>. Unten: Hormon, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt (LHRH), pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>.

mon mit gesicherter Struktur ist das Hormon (LHRH), welches das Luteinisierende Hormon freisetzt.

Es ist interessant, daß das eine freisetzende Hypothalamus-Hormon ein Tripeptid, das andere ein Decapeptid ist, und daß beide N-terminal eine Pyroglutaminsäure-Gruppierung aufweisen (pGlu-). Weder für TRH noch für LHRH wurde bis jetzt eine Spezies-Spezifität bekannt. Die Entdeckung, daß ein freisetzendes Hormon, TRH, nur die Struktur eines „einfachen“ Tripeptids haben könnte, stieß anfänglich auf Unglauben. Als sich für das nächste freisetzende Hormon, LHRH, die Struktur eines Nonapeptids und dann eines Decapeptids abzeichnete, wurde auch dies zunächst nicht geglaubt; das waren die Herausforderung und der Reiz dieses Forschungsgebietes. Möglicherweise stehen der künftigen Forschung über die noch unbekannten Hypothalamus-Hormone neue Überraschungen bevor.

## 2.2. Strukturvorschlag für ein hemmendes Hormon

Ein Vorschlag für die Struktur des Hypothalamus-Hormons (MRIH), das die Freisetzung des Melanocyten-stimulierenden Hormons hemmt, findet sich in Abbildung 2.

### 2.3. Strukturvorschlag für ein Wachstumshormon-freisetzendes Hormon

In Abbildung 2 ist ebenfalls die für das Wachstumshormon-freisetzende Hormon (GHRH) aus dem Hypothalamus vorgeschlagene Struktur wiedergegeben.

Im Gegensatz zu TRH und LHRH, deren Strukturen gesichert sind, konnten die Strukturen von MRIH und GHRH offenbar nicht gesichert werden. Bei MRIH und GHRH ist impliziert, daß, obwohl einige Angaben korrekt sein

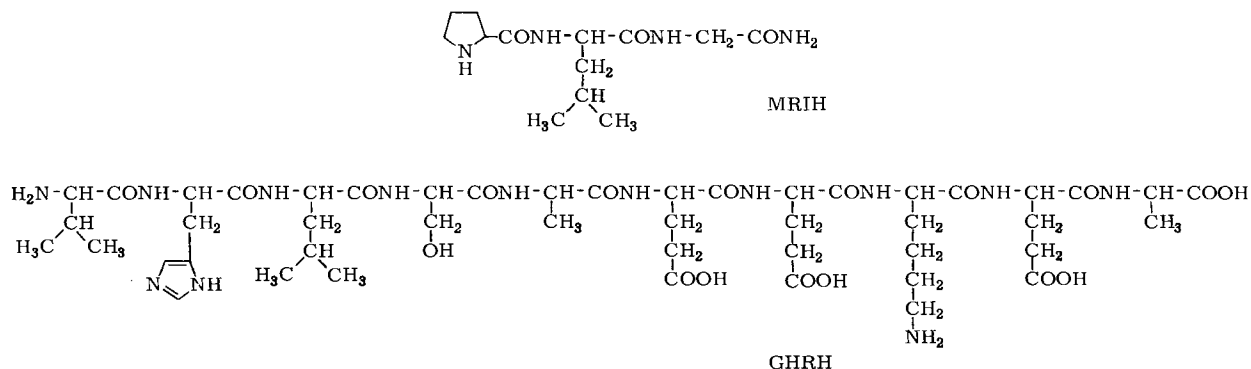


Abb. 2. Strukturvorschläge für zwei Hypothalamus-Hormone. Oben: Hormon, welches die Freisetzung des Melanocyten-stimulierenden Hormons hemmt (MRIH), Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>. Unten: Wachstumshormon-freisetzendes Hormon (GHRH), Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala.

können, die Identifizierung von MRIH nicht eindeutig ist und das als GHRH vorgeschlagene Decapeptid möglicherweise ein Artefakt ist, wenigstens auf der Basis der veröffentlichten Ergebnisse. Diesen Bemerkungen liegt der Versuch zugrunde, die vorhandenen Informationen über MRIH und GHRH sowohl fair als auch objektiv auszuwerten.

#### 2.4. Chemische Struktur des gesicherten Thyreotropin-freisetzenden Hormons

In den folgenden Abschnitten sollen die gesicherten Strukturen von TRH und LHRH (siehe Abb. 1) sowie die Strukturvorschläge für MRIH und GHRH detaillierter besprochen werden. Es wird weder auf Einzelheiten der stufenweisen Ermittlung der chemischen Struktur von TRH und LHRH noch auf die bei der Synthese verwendeten Schutzgruppen eingegangen, sondern vielmehr versucht, einen Überblick über den derzeitigen Stand der Kenntnisse über die Chemie dieser vier Hormone zu geben.

Die Struktur des Thyreotropin-freisetzenden Hormons aus Schweine-[<sup>8,9</sup>] und Schafs-Hypothalamusgewebe[<sup>11</sup>] wurde als Pyroglutamyl-histidyl-prolinamid erkannt. Anscheinend hat dieses Hormon bei anderen Säugetieren einschließlich des Menschen die gleiche Struktur.

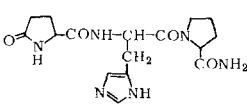
Die Synthese von TRH kam 1969 in einzigartiger und unerwarteter Weise als Teil der Strukturuntersuchungen an Schweine-TRH zustande[<sup>8,9</sup>]; dabei wurde gefunden, daß die biologischen Eigenschaften des Schweine-Hormons und des synthetischen pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub> identisch waren[<sup>10</sup>]. Mit der Synthese von TRH auf verschiedenen Wegen – mit geschützten und ungeschützten Aminosäuren durch klassische Reaktionen und durch Festphasensynthese nach Merrifield – befaßten sich von 1969–1971 sechs

peptids vor. Dieser Vorschlag basierte auf den Ergebnissen eines kombinierten Edman- und Dansyl-Abbaus im Mikromaßstab sowie einer selektiven Tritiierung zur Ermittlung der C-terminalen Gruppe. Diese Abbaureaktionen wurden direkt an den mit Chymotrypsin und Thermolysin erhaltenen Verdauungsprodukten ohne Trennung der Fragmente durchgeführt. Die vorgeschlagene Struktur ist korrekt; Matsuo et al. bestätigten sie anschließend durch andere Abbaureaktionen[<sup>17</sup>]. Anscheinend standen Matsuo et al.[<sup>16</sup>] für die Strukturaufklärung 100–200 µg des aus Schweine-Hypothalamus isolierten Hormons zur Verfügung.

