

- [16] Y. Seki, S. Murai, A. Hidaka, N. Sonoda, *Angew. Chem.* 89, 919 (1977); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16, 881 (1977).
- [17] Y. Colleuille, *Holl. Pat.-Anm.* 6513584 (1966); *Chem. Abstr.* 65, 8959 (1966); DBP 1248050 (1967); US Pat. 3450747 (1969).
- [18] A. J. Chalk, J. F. Harrod, *Adv. Organomet. Chem.* 6, 119 (1968).
- [19] E. R. Tucci, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 9, 516 (1970).
- [20] Die Hydrosilylierung von Olefinen mit $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ wird derzeit bearbeitet.
- [21] Y. L. Baay, A. G. MacDiarmid, *Inorg. Chem.* 8, 986 (1969).
- [22] a) A. R. Bassindale, A. G. Brook, J. Harris, *J. Organomet. Chem.* 90, C6 (1975); b) A. G. Brook, *Acc. Chem. Res.* 7, 77 (1974).
- [23] Einzelheiten werden später veröffentlicht.
- [24] Ein Vergleichsversuch, bei dem *n*-Heptanal unter den Standardbedingungen nicht die Enolsilylether (6) ergab, sondern zu *n*- $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{OSiEt}_2\text{Me}$ führte, legte die Vermutung nahe, daß kein intermediärer Aldehyd auftritt [14]. Später fanden wir, daß die Umwandlung in das Alkoxysilan bereits beendet war, bevor das Reaktionsgefäß die Temperatur von 140°C erreicht hatte. Injiziert man *n*-Heptanal unter Druck bei 140°C, so entstehen neben anderen Produkten auch die Enolsilylether (6) [11].
- [25] Die Silylgruppenwanderung, bei der der Metall-Carben-Komplex entsteht, findet ihr topologisches Analogon in der bekannten Umlagerung von α -Silylketonen zu Enolsilylethern [22b]. Wasserstoffwanderung an einen Carbenliganden ähnlich Gl. (k) wurde bei einigen Umsetzungen vermutet [26].
- [26] a) K. J. Ivin, J. J. Ronney, C. D. Stewart, M. L. H. Green, R. Mahtab, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 604; b) R. B. Calvert, J. R. Shapley, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5225 (1977).
- [27] H. G. Ang, P. T. Lau, *Organomet. Chem. Rev. A* 8, 235 (1972); C. S. Cundy, R. M. Kingston, M. F. Lappert, *Adv. Organomet. Chem.* 11, 253 (1973).
- [28] D. L. Morrison, A. P. Hagen, *Inorg. Synth.* 13, 65 (1972).
- [29] L. H. Sommer, J. E. Lyons, H. Fujimoto, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 7051 (1969).
- [30] A. J. Chalk, *Chem. Commun.* 1970, 847.
- [31] B. J. Aylett, J. M. Campbell, *J. Chem. Soc. A* 1969, 1910; J. M. Burlitt, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 4562 (1969); J. F. Bald, Jr., A. G. MacDiarmid, *J. Organomet. Chem.* 22, C22 (1970); H. Schäfer, A. G. MacDiarmid, *Inorg. Chem.* 15, 848 (1976).
- [32] E. Colomer, R. J. P. Corriu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 176.
- [33] E. Colomer, R. J. P. Corriu, J. C. Young, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977, 73.
- [34] H. Sakurai, K. Mivoshi, Y. Nakadaira, *Tetrahedron Lett.* 1977, 2671.
- [35] Y. Seki, S. Murai, I. Yamamoto, N. Sonoda, *Angew. Chem.* 89, 818 (1977); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16, 789 (1977).
- [36] W. M. Ingle, G. Preti, A. G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 497; B. K. Nicholson, B. H. Robinson, J. Simpson, *J. Organomet. Chem.* 66, C3 (1974); B. K. Nicholson, J. Simpson, *ibid.* 155, 237 (1978).
- [37] E. W. Colvin, *J. Chem. Soc. Rev.* 1977, 15.
- [38] W. Reppe, H. Kroper, H. J. Pistor, O. Weissbarth, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 587, 87 (1953).
- [39] S. Murai, T. Kato, N. Sonoda, Y. Seki, K. Kawamoto, *Angew. Chem.* 91, 421 (1979); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18, 393 (1979).
- [40] L. Marko, *Proc. Chem. Soc.* 1962, 67; L. Marko, P. Szabo, *Chem. Technol. (Berlin)* 13, 482 (1961); *Chem. Abstr.* 56, 7102 (1962); M. Polievka, E. J. Mistrik, *Chem. Zvesti.* 26, 149 (1972); *Chem. Abstr.* 77, 113388 (1972). Siehe [12b], dort S. 12, 84, und auch [48a].
- [41] J. A. Gladysz, J. C. Selover, C. E. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 6766 (1978); siehe auch [48b].
- [42] T. Yukawa, H. Wakamatsu, *Brit. Pat.* 1408857 (1974); S. K. Bhattacharyya, S. K. Palit, A. D. Das, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 9, 92 (1970).
- [43] Y. Seki, S. Murai, N. Sonoda, *Angew. Chem.* 90, 139 (1978); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17, 119 (1978).
- [44] Die Möglichkeit einer „Co-oligomerisierung“ von HSiR_3 und CO als Zugang zu persilylierten Zuckerderivaten wurde von Prof. A. Nakamura im Juni 1978 beim Sommerseminar über metallorganische Chemie in Yunoyama (Japan) vorgeschlagen.
- [45] Übersichten: F. Hudrlík, *J. Organomet. Chem. Libr.* 1, 127 (1976); S. S. Washburne, *J. Organomet. Chem.* 83, 155 (1974); c) E. Cooper, *Chem. Ind. (London)* 1978, 794.
- [46] S. Murai, Y. Kuroki, T. Aya, N. Sonoda, S. Tsutsumi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1972, 741; S. Murai, Y. Kuroki, K. Hasegawa, S. Tsutsumi, *ibid.* 1972, 946. Neueste Arbeit dieser Reihe: I. Ryu, S. Murai, Y. Hatayama, N. Sonoda, *Tetrahedron Lett.* 1978, 3455.
- [47] J. K. Rasmussen, *Synthesis* 1977, 91.
- [48] a) Die Umsetzung von HCHO mit $\text{HCo}(\text{CO})_4$ ergibt HOCH_2CHO : J. A. Roth, M. Orchin, *J. Organomet. Chem.* 172, C 27 (1979). b) Ein α -Siloxyalkylmangan-Komplex wird durch Umsetzung von $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$ mit $(\text{CH}_3)_2\text{SiMn}(\text{CO})_5$ erhalten: D. L. Johnson, J. A. Gladysz, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.

Neurophysine – molekulare und zelluläre Aspekte^[**]

Von Roger Acher^[*]

Neurophysine sind lineare, cysteinreiche Proteine aus 93–95 Aminosäureresten, die wie die Neurohypophysenhormone Oxytocin und Vasopressin im Hypothalamus entstehen und von dort zum Hypophysen-Hinterlappen gelangen. Meistens enthält eine Spezies zwei (oder drei) Neurophysine, die sich nur geringfügig in Kettenlänge und/oder Sequenz unterscheiden. Viele Beobachtungen sprechen dafür, daß sowohl Oxytocin und eines der Neurophysine als auch Vasopressin und das andere Neurophysin einen gemeinsamen Vorläufer haben, dessen lange Kette in Neurophysin und Hormon gespalten wird. An Ratten mit erblichem Diabetes insipidus ließ sich zeigen, daß ein einziges Gen die Biosynthese des Vasopressins und eines der Neurophysine kontrolliert.