Matsuo et al.[<sup>16</sup>] veröffentlichten ihren Strukturvorschlag für LHRH mit der Bemerkung, daß der Beweis für die Bindung pGlu-His „is not very strong“ und daß „the mode of blocking at C-terminal Gly- still remains to be solved“. Es zeigte sich dann aber, daß ihr Vorschlag eines Decapeptids mit „N-pGlu-“ und einem C-Amid-Terminus in der Tat richtig war und die Basis für die Synthese dieses Decapeptids abgab, so daß das synthetische Peptid mit dem aus Schweine-Hypothalamus isolierten Hormon verglichen und in biologischen Tests auf seine Hormonwirkung geprüft werden konnte.

Amoss et al.[<sup>17</sup>] isolierten LHRH aus Schafs-Hypothalamus. Die Primärstruktur dieses Hormons, die Burgus et al.[<sup>18,19</sup>] ermittelten, stimmt nach Berichten aus den beiden letzten Jahren mit der des Decapeptids (Abb. 1) überein, das bereits als Schweine-LHRH erkannt worden war. Burgus et al.[<sup>19</sup>] standen ungefähr 40 µg des Schafs-Hormons zur Verfügung; dies war etwa die Hälfte des gesamten Materials, das als Nebenfraktion während der ersten Stufen der TRH-Isolierung angefallen war. Alles in allem sollen für die Isolierung von Schafs-TRH und -LHRH ungefähr 300000 Schafs-Hypothalami verwendet worden sein.

Tabelle 2. Chemische Struktur des gesicherten Thyreotropin-freisetzenden Hormons.

| Struktur des TRH:   | Forscher:   |
|---|---|
|  | Hormone aus Schweine-Hypothalamusgewebe                               |
|   | [8] Folkers, Enzmann, Bøler, Bowers und Schally (1969)                |
|   | [9] Bøler, Enzmann, Folkers, Bowers und Schally (1969)                |
|   | Hormone aus Schafs-Hypothalamusgewebe                                 |
|   | [11] Burgus, Dunn, Desiderio und Guillemin (1969)                     |
| Synthese:   | [8] Folkers, Enzmann, Bøler, Bowers und Schally (1969)                |
| auf verschiedenen Wegen: mit  | [9] Bøler, Enzmann, Folkers, Bowers und Schally (1969)                |
| geschützten und ungeschützten   | [12] Gillesen, Felix, Lergier und Studer (1970)                       |
| Aminosäuren und durch   | [13] Flouret (1970)   |
| Festphasensynthese  | [14] Rivaille und Milhaud (1971)                                      |
|   | [15] Chang, Sievertsson, Bogentoft, Currie, Folkers und Daves (1971). |

Arbeitsgruppen. Unter ihren sechs Veröffentlichungen[<sup>8,9,12–15</sup>] befinden sich die ersten Synthesen sowie die darauffolgenden synthetischen Studien (siehe Tabelle 2).

#### 2.5. Chemische Struktur des gesicherten Hormons, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt

Matsuo et al.[<sup>16</sup>] schlugen 1971 versuchsweise für LHRH die in Abbildung 1 wiedergegebene Struktur eines Deca-

[\*] Veröffentlichungen über vorläufige Aspekte der TRH-Struktur und spätere detailliertere Arbeiten usw. sind nicht berücksichtigt worden.

#### 2.6. Synthesen des Hormons, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt

Die Synthese von LHRH gelang durch klassische Reaktionen, durch das Merrifield-Verfahren sowie durch eine Kombination beider Möglichkeiten[<sup>20–32</sup>]. Die dreizehn Veröffentlichungen befassen sich mit der Synthese von pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (vgl. Abb. 1). Im wesentlichen herrschte Übereinstimmung über die Fähigkeit des synthetischen Decapeptids, das Luteinisierende Hormon (LH) freizusetzen.

Matsuo, Arimura, Nair und Schally<sup>[24]</sup> teilten mit, daß ihr synthetisches Decapeptid die gleichen physikochemischen und biologischen Eigenschaften wie das von ihnen isolierte natürliche Schweine-Hormon hat.

Viele Mitarbeiter pharmazeutischer Firmen haben inzwischen ebenfalls LHRH synthetisiert. So haben z. B. Immer, Nelson und Gotz von den Ayerst Laboratories in Montreal angekündigt, daß ihr synthetisches LHRH für Untersuchungen über die Geburtenkontrolle bei Menschen und Tieren verwendet werden soll.

## 2.7. Vorschläge zur Chemie des Hormons, welches die Freisetzung des Melanocyten-stimulierenden Hormons hemmt

Kastin et al.<sup>[33]</sup> teilten 1968 mit, daß das Melanocyten-stimulierende Hormon (MSH) bei amenorrhoeischen Frauen nicht nur pigmentierend wirkt. Sechs Frauen mit sekundärer Amenorrhoe erhielten eine hochgereinigte MSH-Präparation. Es kam zur Menstruationsblutung, welche das Zeichen eines „Umschwungs“ sein könnte. Das verabreichte MSH könnte das Ovar direkt stimuliert haben. Die Konzentrationsänderungen einiger Serumbestandteile waren statistisch signifikant. Das Melanocyten-stimulierende Hormon bewirkt eine Dunkelfärbung der Haut von Amphibien und erlaubt somit ihre Anpassung an die Umgebung. Bei Säugetieren könnte dieses Hypophysen-Hormon während der Evolution weitere Funktionen erlangt haben.

Celis et al.<sup>[34,35]</sup> hatten vorgeschlagen, daß das C-terminale Bruchstück des Oxytocins (siehe Abb. 3), Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, das natürliche Hormon (MRIH) ist, welches die MSH-Freisetzung hemmt.

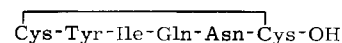
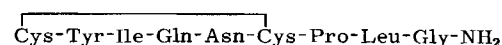


Abb. 3. Oben: Oxytocin. Unten: Tocinsäure.

Nair et al.<sup>[36]</sup> isolierten zwei MRIH-aktive Peptide aus Rinder-Hypothalamusextrakten, von denen das eine stark, das andere viel weniger aktiv war. Sie bestimmten die Struktur des „Haupt-MRIH-aktiven Peptids“ als Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> und synthetisierten das Peptid. Kastin et al.<sup>[37]</sup> fanden, daß 10 ng synthetisches Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, direkt in die Hypophyse gebracht, die Haut eines Frosches aufhellten, die als Folge der Zerstörung des Hypothalamus dunkel geworden war. Die Autoren empfahlen diesen veränderten Test wegen seiner Einfachheit für künftige Untersuchungen mit diesem Hormon. Die Struktur des zweiten MRIH-Peptids mit der geringeren Aktivität wurde anschließend als H-Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> erkannt<sup>[40]</sup>.

Wie Celis et al.<sup>[38]</sup> feststellten, verhält sich das Pentapeptid H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-OH wie ein Hormon (MSHRH), welches MSH freisetzt, denn Nanogramm-Mengen dieses Peptids vermindern den MSH-Gehalt der Ratten-Hypophyse und erhöhen die MSH-Konzentration im Plasma. Dieses Peptid stimuliert auch die Freisetzung von MSH

bei Tieren mit einer Läsion im Gewebe zwischen Hypophyse und Hypothalamus, woraus eine direkte Wirkung des Peptids auf die Hypophyse hervorgeht. Oxytocin beeinflusst den MSH-Gehalt der Hypophyse nicht.

Bower et al.<sup>[39]</sup> fanden, daß synthetische Tocinsäure (siehe Abb. 3), d. h. der makrocyclische Teil des Oxytocins, in geringeren als Nanogramm-Mengen die Freisetzung von MSH aus Ratten-Hypophysen in vitro unterbindet. Diese Wirkung konnte jedoch an der Amphibien-Hypophyse nicht gezeigt werden. Im Gegensatz zum Bericht von Kastin et al.<sup>[37]</sup> verhinderte Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> in vitro in einem Ratten- oder Frosch-System nicht die MSH-Freisetzung. Bower et al. nehmen an, daß diese Unterschiede nicht den unterschiedlichen Versuchsbedingungen zugeschrieben werden dürfen. Die Autoren folgerten, daß die Natur des Hormons (MRIH), das die Freisetzung des Melanocyten-stimulierenden Hormons hemmt, anscheinend ungewiß ist und schlugen vor, daß bei der Ratte Tocinsäure oder eine nahe verwandte Verbindung ein wahrscheinlicher Kandidat für ein natürliches MRIH sein könnte.

## 2.8. Die ungewisse chemische Struktur des Wachstumshormon-freisetzenden Hormons

Schally et al.<sup>[41]</sup> berichteten 1969 über die Isolierung des Wachstumshormon-freisetzenden Hormons (GHRH) aus Schweine-Hypothalamus. Das Testsystem für GHRH basierte auf der Verarmung der Ratten-Hypophyse an Wachstumshormon (GH). 1971 fanden Schally et al.<sup>[42]</sup>, daß das isolierte Peptid die Aminosäuresequenz Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala hat, mithin ein Decapeptid ist (siehe Abb. 2).

Veber et al.<sup>[43]</sup> bemerkten die auffallende Ähnlichkeit zwischen diesem Dekapeptid und einer für die N-terminalen Aminosäuren der  $\beta$ -Kette von Schweine-Hämoglobin vorgeschlagenen Sequenz. Trotzdem synthetisierten Veber et al.<sup>[43]</sup> das genannte Decapeptid. Schally et al.<sup>[42,44]</sup> prüften es und fanden, daß es die Freisetzung des Wachstumshormons sowohl in vitro als auch in vivo stimulierte; das freigesetzte Wachstumshormon wurde nach der Tibia-Methode von Greenspan et al.<sup>[45]</sup> oder über den Sulfatierungsfaktor bestimmt.

Das synthetische Decapeptid und das isolierte Peptid erwiesen sich jedoch bei radioimmunologischen Tests auf die Freisetzung des Wachstumshormons bei Ratten als im wesentlichen inaktiv. Es ist noch nicht bekannt, ob modifizierte Decapeptide mit einem, zwei oder drei Gln- statt Glu- bei diesem Test GHRH-Aktivität zeigen.

## 3. Biosynthese der Hypothalamus-Hormone

Mitnick und Reichlin<sup>[46]</sup> berichteten 1971 über die Biosynthese des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (TRH). Sie gingen von Hypothalamusfragmenten von Ratten aus und untersuchten deren einzelne Abschnitte. Dem Inkubationssystem wurden markierte Aminosäuren zugesetzt; nach Reinigung mit Hilfe von TRH und <sup>125</sup>I-TRH als

Träger wurde anscheinend markiertes TRH erhalten. Über biologische Tests ist aber bisher nichts mitgeteilt worden.

Die Autoren schlossen aus den Ergebnissen, daß nur Glu-, His- und Pro- inkorporiert wurden. Glu- wird zur pGlu-Gruppierung cyclisiert, und Pro- geht während der Biosynthese in Pro-NH<sub>2</sub> über. Anscheinend erforderte die Biosynthese lösliche Enzyme; DNA/RNA-abhängige Reaktionen waren nicht beteiligt.

Auch *Johansson, Hooper, Sievertsson, Currie und Folkers*<sup>[47]</sup> von der University of Texas untersuchten in Zusammenarbeit mit *Cyril Bowers* von der Tulane University die Biosynthese der freisetzenden Hypothalamus-Hormone. Wir verwendeten Schnitte aus Schweine-Hypothalami und setzten dem Inkubationssystem <sup>14</sup>C-Glu- zu. Nach mehreren Reinigungsschritten und Verwendung von synthetischem LHRH als Träger ließ sich folgern, daß markiertes LHRH biosynthetisiert worden war. Diese Folgerung ergab sich aus der Beobachtung, daß der LHRH-Pauly-Fleck radioaktiv war und bei der Hydrolyse <sup>14</sup>C-Glu- ergab. Der radioaktive Fleck war in der Lage, bei Ratten das Luteinisierende Hormon freizusetzen. Wahrscheinlich wird die Biosynthese von LHRH durch lösliche Enzyme bewirkt, wie *Mitnick und Reichlin*<sup>[46]</sup> dies für die Biosynthese von TRH mitteilten.