1. Neurosekretion und Neurohormone: Geschichte ihrer Entdeckung

Die Geschichte der Neurophysine läßt sich nicht von der der Neuroendokrinologie trennen. Tatsächlich liefen die ersten Versuche von Biochemikern zur Reinigung der „Hinterlappenhormone“ der Hypophyse, deren Bedeutung seit Beginn dieses Jahrhunderts bekannt war, mit den Studien von Cytologen parallel. Ziel dieser Untersuchungen war die

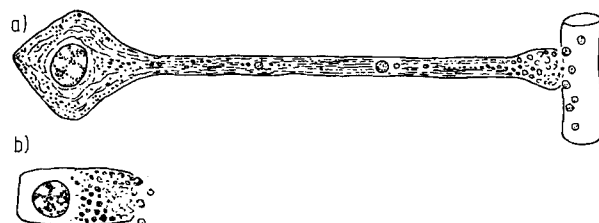


Abb. 1. Die neurosekretorische Zelle (a) kann sowohl als Nervenzelle mit den charakteristischen Eigenschaften einer Drüsenzelle (b) als auch als Drüsenzelle angesehen werden, die gewisse Charakteristika einer Nervenzelle erworben hat. In Wirklichkeit ist sie ein Neuron, das sehr früh eine zweite Differenzierung durchgemacht hat. Die sekretorischen Granula müssen beim Transport vom Ort ihrer Synthese (Perikaryon) zum Ort ihrer Aussüttung einen sehr langen Weg zurücklegen (nach [12]).

[*] Prof. Dr. R. Acher
Laboratoire de Chimie Biologique
Université de Paris VI
96 boulevard Raspail, F-75 006 Paris (Frankreich)

[**] Dieser Aufsatz ist dem Andenken an Ernst Scharer gewidmet, der vor fünfzig Jahren die Neurosekretion entdeckt hat.

Identifizierung der Zellen, die diese Substanzen synthetisieren, sowie die Aufklärung des zugrundeliegenden Sekretionsmechanismus.

1928 hat *Ernst Scharer*^[1], basierend auf seinen Beobachtungen an Hypothalamus-Neuronen des Knochenfisches *Phoxinus laevis* (Abb. 1), als erster überzeugend das Konzept der Neurosekretion vertreten. Zu jener Zeit war diese Idee in der Tat revolutionär, da Nervenzellen als hochspezialisiert und allein für die Leitung von Nervenimpulsen geeignet galten und sich damit grundsätzlich von typischen Drüsenzellen unterscheiden sollten. Auch lange Zeit später wurde der Hypophysen-Hinterlappen als selbständige Drüse angesehen und die Synthese seiner Hormone speziellen Gliazellen, den Pituicyten^[2], zugeschrieben. Erst nachdem *Bargmann*^[3] die Chrom-Hämatoxylin-Phloxin-Methode eingeführt hatte – diese Methode war ursprünglich von *Gomori*^[4] zum Anfärben der β -Zellen in den Langerhansschen Inseln entwickelt worden –, war der Nachweis neurosekretorischer Granula im gesamten neurosekretorischen Neuron möglich. 1951 konnten *Bargmann* und *Scharer*^[5] endgültig sicherstellen, daß das Perikaryon der Nuclei supraoptici und paraventriculares des Hypothalamus höherer Wirbeltiere (entsprechend den Nuclei praeroptici von Fischen und Amphibien) eine Substanz synthetisiert – neurosekretorisches Material genannt –, die durch axoplasmatischen Fluß zum Hinterlappen transportiert wird, wo sie gespeichert und gegebenenfalls ausgeschüttet wird (Abb. 2). Dieser Nachweis sicherte das Konzept des sekretorischen Hypothalamus-Neurohypophysen-Systems einschließlich des langen intrazellulären Transportweges, auf dem eine Modifizierung des ursprünglichen Syntheseproduktes nicht auszuschließen ist. Die Tatsache, daß das in zahlreichen Experimenten nachgewiesene aktive Prinzip immer zusammen mit einer nach der Gomori-Methode anfärbaren Substanz auftrat, ermöglichte den Schluß, daß das neurosekretorische Material entweder eine mit diesen Hormonen assoziierte Substanz oder aber die Hormone selbst sind.

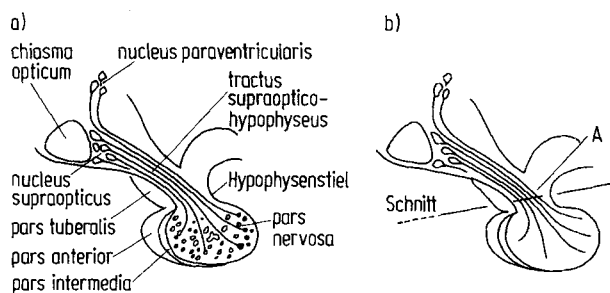


Abb. 2. Folgen der Durchtrennung des Hypophysenstiels beim Hund. Diagramm des Hypothalamus-Hypophysen-Systems beim normalen (a) und beim operierten Hund (b). Das aus den supraoptischen und paraventriculären Kernen herührende neurosekretorische Material „wandert“ entlang den Axonen und reichert sich im Hinterlappen an. Nach der Stieldurchtrennung reichert sich das neurosekretorische Material an den proximalen Axonstümpfen (bei A) an (nach [12]).

Hinsichtlich der chemischen Charakterisierung schlugen *Abel et al.*^[6] in ihren ersten Veröffentlichungen zwischen 1920 und 1930 vor, daß sowohl die Oxytocin- als auch die Vasopressin-Aktivität und die antidiuretische Aktivität des Hypophysen-Hinterlappens auf einem einzigen Hormon beruhen. Später wurden von mehreren Arbeitskreisen zwei ein-

ander widersprechende Konzepte vertreten: Die einen wollten eine Substanz mit hohem Molekulargewicht isoliert haben, die sowohl Oxytocin- als auch Vasopressin-Aktivität besaß; den anderen war es geglückt, Substanzen mit der einen oder der anderen Aktivität und niedrigem Molekulargewicht in der Größenordnung von 1000 zu erhalten. Ultrazentrifugen-Untersuchungen von *Rosenfeld*^[7] ergaben, daß diese Aktivitäten einem oder zwei Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 20000 bis 30000 zuzuschreiben waren, daß sich aber nach Behandlung der Extrakte mit heißer 0.25proz. Essigsäure Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht nachweisen ließen. 1942 erhielten *Van Dyke et al.*^[8] nach Extraktion von gefrorenen Drüsen bei tiefer Temperatur und fraktionierender Fällung mit Natriumchlorid ein Protein, das sie als rein ansahen und das die Oxytocin-, Vasopressin- und antidiuretische Aktivität im gleichen Verhältnis wie der Hinterlappen besaß. *Van Dyke*^[8] konnte die Möglichkeit der Absorption kleiner aktiver Moleküle durch ein inertes Protein durch mehrere Experimente ausschließen. Am wichtigsten waren die beiden folgenden:

Bei der Elektrophorese mit freier Grenzfläche werden diese Aktivitäten nicht vom Protein getrennt, gehen aber bei dessen Denaturierung (Aufaltung zu einem 8 Å dicken Film) verloren. Hätten die Aktivitäten zu separaten Peptiden gehört, hätten sie erhalten bleiben müssen, sei es in der umgebenden Flüssigkeit oder an das denaturierte Protein gebunden. Die Freisetzung aktiver Peptide setzt Spaltungen voraus, wie sie bei der Extraktion möglicherweise unabsichtlich geschehen, bei der Sekretion jedoch physiologisch sein könnten. Trotzdem isolierten *Kamm et al.*^[9] und danach *du Vigneaud*^[10] sowie *Fromageot et al.*^[11] aus Aceton-behandelten Drüsen („Acetonpulver“) durch Extraktion mit heißer 0.25proz. Essigsäure eine Fraktion mit Oxytocinwirkung und eine zweite mit Vasopressin- und antidiuretischer Aktivität. Somit mußte bestimmt werden, ob es sich bei den Hormonen um Proteine oder Peptide handelt und welche Beziehungen zwischen den aktiven Prinzipien bestehen.

Außerdem mußten die intrazelluläre Lokalisierung dieser Hormone sowie die endokrine Bedeutung der nach *Gomori* anfärbaren Substanz geklärt werden. Die Gomori-Reaktion ist nicht substanzspezifisch; mit dieser Methode können nicht nur andere neurosekretorische Systeme angefärbt werden, z. B. von Wirbellosen^[12], sondern auch mehrere Typen endokriner Zellen, z. B. die β -Zellen der Langerhansschen Inseln. Im Gegensatz zur Ansicht von *Hild* und *Zeller*^[13], es handele sich um ein in organischen Solventien lösliches Phosphatid, ergaben die histochemischen Untersuchungen von *Sloper et al.*^[14], daß sich die „Gomori-positiven“ Granula genauso gut mit Perameisensäure/Alcian Blue anfärben lassen, die für Cystin und Cystein spezifisch sind, und daß folglich ein Protein oder ein Peptid mit hohem Anteil an diesen Aminosäuren vorliegen muß. Dies gilt besonders für die Neurohypophysen-Peptidhormone oder die Proteine, an die sie assoziiert sind, d. h. die Neurophysine. Besonders interessant war daher die Entdeckung, daß sich die Neurophysine, sei es allein oder vergesellschaftet mit den Hormonen, nach der Gomori-Methode anfärben lassen^[15].

Seit dem ersten Übersichtsaufsatz über Neurophysine^[11] sind mehrere Monographien über dieses Gebiet veröffentlicht worden (siehe z. B. [16, 17]). Darüber hinaus sind die Vorträge eines Neurophysin-Symposiums gesammelt erschienen^[18].

2. Der reversible Neurophysin-Neurohypophysenhormon-Komplex

Ohne die Existenz kleiner Peptide mit Hormonaktivität zu leugnen, sahen die Anhänger der Einheitlichkeitstheorie sie aber doch als Abbauprodukte an, die bei der Reinigung des aktiven Proteins entstehen. Tatsächlich schienen Hinterlappen-Extrakte, die bei tiefen Temperaturen gewonnen worden waren, völlig frei von solchen kleinen Molekülen zu sein. Zudem schien eine nichtkovalente Bindung zwischen einem Protein und Peptiden, die man sich damals als höchst unspezifisch und instabil vorstellte, kaum plausibel zu sein, denn die unterschiedlichen Proteinpräparationen besaßen spezifische, reproduzierbare Aktivitäten in einem für die entsprechende Drüse typischen Verhältnis.

Da das aktive Protein die Rolle einer gemeinsamen Vorstufe für Oxytocin und Vasopressin spielen konnte, schien uns die Aufklärung der Bildungsweise dieser Peptide aus einem Makromolekül wichtig^[19,20]. Das Material, das wir unter *Van Dykes* Bedingungen aus frischen oder mit Aceton behandelten Drüsen erhielten, hatte die folgenden charakteristischen Eigenschaften: Oxytocin- und Vasopressin-Aktivität um 18 Einheiten/mg, Sedimentationskonstante 2.6–2.8 S und Diffusionskonstante $8.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Daraus ließ sich auf ein Molekulargewicht um 30000 schließen. Unter Annahme dieses Wertes lagen die geschätzten Aktivitäten bei etwa 500 Einheiten/ μmol , entsprachen also etwa 1 μmol Oxytocin und 1 μmol Vasopressin. Dies legte natürlich eine stöchiometrische Beziehung zwischen der mutmaßlichen Vorstufe und den aktiven Peptiden nahe. Um diese Vorstellung zu prüfen, mußte zunächst die Homogenität des aktiven Proteins eindeutig gesichert werden. Im Gegensatz zu *Van Dyke*^[8] gelang es *Irving* und *du Vigneaud*^[21], die Protein-Aktivitäten durch Elektrophorese zu trennen. Diese Autoren verwendeten den Preßsaft aus unmittelbar nach dem Schlachten gefrorenen und dann im Laboratorium gemahlenen Drüsen. Unter Bedingungen, die anscheinend nur schwache Proteolyse hervorrufen, wanderte das Vasopressin-Prinzip schneller als das Oxytocin-Prinzip zur Kathode.

Wir haben zunächst das *Van Dykesche* Protein bei tiefen Temperaturen (zur Verminderung der Hydrolyse) durch Elektrophorese mit freier Grenzfläche untersucht und die Aktivitäten sowie den Stickstoffgehalt in den drei Bereichen der U-förmigen Zelle quantitativ bestimmt. Unter Bedingungen, bei denen am Ende des Experiments die Ausbeute an aktivem Prinzip und an Stickstoff etwa 90–95% betrug, war die Vasopressin-Aktivität pro mg Stickstoff an der Kathode fünfmal höher als an der Anode. Die hierdurch erreichte elektrophoretische Trennung konnte durch Elektrodialyse weiter verbessert werden; dabei wurden die Proteine von den kleinen Peptiden abgetrennt. Unter Benutzung eines Elektrodialysators mit drei durch Cellophanmembranen getrennten Kammern und einer Stromstärke von nur 12 bis 15 mA (um Erwärmung zu vermeiden) gelang es, praktisch die gesamten Oxytocin- und Vasopressin-Aktivitäten des in die zentrale Kammer gegebenen aktiven Proteins im Kathodenraum zu sammeln. 90% des Stickstoffs befanden sich in der mittleren Kammer, in der das Protein verblieben war^[19,20]. Die einzigen im Kathodenraum gefundenen Bestandteile waren Oxytocin und Vasopressin. Dies zeigt, daß die gesamte Hormonaktivität des Protein-Komplexes von diesen mit dem Protein nichtkovalent verknüpften Peptiden herrührt.