#### 4. Das „Einheitskonzept“

Am Anfang dieses Fortschrittsberichtes kamen wir kurz auf das „Einheitskonzept“ zu sprechen, welches auf der allgemeinen Idee basiert, daß ein freisetzendes Hypothalamus-Hormon jeweils die Freisetzung eines Hormons aus dem Hypophysen-Vorderlappen bewirkt, und wir deuteten an, daß dieses Konzept möglicherweise durchbrochen sein kann. Während der mühsamen und zeitraubenden Isolierung von LHRH aus Schweine-Hypothalamusgewebe wurde beobachtet, daß sich die LH- und FSH-freisetzenden Aktivitäten während der Fraktionierungen nicht trennen ließen. Schließlich berichteten *Schally et al.*<sup>[48]</sup> über die Isolierung von anscheinend homogenem LHRH und stellten fest, daß das Hormon nicht nur das Luteinisierende Hormon (LH), sondern auch das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) freisetzen kann. Diese Feststellung basierte auf der Beobachtung, daß die FSH- und LH-freisetzende Aktivität durch Verteilungschromatographie in zehn verschiedenen Lösungsmittelsystemen nicht getrennt werden konnte. Das isolierte Hormon stimulierte die Freisetzung sowohl von FSH als auch von LH in vivo und in vitro.

Danach waren *Schally et al.*<sup>[49]</sup> offensichtlich davon überzeugt, daß das Decapeptid als solches die Sekretion des Luteinisierenden Hormons und des Follikel-stimulierenden Hormons reguliert, und bezeichneten es als „Gonadotropin-freisetzendes Hormon“. Sie nahmen an, daß die Gesamtkontrolle der FSH- und LH-Sekretion sowie die bevorzugte Freisetzung des einen oder des anderen dieser beiden Gonadotropine von Wechselwirkungen zwischen dem Decapeptid und Steroiden abhängen.

Zusätzliche Informationen über die Freisetzung von zwei Hypophysen-Hormonen durch ein synthetisches Hypothalamus-Hormon erbrachten die Untersuchungen von

*Bowers et al.*<sup>[50]</sup>, daß synthetisches pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub> (TRH) beim Menschen nicht nur Thyreotropin, sondern gleichzeitig auch Prolactin freisetzt, und zwar in allen geprüften Konzentrationen. In der Tat erhöht sich nach Injektion von nur 10 µg des synthetischen Tripeptids beim Menschen der Serumspiegel von Thyreotropin und Prolactin. Wachstumshormon (GH), Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) wurden nur manchmal freigesetzt, Prolactin dagegen immer. Diese doppelte Freisetzung von Thyreotropin und Prolactin legt die Frage nahe, ob dieses Tripeptid-Hormon ebenfalls als „natürlicher Regulator“ für Prolactin beim Menschen fungiert. Die Frage wird derzeit experimentell untersucht.

#### 5. Entdeckung der LHRH-Aktivität von pGlu-Tyr-Arg-Trp-NH<sub>2</sub>

Wir wenden uns nunmehr dem Hormon zu, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt, und beschreiben die Entdeckung des ersten synthetischen Peptids mit dessen biologischer Aktivität. *Bogentoft et al.*<sup>[51]</sup> inaktivierten Konzentrate von Rinder- und Schweine-LHRH auf chemischem und enzymatischem Wege und unterwarfen die Produkte biologischen Tests. Die Autoren wiesen die Anwesenheit von Arginin, Tyrosin und Tryptophan nach. *Amoss et al.*<sup>[52]</sup> sowie *Currie et al.*<sup>[53]</sup> hatten bereits früher gefunden, daß LHRH am N-terminalen Ende durch die pGlu-Gruppierung blockiert ist.

*Chang et al.*<sup>[54]</sup> synthetisierten die sechs möglichen Tetrapeptide aus pGlu-, Arg-, Trp- und Tyr-. *Bowers et al.*<sup>[55]</sup> fanden, daß nur eins davon biologisch aktiv ist: pGlu-Tyr-Arg-Trp-NH<sub>2</sub> setzte in vivo in Dosen von 50–200 µg LH frei, und zwar unter den Bedingungen des LHRH-Tests. Selbstverständlich ist dieses Tetrapeptid nicht das natürlich vorkommende LHRH.

Aufgrund dieses LHRH-aktiven Tetrapeptids konnten *Bogentoft et al.*<sup>[51]</sup>, *Chang et al.*<sup>[54]</sup> sowie *Bowers et al.*<sup>[55]</sup> vorhersagen, daß LHRH ein Decapeptid und kein Nonapeptid ist, wie *Schally et al.*<sup>[48]</sup> ursprünglich mitgeteilt hatten. Diese Voraussage erwies sich als korrekt.

Kürzlich bestätigten *Guillemin et al.*<sup>[56]</sup>, daß vergleichbare Dosen des Tetrapeptids pGlu-Tyr-Arg-Trp-NH<sub>2</sub> und des synthetischen LHRHs die gleiche LHRH-Aktivität – in vivo und in vitro – haben. Außerdem zeigte sich, daß das Tetrapeptid mit gleicher Wirkungsstärke wie synthetisches LHRH das Follikel-stimulierende Hormon freisetzt. Die Autoren teilten auch Ergebnisse von in-vivo-Versuchen mit, nach denen durch das Tetrapeptid genauso wie durch LHRH eine signifikante Freisetzung von LH ohne entsprechende signifikante Freisetzung von FSH bewirkt werden kann. *Bowers et al.*<sup>[55]</sup> fanden, daß 50–600 µg des Tetrapeptids nur LH und kein FSH freisetzen. *Guillemin et al.*<sup>[56]</sup> teilten mit, daß bei Dosen von 500 µg eine signifikante Freisetzung von LH ohne Freisetzung von FSH stattfindet; FSH wurde jedoch bei einer Dosis von 4 mg freigesetzt (95% Zuverlässigkeit). Die Signifikanz der FSH-Freisetzung durch eine Dosis von 4 mg des Tetrapeptids ist nicht klar ersichtlich.

## 6. Beziehungen zwischen Konformation, Sequenz und Aktivität sowie Vorgänge bei der Aktivierung

Als die Sequenz des Hormons, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt, bekannt war, zeigte sich, daß Tyr- und Trp- im LHRH-aktiven Tetrapeptid pGlu-Tyr-Arg-Trp-NH<sub>2</sub> und in LHRH umgekehrte Positionen einnehmen. Infolgedessen ist die Hormonwirkung des Tetrapeptids in vivo im Hinblick auf Beziehungen zwischen Konformation und Aktivität von besonderem Interesse.

Sievertsson et al.<sup>[57]</sup> haben die Rolle der Histidin-Gruppierung im Thyreotropin-freisetzenden Hormon untersucht. Zu diesem Zweck synthetisierten sie die vier in Tabelle 3 aufgeführten Analoga von pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub> (TRH). pGlu-Phe-Pro-NH<sub>2</sub> ist bei der Thyreotropin-Freisetzung

Tabelle 3. Die Rolle des Histidins im Thyreotropin-freisetzenden Hormon. Prüfung von Tripeptiden auf Thyreotropin-freisetzende Wirkung mit der T<sub>3</sub>-Methode an Mäusen.

| Tripeptid                          | Dosis [ng] | Imp./min <sup>125J</sup> |
|------------------------------------|------------|--------------------------|
| pGlu-His-Pro-NH <sub>2</sub> (TRH) | 9          | 5612                     |
| pGlu-Phe-Pro-NH <sub>2</sub>       | 100        | 3534                     |
| pGlu-Trp-Pro-NH <sub>2</sub>       | 50000      | 204                      |
| pGlu-Tyr-Pro-NH <sub>2</sub>       | 50000      | 100                      |
| pGlu-Phe-3Hyp-NH <sub>2</sub>      | 50000      | 8                        |

bei Mäusen bemerkenswert aktiv, wie Messungen nach der T<sub>3</sub>-Methode zeigten. Eine Dosis von 100 ng dieses Analogons setzte ebenso viel Thyreotropin frei wie 9 ng TRH. Die Autoren nehmen an, daß sowohl die  $\pi$ -Elektronen als auch die Basizität von protoniertem His- für die Thyreotropin-Freisetzung erforderlich sind. Offensichtlich könnte die Freisetzung auf einer Komplexbildung und/oder einem ionischen Mechanismus unter Beteiligung einer negativ geladenen Gruppe am Receptor beruhen. Weitere Untersuchungen an TRH-Analoga wurden von Bowers et al.<sup>[58]</sup> zusammengefaßt.

Wir untersuchten ebenfalls die Beziehungen zwischen Konformation, Sequenz und Aktivität beim Hormon, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt. Eine vorteilhafte neue Synthese von pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> gelang Chang et al.<sup>[30,31,59]</sup> mit „klassischen Reaktionen“. Im Prinzip wurden die Sequenzen 1–6, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-, und 7–10, Leu-Arg-Pro-Gly, getrennt synthetisiert und dann zum Decapeptid vereinigt. Die Synthese ist durch Verwendung geeigneter Schutzgruppen, gute Ausbeuten und nützliche stufenweise Reinigungsoperationen gekennzeichnet.

Die Arg<sup>8</sup>-Gruppierung des Decapeptids ist vermutlich für die Aktivität des Hormons unerläßlich. Die neue Synthese ist so flexibel, daß Arg<sup>8</sup> in der relativ kurzen Sequenz 7–10 durch andere Gruppen ersetzt werden kann.

Wie Tabelle 4 zeigt<sup>[30,31,59]</sup>, ist LHRH mit Lys<sup>8</sup> statt Arg<sup>8</sup> ein relativ aktives Peptid. Die anderen geprüften Peptide waren weit weniger aktiv als LHRH, setzten jedoch in den in Tabelle 4 genannten hohen Dosen das Luteinisierende Hormon frei.

Tabelle 4. Aktivität von Derivaten des Hormons, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt.

| Verb.   | rel. Dosis |
|---|------------|
| pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub> (LHRH) | 1          |
| Lys <sup>8</sup> -LHRH  | 5–50       |
| His <sup>8</sup> -LHRH  | 200        |
| Nva <sup>8</sup> -LHRH  | 100–300    |
| Des-Arg <sup>8</sup> -LHRH                                      | 2000       |

Ein Molekülmodell des Decapeptids LHRH läßt sich in eine Konformation bringen, in der die planaren Indol- und Benzolgruppen in Tryptophan bzw. Tyrosin annähernd parallel angeordnet sind, so daß zwischen ihnen  $\pi$ -Wechselwirkungen auftreten können. Solche planparallele Anordnung könnte zur Strukturspezifität der Hormonwirkung des Moleküls beitragen. Die Guanidinogruppe des Arginins könnte in dieser Konformation des Decapeptids relativ aufgeweitet und exponiert sein. Wegen der Basizität und leichten Zugänglichkeit der Guanidinogruppe könnte die positive Ladung des protonierten Arg- an der Freisetzung des Hormons mitwirken. Diese Rolle des protonierten Arg- läßt sich mit der entsprechenden Rolle von protoniertem His- in TRH vergleichen.

Chang et al.<sup>[60]</sup> setzten ihre Untersuchungen über den Freisetzungsmechanismus von LHRH mit der Synthese und Überprüfung von sieben neuen LHRH-Analoga fort. Fünf von ihnen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Des-Leu<sup>7</sup>-LHRH und Des-(Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup>)-LHRH waren bei sehr hohen Dosen aktiv. Des-(Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>)-LHRH und Des-(Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup>)-LHRH waren bei derartigen Dosen inaktiv. Die Sequenz 7–10 des Decapeptids, Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, interessierte wegen der Arginingruppierung. Bei biologischen Tests erweis sich das Tetrapeptid jedoch als inaktiv.