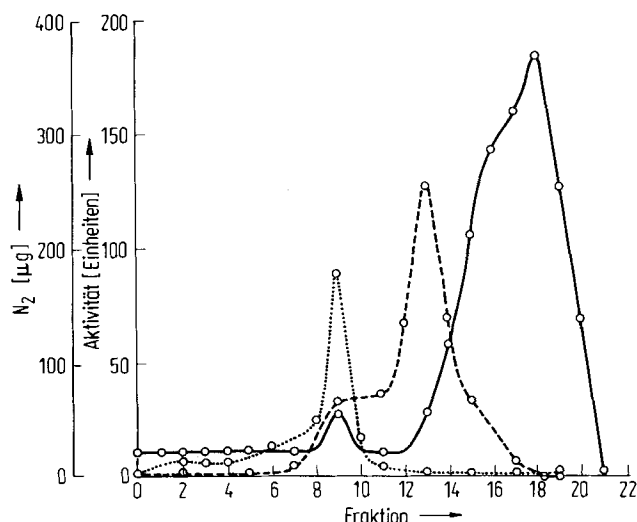


Abb. 3. Trennung der Komponenten des Neurophysin-Neurohypophysenhormon-Komplexes durch Gegenstromverteilung im System *sec*-Butanol/0.5proz. Trichloressigsäure. Vasopressin-Aktivität, ---- Oxytocin-Aktivität, — Stickstoff.

Die quantitative Aufspaltung in drei Komponenten gelang gleichermaßen durch Gegenstromverteilung (Abb. 3) oder durch Behandeln mit 5proz. Trichloressigsäure; dadurch wird das Protein gefällt, und die Peptide bleiben im Überstand (Abb. 4). Die letztgenannte Methode ermöglichte die gleichzeitige Reinigung der beiden Hormone: Der Protein-Peptid-Komplex wird zunächst durch fraktionierende Fällung vom Extrakt abgetrennt; nach Zerlegung des Komplexes mit Trichloressigsäure werden Oxytocin und Vasopressin durch Ionenaustauschchromatographie^[22] isoliert (Abb. 5).

Wir haben für dieses Protein, das spezifisch mit den Hormonen verbunden zu sein schien, den Namen *Neurophysin* vorgeschlagen^[19]. Diese Spezifität wurde durch die Rekonstitution des Komplexes aus seinen Komponenten Neurophysin, Oxytocin und Vasopressin im gleichen Verhältnis wie im

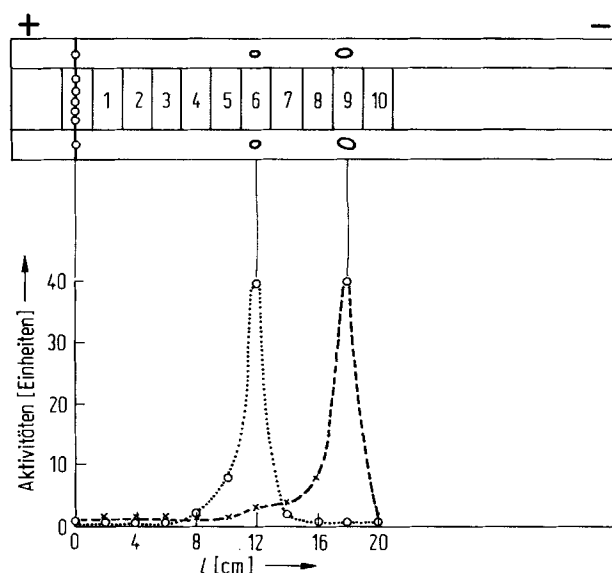


Abb. 4. Papierelektrophoretische Identifizierung von Oxytocin und Arginin-Vasopressin im kathodischen Material, das durch Elektrodialyse des Überstands nach Spaltung des „aktiven“ Komplexes mit 0.5proz. Trichloressigsäure erhalten wird. Oben: Elektrophoresestreifen, mit Bromphenolblau entwickelt, darunter Nummern der Fraktionen. Unten: Aktivitätstest; Oxytocin-Aktivität, ---- Vasopressin-Aktivität. l = Wanderungsstrecke in Richtung Kathode (nach [20]).

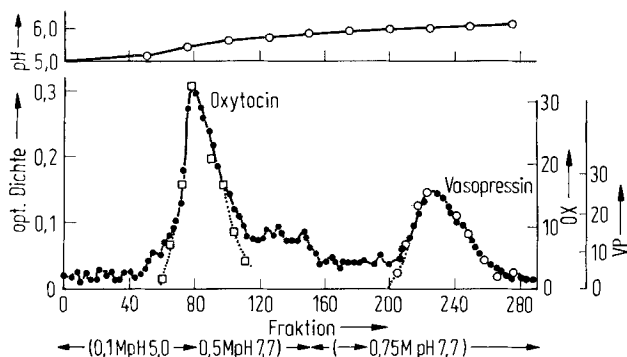


Abb. 5. Gleichzeitige Isolierung von Oxytocin und Arginin-Vasopressin durch Gradientenchromatographie an Amberlite CG-50 aus dem Überstand, der durch Spaltung des „aktiven“ Komplexes aus Rinderdrüsen mit 0,5proz. Trichloressigsäure erhalten wird. Rechte Ordinaten: Oxytocin-(OX-) und Vasopressin-(VP-) Aktivität [Einheiten] (nach [22]).

Ausgangskomplex bestätigt^[23]. Außerdem konnten wir „Hybrid“-Komplexe herstellen, indem wir Neurophysin einer Spezies und Hormone einer anderen Spezies verwendeten; so konnten wir z. B. mit Neurophysinen von Säugetieren als selektiven Adsorbentien die aktiven Prinzipien von niederen Wirbeltieren reinigen^[24].

Neurophysin-Hormon-Komplexe sind aus den Drüsen vieler Säugetier-Spezies gewonnen worden. Offenbar ist dieser Assoziationstyp unter den Wirbeltieren allgemein verbreitet. Beim Weißfisch^[25] erfordert die Ausfällung des Komplexes eine höhere Natriumchlorid-Konzentration als bei den Säugern. Dies könnte ein Hinweis auf einen anderen Aufbau der Neurophysine niederer Wirbeltiere sein, aber auch einen Abbau anzeigen. Im allgemeinen läßt sich bei diesen Spezies die Ausbeute an Komplex durch Zugabe von Rinder-Neurophysin zu den Extrakten steigern.