Tabelle 5. Aktivität von Derivaten des Hormons, welches das Luteinisierende Hormon freisetzt.

| Verb.   | rel. Dosis     |
|---|----------------|
| pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub> (LHRH)                     | 1              |
| Des-Leu <sup>7</sup> -LHRH  | 20000          |
| Des-(Leu <sup>7</sup> -Arg <sup>8</sup> )-LHRH                                      | 50000, inaktiv |
| Des-(Arg <sup>8</sup> -Pro <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LHRH                   | 20000, inaktiv |
| Des-(Leu <sup>7</sup> -Arg <sup>8</sup> -Pro <sup>9</sup> -Gly <sup>10</sup> )-LHRH | 20000–40000    |
| Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>   | 20000, inaktiv |

Die Ergebnisse der biologischen Tests der in den Tabellen 4 und 5 beschriebenen synthetischen Analoga gestatten weitere Überlegungen zum Mechanismus der Hormon-Freisetzung. Eine räumliche Nachbarschaft zwischen der positiven Ladung von protoniertem Arg- im LHRH und einer entsprechenden negativen Ladung am Receptor könnte für eine ionische Reaktion wesentlich sein, die als Teil der Freisetzung vorgeschlagen wird. Dieser Vorschlag wird durch die schwache Aktivität von Des-Leu<sup>7</sup>-LHRH gestützt, dessen positive Ladung so ungünstig lokalisiert sein könnte, daß keine normale ionische Reaktion zustande kommt.



Beim Nachdenken über die Beziehungen zwischen Konformation, Sequenz und Aktivität von LHRH und seinen Analoga stellten *Chang et al.*<sup>[60]</sup> fest, daß die Einteilung der Analoga in zwei Kategorien helfen könnte, die offensichtlich komplizierten und überlappenden Beziehungen zu verstehen. Zur ersten Kategorie könnten die LHRH-Analoga gehören, die in bis zur 100-fachen Dosis des natürlichen Hormons eine signifikante Freisetzung des Luteinisierenden Hormons bewirken. Die unterschiedlichen Aktivitäten der Analoga könnten vorwiegend auf der Struktur der Analoga beruhen. In die zweite Kategorie könnten alle Analoga fallen, die bei 10000-fachen und höheren Dosen – bezogen auf LHRH – das Luteinisierende Hormon freisetzen. Bei diesen Analoga könnten die Unterschiede der Aktivitäten auf einer Änderung des Hormonmoleküls und des Receptors beruhen. Diese enormen Aktivitätsunterschiede sind in der Tat beobachtbar, und zwar aufgrund der außerordentlichen Wirksamkeit der Hypothalamus-Hormone im Pikogramm- und Nanogramm-Bereich.

*Vale et al.*<sup>[61]</sup> und *Monahan et al.*<sup>[62]</sup> haben zwei an der His<sup>2</sup>-Position modifizierte LHRH-Analoga beschrieben, deren Wirkung an dispergierten Zellkulturen aus Rattenhypophysen-Vorderlappen getestet wurde. Das Analogon, welches Glycin statt His<sup>2</sup> enthielt – Gly<sup>2</sup>-LHRH – verhielt sich wie ein partieller Antagonist; in Gegenwart von LHRH in maximaler Konzentration wurden weniger als 50% des Luteinisierenden Hormons freigesetzt. Des-His<sup>2</sup>-LHRH hatte keine signifikante freisetzende Wirkung. In Zellkulturen, denen LHRH und die 10<sup>3</sup>- bis 10<sup>4</sup>-fache Menge Gly<sup>2</sup>-LHRH und Des-His<sup>2</sup>-LHRH zugesetzt wurden, verminderte sich die Menge des vom LHRH freigesetzten Luteinisierenden Hormons.

## 7. Substanz P und Neurokinin

*S. E. Leeman* berichtete im Juni 1972 bei der 55. Canadian Conference in Quebec über die Chemie zweier Peptide, die eine gewisse Beziehung zu den freisetzenden Hypothalamus-Hormonen haben könnten. Diese Peptide werden zwar nicht als freisetzende Hypothalamus-Hormone klassifiziert, sind jedoch aus dem Hypothalamus oder aus anderen Teilen des Zwischenhirns gewonnen worden.

*Leeman* und *Hammerschlag*<sup>[63]</sup> entdeckten in Extrakten aus Rinder- und Ratten-Hypothalami ein Peptid, das die Speichelabsonderung fördert, während sie die Aktivität des Corticotropin-freisetzenden Hormons in diesen Extrakten untersuchten. *Chang* und *Leeman*<sup>[64]</sup> isolierten dieses Peptid und wiesen 1 Lys-, 1 Arg-, 2 Glx-, 2 Pro-, 1 Gly-, 1 Leu-, 1 Met- und 2 Phe- nach. Das Peptid besteht aus elf Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 1340. Während der Untersuchungen zeigte sich, daß das Peptid und die bereits früher beschriebene Substanz P identisch sind. Substanz P, die *von Euler* und *Gaddum*<sup>[65]</sup> 1931 entdeckten, hat viele interessante biologische Eigenschaften<sup>[66]</sup>, wurde aber vor dem genannten Bericht<sup>[64]</sup> nicht in reiner Form erhalten. In Zusammenarbeit mit *Niall*<sup>[67]</sup> wurde die Sequenz des Peptids als Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> erkannt.

*Tregear et al.*<sup>[68]</sup> synthetisierten daraufhin ein Peptid mit dieser Sequenz. Es besaß alle chemischen und biologischen

Eigenschaften des nativen Peptids. Um dessen chemische Struktur zu erforschen, waren als Ausgangsmaterial ca. 100000 Rinder-Hypothalamusfragmente verwendet worden. Für Substanz P ist nunmehr ein radioimmunologischer Test ausgearbeitet worden. Mit dieser Methode ließ sich die Konzentration der Substanz P in der substantia nigra des menschlichen Gehirns zu 500 ng/g bestimmen.