3. Charakterisierung der Neurophysine

3.1. Reinigung der Neurophysine

Während das aus dem Komplex abgespaltene Neurophysin bei der Gegenstromverteilung (Abb. 3) und der Papier-elektrophorese bei pH-Werten über 7 eine gewisse Heterogenität aufwies, verhielt es sich in der Ultrazentrifuge wie eine einheitliche molekulare Spezies. Bei der Stärkegel-Elektrophorese bei pH=8.1 beobachtete Hope^[16] jedoch, daß das unter unseren Bedingungen isolierte Neurophysin mehrere Bestandteile enthielt. Zum Teil führte er dies auf proteolytischen Abbau während der Extraktion bei pH=4 zurück und empfahl eine Extraktion mit 0.1 N Salzsäure, um proteolyti-

sche Enzyme irreversibel zu denaturieren. Unter diesen Bedingungen werden jedoch zusammen mit dem Komplex einige Proteine mit höherem Molekulargewicht extrahiert, die in einem zusätzlichen Molekularsiebschritt eliminiert werden müssen. Hope^[16] fand bei den Neurophysinen vom Rind und vom Schwein zwei Hauptkomponenten und eine Nebenkomponente und schlug vor, sie in der Reihenfolge abnehmender Beweglichkeit in Anodenrichtung als Neurophysin I, II usw. zu bezeichnen. Diese zur Zeit gebräuchliche Nomenklatur kann aber nicht vorhandene Homologien zwischen den Neurophysinen verschiedener Spezies nahelegen, da Zahl und Beweglichkeit der Komponenten in jeder Spezies variieren und die Unterscheidung zwischen den authentischen Molekülen und ihren Abbauprodukten schwierig ist. So beobachtet man z. B. beim Schaf mehrere Neurophysine, obwohl nur ein Hauptprotein nachweisbar ist^[26, 26a, 27, 27a]. Dieses Phänomen der Polymorphie tritt bei mehreren Säugetieren einschließlich Mensch^[28] und Ratte^[29] auf. Dagegen haben Sachs et al.^[30] beim Meerschweinchen nur ein einziges Neurophysin nachweisen können.

Inzwischen sind auch beim Meerschweinchen mindestens zwei Neurophysine mit unterschiedlicher Sequenz gefunden worden^[42a].

Die Neurophysine werden hauptsächlich nach zwei Verfahren gereinigt, die sich in ihren Anfangsschritten stark voneinander unterscheiden. Im allgemeinen ist das Ausgangsmaterial ein Acetonpulver aus Hypophysen-Hinterlappen, es kann aber auch aus frischen oder gefrorenen Drüsen bestehen. Sehr wichtig scheint zu sein, wie schnell die Drüsen nach der Tötung der Versuchstiere entfernt werden. Beim ersten Verfahren^[20, 27] wird das Pulver bei 4°C mit 0.01 N Schwefelsäure (pH=4) extrahiert. Unter diesen Bedingungen besteht der größte Teil des extrahierten Materials aus dem Neurophysin-Neurohypophysenhormon-Komplex, der durch fraktionierende Fällung mit Natriumchlorid (pH=3.9) gereinigt wird (Tabelle 1).

Nach Entfernung der Salze wird der Komplex mit 0.2 N Essigsäure in die Proteine und die Peptidhormone zerlegt, die durch Gelchromatographie über Sephadex G-25 getrennt werden. Die Proteine bestehen im wesentlichen aus Neurophysinen, die sich chromatographisch am basischen Ionenaustauscher Diethylaminoethyl-sephadex A-50 mit einem Ionenstärkegradienten (0.2–1 M Pyridiniumacetat-Puffer) trennen lassen (Abb. 6). Unter diesen Bedingungen erhält man zwei Fraktionen. Fraktion A enthält bei Rind, Schaf und Schwein ein Neurophysin, das wir nach den Aminosäuren in Position 2, 3, 6 und 7 als MSEL-Neurophysin bezeichnen (vgl. Tabelle 2). Dieses Material kann je nach den Prä-

Tabelle 1. Neurophysin-Neurohypophysenhormon-Komplexe von Säugetieren. OX = Oxytocin, VP = Vasopressin. Der Gewichtsanteil des Komplexes bezieht sich auf das Pulver.

Spezies	Pulver aus Hypophysen-Hinterlappen Aktivität [Einheiten/mg]			Komplex			Ausbeute an Aktivität [%]	
	OX	VP	VP/OX	OX	VP	VP/OX		
Rind	1.0	1.1	1.1	18–20	18–20	1.0	27	30
Kalb (neugeboren)	0.4	1.0	2.5	9	21	2.3	61	67
Schaf	0.8	0.8	1.0	18	18	1.0	92	90
Schwein	1.4	1.4	1.0	18	18	1.0	19	19
Pferd	0.9	0.8	0.9	20	10	0.5	18	10
Wal	0.5	2.5	5.0	5	20	4.0	47	57
Ratte	1.2	1.4	1.2					
Kaninchen	0.9	1.7	1.9					

parationsbedingungen des Acetonpulvers Derivate enthalten, die am N- und C-Terminus um mehrere Reste verkürzt sind. Fraktion B enthält gewöhnlich sowohl einen zweiten Neurophysin-Typ (VLDV-Neurophysin) als auch (nicht identifizierte) Abbauprodukte.

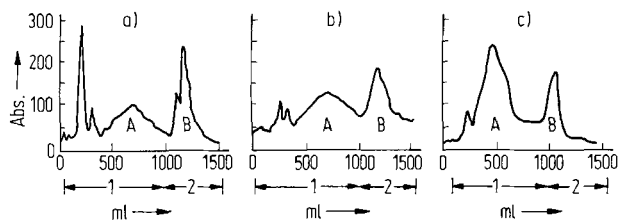


Abb. 6. Isolierung der Neurophysine von a) Rind, b) Pferd und c) Schaf durch Gradientenchromatographie an DEAE-Sephadex A-50. Ordinate: Absorption bei 700 nm (Folin). A, B siehe Text. 1: 0.2 M→0.4 M; 2: 0.4 M→1.0 M. pH=5.9 (nach [27]).

Beim zweiten Verfahren, das *Hope et al.*^[16], *Breslow*^[17] sowie *Watkins*^[26] anwenden, wird das Acetonpulver mit 0.1 N HCl bei pH-Wert ≈ 2 extrahiert. Neutralisation auf pH=7 führt zu einem Niederschlag, der durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Nach Rückstellung auf pH=3.9 und Ausfällung mit Natriumchlorid erhält man ein Material, das neben dem Komplex noch kontaminierende Proteine mit höherem Molekulargewicht enthält. Die Peptidfraktion des Extraktes wird durch Gelfiltration über Sephadex G-25 in 0.1 M Ameisensäure abgetrennt. Die Entfernung der höhermolekularen Proteine von der Proteinfraktion gelingt durch anschließende Gelfiltration an Sephadex G-75. Danach wird die „Neurophysinfraktion“ am basischen Ionenaustauscher Diethylaminoethyl-sephadex A-50 bei konstantem pH-Wert (8.1; Tris-HCl) und ansteigendem Natriumchlorid-Gradienten chromatographiert. Auf diese Weise lassen sich zwei oder drei Fraktionen voneinander trennen, aus denen mindestens drei Komponenten unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit durch wiederholte Chromatographie isoliert werden können. Trotzdem hat man durch Proteinsequenzanalyse in den Rinder-, Schweine- und Schafsdrüsen nur zwei Neurophysine nachweisen können. Auch andere Reinigungsverfahren, darunter selektive Extraktion, isoelektrische Fokussierung oder Affinitätschromatographie an immobilisierten Hormonen, sind ausprobiert worden, werden aber bisher noch kaum angewendet.