Bei weiteren Untersuchungen über die pharmakologischen Wirkungen von Rinder-Hypothalamusextrakten wies *Leeman* ein Peptid nach, das innerhalb von Sekunden nach intravenöser Injektion eine charakteristische Vasodilatation an der exponierten Hautregion anästhesierter Ratten bewirkte. *Carraway* und *Leeman*<sup>[69]</sup> isolierten das dafür verantwortliche Peptid und fanden, daß seine Wirkung mit einer vorübergehenden Blutdrucksenkung gekoppelt ist. Dieses Peptid besteht aus 13 Aminosäuren, und zwar 1 Lys-, 2 Arg-, 1 Asx-, 2 Glx-, 2 Pro-, 1 Ile-, 2 Leu- und 2 Tyr-.

Die Strukturuntersuchungen ergaben, daß das Peptid wie TRH und LHRH eine pGlu-Gruppierung enthält; dies deutet seine potentielle Verwandtschaft mit den freisetzenden Hypothalamus-Hormonen an. Die Bestandteile des Peptids sind somit: pGlu-, 1 Lys-, 2 Arg-, 1 Asp-, 1 Glx-, 2 Pro-, 1 Ile-, 2 Leu-, 2 Tyr-.

Diese Substanz wurde versuchsweise als Neurokinin angesehen, da sie zusätzlich zu ihrer blutdrucksenkenden Wirkung eine Kontraktion von Meerschweinchen-Krummdarmgewebe sowie eine Relaxation des Zwölffingerdarms von Ratten bewirkt. Bei großen Dosen werden die Ratten cyanotisch.

## 8. Ausblick

Die Chemie der freisetzenden und hemmenden Hypothalamus-Hormone hat sich als neuer Bereich biologisch aktiver Peptide erwiesen und eröffnet eine neue Ära in der Physiologie der Neurohormone. Die chemischen Aspekte dieses neuen Gebietes finden bei organischen und medizinischen Chemikern, Biochemikern und Enzymologen großes Interesse. Diese Fortschritte der Grundlagenforschung lassen entsprechende therapeutische Fortschritte erwarten.

*Wir danken der The Robert A. Welch Foundation; Dr. David Isaksson und Dr. Bertil Åberg, Kabi/Aktiebolaget, Stockholm; Dr. W. J. Aunan, American Meat Institute Foundation, Chicago, Illinois; dem United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal Science Research Division; Dr. Robert Dudley, George A. Hormel Company, Austin, Minnesota; und dem NIH für Grant NICHO-72-2713.*

Eingegangen am 17. Oktober 1972 [A 935]

[1] Abbildungen siehe z. B. in *F. H. Netter: Nervous System*. CIBA Collection of Medical Illustrations. CIBA, Basel 1968, Bd. 1, S. 76, 145.

[2] *J. C. Hinsey*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 5, 269 (1937).

[3] *J. D. Green* u. *G. W. Harris*, J. Physiol. (London) 108, 359 (1949).

[4] *A. V. Schally*, *C. Y. Bowers*, *T. W. Redding* u. *J. F. Barrett*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 165 (1966).

[5] *R. Burgus* u. *R. Guillemin* in *J. Meites: Hydrophysiotropic Hormones of the Hypothalamus: Assay and Chemistry*. Williams and Wilkins, Baltimore 1970, S. 227.

- [6] A. V. Schally, A. Arimura, Y. Baba, R. M. G. Nair, H. Matsuo, T. W. Redding, L. Debeljuk u. W. F. White, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 393 (1971).
- [7] M. Amoss, R. Burgus, R. Blackwell, W. Vale, R. Fellows u. R. Guillemin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 205 (1971).
- [8] K. Folkers, F. Enzmann, J. Böler, C. Y. Bowers u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 123 (1969), und dort zit. Lit.
- [9] J. Böler, F. Enzmann, K. Folkers, C. Y. Bowers u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 705 (1969), und dort zit. Lit.
- [10] C. Y. Bowers, A. V. Schally, F. Enzmann, J. Böler u. K. Folkers, *Endocrinology* **86**, 1143 (1970); C. Y. Bowers, Vortrag bei der American Thyroid Association, 45th Meeting, Nov. 1969, Abstract S. 15.
- [11] R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio u. R. Guillemin, *C. R. Acad. Sci. Paris D* **269**, 1870 (1969), und dort zit. Lit.
- [12] D. Gillesen, A. M. Felix, W. Lergier u. R. O. Studer, *Helv. Chim. Acta* **53**, 63 (1970).
- [13] G. Flouret, *J. Med. Chem.* **13**, 843 (1970).
- [14] P. Rivaille u. G. Milhaud, *Helv. Chim. Acta* **54**, 355 (1971).
- [15] J.-K. Chang, H. Sievertsson, C. Bogentoft, B. L. Currie u. K. Folkers, *J. Med. Chem.* **14**, 481 (1971).
- [16] H. Matsuo, Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1334 (1971).
- [17] Y. Baba, H. Matsuo u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 459 (1971).
- [18] R. Burgus, M. Butcher, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, M. Amoss, R. Blackwell, W. Vale u. R. Guillemin, *C. R. Acad. Sci. Paris D* **273**, 1611 (1971).
- [19] R. Burgus, M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, R. Blackwell, W. Vale u. R. Guillemin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 278 (1972).
- [20] M. Monahan, J. Rivier, R. Burgus, M. Amoss, R. Blackwell, W. Vale u. R. Guillemin, *C. R. Acad. Sci. Paris D* **273**, 508 (1971).
- [21] K. Folkers, Vortrag auf dem 23rd International Congress of Pure and Applied Chemistry, Boston, Juli 1971; Butterworth, London 1971, Bd. 2, S. 205.
- [22] H. Sievertsson, J.-K. Chang, C. Bogentoft, B. L. Currie, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1566 (1971).
- [23] R. Geiger, W. König, H. Wissmann, K. Geisen u. F. Enzmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 767 (1971).
- [24] H. Matsuo, A. Arimura, R. M. G. Nair u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 822 (1971).
- [25] G. Milhaud, P. Rivaille, P. Garnier, J.-L. Chaussin, E. Binet u. J.-C. Job, *C. R. Acad. Sci. Paris D* **273**, 1858 (1971).
- [26] P. Rivaille, A. Robinson, M. Kamen u. G. Milhaud, *Helv. Chim. Acta* **54**, 2772 (1971).
- [27] T. Kimura, Y. Kishida, T. Kusama u. S. Sakakibara in N. Yanaihara: *Proceedings of the 9th Symposium on Peptide Chemistry* 1971, S. 90.
- [28] N. Yanaihara, M. Sakagami, T. Kaneko, S. Saito, K. Abe, N. Nagata u. H. Oka in N. Yanaihara: *Proceedings of the 9th Symposium on Peptide Chemistry* 1971, S. 96.
- [29] H. Sievertsson, J.-K. Chang, A. v. Klaudy, C. Bogentoft, B. L. Currie, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *J. Med. Chem.* **15**, 222 (1972).
- [30] J.-K. Chang, H. Sievertsson, B. L. Currie, C. Bogentoft, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *J. Med. Chem.* **15**, 623 (1972).
- [31] J.-K. Chang, R. H. Williams, A. J. Humphries, N.-G. Johansson, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 727 (1972).
- [32] M. Monahan u. J. Rivier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 1100 (1972).
- [33] A. J. Kastin, S. Kullander, M. E. Borglin, K. Dyster-Aas, B. Dahlberg, D. Ingvar, C. E. T. Krakau, M. C. Miller III, C. Y. Bowers u. A. V. Schally, *Lancet* **1968**, 1007.
- [34] M. E. Celis, S. Taleisnik, I. L. Schwartz u. R. Walter, *Biophys. J.* **11**, 98a (1971).
- [35] M. E. Celis, S. Taleisnik u. R. Walter, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1428 (1971).
- [36] R. M. G. Nair, A. J. Kastin u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1376 (1971).
- [37] A. J. Kastin, A. V. Schally u. S. Viosca, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **137**, 1437 (1971).
- [38] M. E. Celis, S. Taleisnik u. R. Walter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 564 (1971).
- [39] Sr. A. Bower, M. E. Hadley u. V. J. Hruby, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 1185 (1971).
- [40] R. M. G. Nair, A. J. Kastin u. A. V. Schally, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 1420 (1972).
- [41] A. V. Schally, S. Sawano, A. Arimura, J. F. Barrett, I. Wakabayashi u. C. Y. Bowers, *Endocrinology* **84**, 1493 (1969).
- [42] A. V. Schally, Y. Baba, R. M. G. Nair u. C. D. Bennett, *J. Biol. Chem.* **246**, 6647 (1971).
- [43] D. F. Veber, C. D. Bennett, J. D. Milkowski, G. Gal, R. G. Denkwalter u. R. Hirschnann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 235 (1971).
- [44] A. V. Schally, A. Arimura, I. Wakabayashi, T. W. Redding, E. Dikermann u. J. Meites, *Experientia* **28**, 205 (1972).
- [45] F. S. Greenspan, C. H. Li, M. E. Simpson u. H. M. Evans, *Endocrinology* **45**, 455 (1949).
- [46] M. Mitnick u. S. Reichlin, *Science* **172**, 1241 (1971).
- [47] N.-G. Johansson, F. G. Hooper, H. Sievertsson, B. L. Currie u. K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* im Druck.
- [48] A. V. Schally, A. Arimura, Y. Baba, R. M. G. Nair, H. Matsuo, T. W. Redding, L. Debeljuk u. W. F. White, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 393 (1971).
- [49] A. V. Schally, A. Arimura, A. J. Kastin, H. Matsuo, Y. Baba, T. W. Redding, R. M. G. Nair, L. Debeljuk u. W. F. White, *Science* **173**, 1036 (1971).
- [50] C. Y. Bowers, H. G. Friesen, P. Hwang, H. J. Guyda u. K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 1033 (1971).
- [51] C. Bogentoft, B. L. Currie, H. Sievertsson, J.-K. Chang, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 403 (1971).
- [52] M. Amoss, R. Burgus, D. N. Ward, R. E. Fellows u. R. Guillemin, Abstracts 52nd Meeting of the Endocrine Society, St. Louis, Juni 1970, S. 61.
- [53] B. L. Currie, H. Sievertsson, C. Bogentoft, J.-K. Chang, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 1180 (1971).
- [54] J.-K. Chang, H. Sievertsson, C. Bogentoft, B. L. Currie, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 409 (1971).
- [55] C. Y. Bowers, J.-K. Chang, H. Sievertsson, C. Bogentoft, B. L. Currie u. K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 414 (1971).
- [56] R. Guillemin, M. Amoss, R. Blackwell, J. Rivier, N. Ling u. W. Vale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 1093 (1972).
- [57] H. Sievertsson, J.-K. Chang, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *J. Med. Chem.* **15**, 291 (1972).
- [58] C. Y. Bowers, K. Folkers, H. Sievertsson, B. L. Currie, C. Bogentoft u. J.-K. Chang: Third International Symposium, Endocrinology, London, Juli 1971. Heinemann Medical Books, London, im Druck.
- [59] C. Y. Bowers, J.-K. Chang u. K. Folkers, Sero Foundation Conference I, Acapulco, Juni 1971. Excerpta Medica, im Druck.
- [60] J.-K. Chang, A. J. Humphries, R. H. Williams, H. Sievertsson, K. Folkers u. C. Y. Bowers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 1256 (1972).
- [61] W. Vale, G. Grant, J. Rivier, M. Monahan, M. Amoss, R. Blackwell, R. Burgus u. R. Guillemin, *Science* **176**, 933 (1972).
- [62] M. W. Monahan, J. Rivier, W. Vale, R. Guillemin u. R. Burgus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 551 (1972).
- [63] S. E. Leeman u. R. Hammerschlag, *Endocrinology* **81**, 803 (1967).
- [64] M. M. Chang u. S. E. Leeman, *J. Biol. Chem.* **245**, 4784 (1970).
- [65] U. S. v. Euler u. J. H. Gaddum, *J. Physiol. (London)* **72**, 74 (1931).
- [66] F. Lumbeck u. G. Zetler, *Int. Rev. Neurobiol.* **4**, 159 (1962).
- [67] M. Chang, S. E. Leeman u. H. Niall, *Nature New Biol.* **232**, 86 (1971).
- [68] J. Tregear, H. Niall, J. Potts, S. E. Leeman u. M. Chang, *Nature New Biol.* **232**, 87 (1971).
- [69] R. Carraway u. S. E. Leeman, *Fed. Proc.* **30**, 215 (1971).