3.2. Aminosäuresequenz der Neurophysine

Das Molekulargewicht der Neurophysine steht noch zur Diskussion. *Hope et al.* erhielten mit der Ultrazentrifuge bei pH=4.8 Werte von 19000 und 21000 für die Rinder-Neurophysine I und II^[16]. Unter Annahme eines Molekulargewichts von 25000 bis 30000 für den Komplex ließ sich abschätzen, daß ein Neurophysinmolekül mit einem Molekül Oxytocin und einem Molekül Arginin-Vasopressin assoziiert ist. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts mit der Molekularsiebmethode an Sephadex G-75 bei pH=7 erhält man sowohl für den Komplex als auch für die „unreinen“ oder gereinigten Neurophysine Werte in der Größenordnung

von 15000 bis 20000^[26,31,32]. Dagegen ergibt die Molekulargewichtsbestimmung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat für die Neurophysine kleinere Werte um 12500^[32]. Schließlich fand man bei der Sequenzanalyse der Neurophysine (nach Oxidation und tryptischer Spaltung) ein Molekulargewicht von rund 10000 für das Monomer. Zwischen pH=4 und 8 dürften demnach die Monomere zu einem bei der Gelfiltration oder der Ultrazentrifugation stabilen Dimer assoziieren.

Man könnte auch argumentieren, daß Ultrazentrifugation oder Gelfiltration wegen der ungewöhnlichen Konformation des Moleküls ein zu hohes Molekulargewicht ergeben^[44a].

Die bisher isolierten Neurophysine sind saure Proteine mit isoelektrischen Punkten zwischen 4 und 5. Sie unterscheiden sich von anderen Proteinen durch einen sehr hohen Gehalt

Tabelle 2. Aminosäuresequenz der MSEL-Neurophysine von Schaf [34, 34a], Rind [34, 34a], Schwein [37, 37a, b], Pferd [37c] und Wal [37d].

	1	5	10
Schaf	Ala - Met - Ser - Asp - Leu - Glu - Leu - Arg - Gln - Cys - Leu - Pro -		
Rind			
Schwein			
Pferd			
Wal			
	15	20 21	25
Cys - Gly - Pro - Gly - Gly - Lys - Gly - Arg - Cys - Phe - Gly - Pro - Ser - Ile - Cys -			
	30	35 36	40 41
Cys - Gly - Asp - Glu - Leu - Gly - Cys - Phe - Val - Gly - Thr - Ala - Glu - Ala - Leu -			
		- Met -	
	45	48 50	55
Arg - Cys - Gln - Glu - Glu - Ile - Tyr - Leu - Pro - Ser - Pro - Cys - Gln - Ser - Gly -			
		- Asn -	
		- Asn -	
		- Asn -	
		- Asn -	
	60 61	65	70
Gln - Lys - Pro - Cys - Gly - Ser - Gly - Gly - Arg - Cys - Ala - Ala - Ala - Gly - Ile -			
	75	80 81	85
Cys - Cys - Asn - Asp - Glu - Ser - Cys - Val - Thr - Glu - Pro - Glu - Cys - Arg - Glu -			
	89 90 91 92	95	
Gly - Ile - Gly - Phe - Pro - Arg - Arg - Val			
Ile			
- Val -			
	- Ala - Ser -	- Leu -	- Ala
	- Ala -	- Leu -	- Ala
	- Ala - Ser -		- Ala

an Cystin (sieben Disulfidbrücken bei einer Kette mit 93–95 Resten) und Prolin (sieben bis acht Reste) sowie durch einen sehr geringen Gehalt an aromatischen Aminosäuren: Sie enthalten kein Tryptophan, nur einen Tyrosinrest und zwei bis vier Phenylalaninreste pro Molekül. Das erklärt das atypische UV-Absorptionsspektrum mit einem Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm größer als 1.

Nach Hope et al.^[16] besitzen die drei in Rinder- und Schweinedrüsen nachweisbaren Neurophysine alle ein N-terminales Alanin. Ein ähnliches Ergebnis erhielt man für die drei Komponenten vom Schaf^[26]. Dagegen ergab die Aminosäureanalyse der Rinder-Neurophysine, daß Neurophysin I Histidin, aber kein Methionin, enthält, während die Neurophysine II und C Methionin, aber kein Histidin besitzen^[16]. Beim Schwein enthält keines der drei Neurophysine Histidin und nur zwei davon Methionin. Die An- oder Abwesenheit von Methionin dient häufig als Unterscheidungsmerkmal für die Neurophysine einer Spezies.

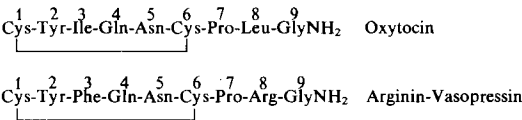
Vollständige Aminosäuresequenzen existieren nur für die Neurophysine von Rind, Schaf, Schwein, Pferd und Wal. N-terminale Sequenzen sind auch für die Neurophysine von Ratte, Hund, Kabeljau und Mensch bekannt. Es sieht so aus, als ob jede Spezies mindestens zwei Neurophysine mit deutlich voneinander abweichenden N- und C-terminalen Sequenzen besitzt. Wir haben deshalb vorgeschlagen, je nach den Resten an den Positionen 2, 3, 6 und 7 zwei Familien zu

variiert der C-terminale Abschnitt an den Positionen 89 bis 92 und 95. Beim Rind tritt in Position 89 eine Mikroheterogenität auf.

Mit Ausnahme der Position 90, an der Glycin oder Serin steht, befinden sich in den „variablen“ Positionen der C-terminalen Sequenz hydrophobe Reste. Eigenartigerweise scheinen die Positionen 89 und 95 voneinander abhängig zu sein, da beide entweder durch Alanin (Schwein, Pferd, Wal) oder aber durch Isoleucin oder Valin (Rind und Schaf) besetzt sind.

Die fünf bisher untersuchten Spezies gehören zu drei Ordnungen: den Artiodactyla (Rind, Schaf, Schwein), den Perissodactyla (Pferd) und den Cetacea (Wal). Diese drei Ordnungen haben sich seit 70 bis 80 Millionen Jahren getrennt entwickelt. Bezogen auf Schaf-MSEL-Neurophysin sind in zwei Ordnungen 4–5% der Aminosäuren ausgetauscht. Die „Drift“ des MSEL-Neurophysins im Verlauf der Evolution ist also gering im Vergleich zu der der Hämoglobinketten (12–20%). Die große Ähnlichkeit zwischen Rinder- und Schaf-MSEL-Neurophysin erinnert an die Ähnlichkeit der Polypeptidhormone der Hypophyse (Tabelle 3). Eine „neutrale“ Drift läßt sich nur schwer vorstellen, da sich beide Spezies (die zur Unterordnung Ruminantia gehören) vor etwa 30 Millionen Jahren voneinander getrennt haben und die Zahl der ausgetauschten Aminosäuren nicht proportional zur Zeit ist.

Tabelle 3. Aminosäuresequenz der Neurohypophysen-Hormone.



	Oxytocin-Typ			Vasopressin-Typ		
	4	8		3	8	
Säuger (außer Schwein)	Gln	Leu	Oxytocin	Phe	Arg	Arginin-Vasopressin
Schwein	Gln	Leu	Oxytocin	Phe	Lys	Lysin-Vasopressin
Vögel, Reptilien, Amphibien, Lungen- fische	Gln	Ile	Mesotocin	Ile	Arg	Vasotocin
Knochenfische (<i>paleopterygia</i> und <i>neopterygia</i>)						
Knorpelfische (Rochen)	Ser	Ile	Isotocin	Ile	Arg	Vasotocin
Knorpelfische (Haie)	Ser	Gln	Glumitocin	Ile	Arg	Vasotocin (?)
	Gln	Val	Valitocin	Ile	Arg	Vasotocin (?)
	Asn	Leu	Aspartocin	Ile	Arg	Vasotocin (?)

unterscheiden, die MSEL- und die VLDV-Neurophysine^[33]. Alle Neurophysine sind einkettige Polypeptide aus 92–95 Aminosäuren.

Die bisher bekannten vollständigen Aminosäuresequenzen der MSEL-Neurophysine sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die von Walter et al.^[35, 36] vorgeschlagene Aminosäuresequenz des MSEL-Neurophysins vom Rind scheint aus Analogiegründen^[38] weniger wahrscheinlich als die Sequenz in Tabelle 2 zu sein. Die von Chauvet et al.^[34] vorgeschlagene Aminosäuresequenz des Rinder-MSEL-Neurophysins wurde von Wuu und Crumm bestätigt^[34b].

Bei den bisher charakterisierten MSEL-Neurophysinen ist ein sehr langer N-terminaler Abschnitt nahezu invariant; ein Austausch findet nur in den Positionen 36 (in allen Spezies Valin bis auf Methionin beim Wal) und 48 statt (in allen Spezies Asparagin bis auf Isoleucin beim Schaf). Dagegen

Alle MSEL-Neurophysine enthalten 14 Cystein-Reste pro Molekül (Monomer), die sieben Disulfidbrücken bilden. Für das Rinderprotein ist eine bestimmte Verknüpfungsweise vorgeschlagen worden^[39]; da aber die zugrunde gelegte Sequenz fraglich ist, bleibt die Lage der Disulfidbrücken noch zu klären.

Die VLDV-Neurophysine scheinen weniger häufig vorzukommen als die MSEL-Neurophysine, und ihr Anteil variiert offenbar von Spezies zu Spezies, so daß ihre Charakterisierung noch nicht so weit fortgeschritten ist. Die Fertigstellung der vollständigen Aminosäuresequenz des VLDV-Neurophysins vom Schwein (Neurophysin II) ist angekündigt worden^[40]. Die N-terminalen Sequenzen der VLDV-Neurophysine von Rind (Neurophysin I)^[41], Mensch (Neurophysin I)^[42], Ratte (Neurophysin II)^[42a] und Hund (Neurophysin I)^[42b] sind bekannt. Vermutlich enthalten die VLDV-Neu-

rophysine etwa 92–93 Aminosäuren pro Molekül und ebenfalls 14 Cystein-Reste, d. h. sie ähneln den MSEL-Neurophysinen.

Vor kurzem ist die vollständige Aminosäuresequenz von Schweine-^[40a] und Rinder-VLDV-Neurophysin^[40a, 41a] veröffentlicht worden (Tabelle 4)^[40a]. Die Sequenz für Rinder-VLDV-Neurophysin in Tabelle 4 mit C-terminalem Glutamin unterscheidet sich von der von *Schlesinger* et al.^[41a] angegebenen, die an dieser Stelle Leucin enthält. In Tabelle 5 werden die bis jetzt bekannten fünf MSEL- und zwei VLDV-Neurophysine verglichen. Innerhalb einer Spezies beträgt die Homologie etwa 80%. Die Homologie innerhalb der MSEL-Gruppe (fünf Spezies) liegt zwischen 95 und 99%. Auch beim Menschen konnten inzwischen die beiden Arten von Neurophysinen nachgewiesen werden^[40b]; die Dualität tritt demnach in allen untersuchten Spezies auf.

Tabelle 4. Aminosäuresequenz von Schweine- und Rinder-VLDV-Neurophysin. Die Anordnung der tryptischen Peptide (Schwein: T1-T7; Rind: T1-T6) ist mit überlappenden Peptiden ermittelt worden, die mit der Protease aus *Staphylococcus* (S1-S5) und durch Sequenzierung (N-terminale Sequenz) erhalten wurden (nach [40a]).

Schwein ¹ Ala - Val - Leu - Asp - Leu - Asp - Val - Arg - Lys - Cys - Leu - Pro -
 Rind ^{T1} Thr -
 T2 20 T3
 Cys - Gly - Pro - Gly - Gly - Lys - Gly - Arg - Cys - Phe - Gly - Pro - Ser - Ile - Cys -
 T2 T3
 S1 S2
 Cys - Gly - Asp - Glu - Leu - Gly - Cys - Phe - Val - Gly - Thr - Ala - Glu - Ala - Leu -
 S1 S2
 T4 S3
 Arg - Cys - Gln - Glu - Glu - Asn - Tyr - Leu - Pro - Ser - Pro - Cys - Gln - Ser - Gly -
 T4 S3
 T5
 Gln - Lys - Pro - Cys - Gly - Ser - Glu - Gly - Arg - Cys - Ala - Ala - Ala - Gly - Ile -
 T5
 T6
 Cys - Cys - Asn - Pro - Asp - Gly - Cys - Arg - Phe - Asp - Pro - Ala - Cys - Asp - Pro -
 S4 T7, S5
 Glu - Ala - Thr - Phe - Ser - Gln
 S4 T6, S5
 - Ala -

Die beiden Neurophysinfamilien scheinen einen langen mittleren Abschnitt von etwa 65 Resten (zwischen den Positionen 10 und 75) gemeinsam zu haben und sich im wesentlichen nur in den N- und C-terminalen Abschnitten zu unterscheiden. Dies weist deutlich darauf hin, daß die Polymorphie durch Duplikation entstanden ist. Andererseits ist aus

Tabelle 5. Vergleich von MSEL- und VLDV-Neurophysinen. Obere Reihe: Sequenz der MSEL-Neurophysine von Schaf, Rind, Schwein, Pferd und Wal. Untere Reihe: Sequenz der VLDV-Neurophysine von Schwein und Rind. Ausgetauschte Aminosäuren innerhalb der beiden Gruppen sind angegeben (nach [40a]).

	1	2	3	5	6	7	9	10						
MSEL	Ala	Met	Ser	Asp	Leu	Glu	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Pro	Cys	-
VLDV	---	Val	Leu	---	---	Asp	Val	---	Lys Thr	---	---	---	---	---
	15			20	21			25						
Gly	Pro	Gly	Gly	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Gly	Pro	Ser	Ile	Cys	Cys
<hr/>														
	30			35	36			40	41					
Gly	Asp	Glu	Leu	Gly	Cys	Phe	Val Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg
	- Val -													
<hr/>														
	45		48		50			55						
Cys	Gln	Glu	Glu	Asn Ile	Tyr	Leu	Pro	Ser	Pro	Cys	Gln	Ser	Gly	Gln
	- Asn -													
<hr/>														
	60	61		64	65			70						
Lys	Pro	Cys	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Cys
	- Glu Gly -													
<hr/>														
	75			80	81	82		85						
Cys	Asn	Asp	Glu	Ser	Cys	Val	Thr	Glu	Pro	Glu	Cys	Arg	Glu	Gly
---	Asn Ser	Pro	Asp	Gly	---	Arg His	Phe Glu	Asp	---	Ala	---	Asp	Pro	Glu
<hr/>														
89	90	91	92	93		95								
Ile	Gly	Phe	Pro			Val								
Val	-	-	-	-	Arg	Arg	-							
Ala	Ser	Leu	Leu			Ala								
Ala	Thr Ala	-	Phe	Ser	Gln									

der internen Homologie zwischen zwei Teilen derselben Kette die Hypothese abgeleitet worden, daß die Kette durch partielle Duplikation aus einem primitiven, für 55–60 Reste codierenden Gen und anschließende Fusion der Tochtergene entstanden ist^[41].

3.3. Konformation der Neuropeptide

Die dreidimensionale Struktur der Neuropsychine ist noch nicht bestimmt worden. Die CD-Spektren der MSEL- und VLDV-Neuropsychine vom Rind sind einander sehr ähnlich und sprechen für einen geringen Anteil an α -Helix (etwa 5%), aber einen hohen Gehalt an β -Struktur (etwa 40%)^[17, 43]. Die auffallend leichte Reduktion der Disulfidbrücken in Abwesenheit von Harnstoff^[44, 44a] weist auf eine wenig kompakte Konformation hin. In Abwesenheit von Harnstoff, der normalerweise für die Auffaltung von Proteinen benutzt wird, werden die sieben Disulfidbrücken des Moleküls vollständig durch Dithiothreitol reduziert, was durch eine von Natur aus lockere Struktur des Proteins erklärt werden könnte. Auch seine Spaltbarkeit durch Enzyme ermöglicht dieselbe Schlußfolgerung: Das Protein wird, wenn seine sieben Disulfidbrücken intakt sind, praktisch genauso durch Trypsin und Chymotrypsin gespalten wie im aufgefalteten Zustand nach Reduktion und Alkylierung^[44a]. Diese ausgedehnte Konformation läßt sich durch die große Zahl von Prolinresten erklären, die für Proteine tierischen Ursprungs höchst ungewöhnlich ist.

Molekulargewichtbestimmungen in Abwesenheit dissozierender Agentien legen nahe, daß zwei Untereinheiten zwischen pH=3 und 8 zu einem Dimer assoziiert sind; daneben könnten auch höhere Aggregate existieren. Vermutlich binden sich die Hormone an das Dimer; seine Konformation ist noch unbekannt.

4. Wechselwirkung zwischen Neurophysinen und Neurohypophysen-Hormonen

Die relativ geringe Größe der Neurophysine und vor allem der Neurohypophysen-Hormone, die zu den kleinsten biologisch aktiven Peptiden gehören, macht den Komplex zu einem besonders einfachen Modell für das Studium von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Hinzu kommt, daß die Assoziation keine chemische Modifizierung wie z. B. bei der Proteolyse zur Folge hat, was die Beobachtung komplizieren würde. Eine sehr große Zahl von synthetischen Hormon-Analoga (über 200) ist, vor allem dank der Bemühungen von *du Vigneaud*, *Boissonnas* und ihrer Mitarbeiter, dargestellt worden; dadurch ist die Bestimmung der an der Assoziation beteiligten Reste möglich geworden. *Hope et al.*^[16] konnten Komplexe aus Rinder-Neurophysin und Arginin-Vasopressin in kristalliner Form erhalten, doch sind sie bisher nicht durch Röntgen-Strukturanalyse untersucht worden, so daß die dreidimensionale Struktur des Komplexes noch nicht bekannt ist. Indirekte Informationen erhält man aber aus der Gleichgewichtsdialyse sowie aus den Änderungen der UV-Absorption, des Circular dichroismus und der kernmagnetischen Resonanz bei der Bindung der Hormone an die Neurophysine.

4.1. Stöchiometrie der Assoziation

Nach Experimenten von *Breslow*^[17,45] erreicht die Änderung im CD-Spektrum das Maximum, wenn ein Mol Oxytocin oder Lysin-Vasopressin mit einem Mol monomeren

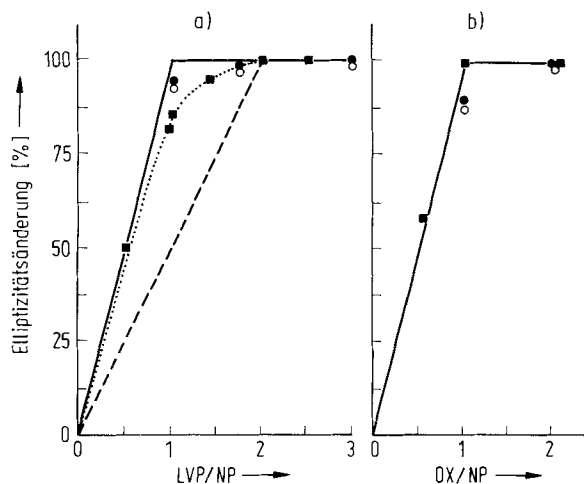


Abb. 7. Änderung des CD-Spektrums bei der Titration von nativem oder nitrtem Rinder-Neurophysin II (MSEL-Neurophysin, NP) mit a) Lysin-Vasopressin (LVP) und b) Oxytocin (OX). Angegeben ist die Elliptizitätsänderung für verschiedene Hormon-Protein-Verhältnisse in %, bezogen auf die Differenz der Elliptizität von gesättigtem Protein und der Summe der isolierten Komponenten. — Eine Bindungsstelle hoher Affinität, ··· eine Bindungsstelle mit $K = 2 \times 10^5$, --- zwei Bindungsstellen mit übereinstimmender Affinität. ● bzw. ○: natives Rinder-Neurophysin II, 280 bzw. 245 nm; ■ nitrtes Rinder-Neurophysin II, 350 nm (nach [45]).

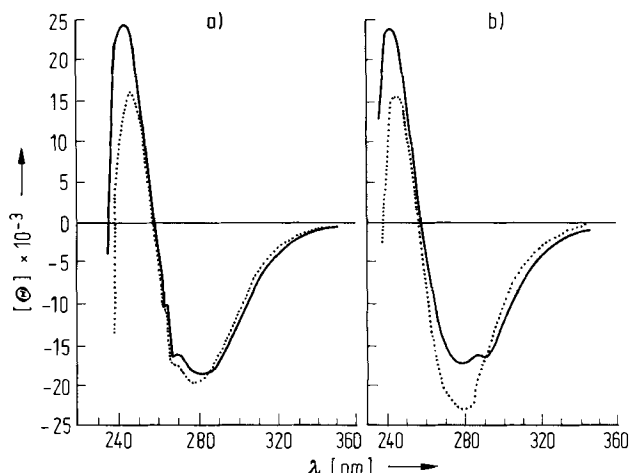


Abb. 8. Circular dichroismus im nahen UV von Rinder-Neurophysin II (MSEL-Neurophysin) in Gegenwart von a) 1×10^{-3} M S-Methyl-Cys-Phe-IleNH₂ und b) Met-Tyr-PheNH₂; — gemessen, ··· berechnet. Die letzteren Kurven wurden für 1×10^{-3} M Lösungen von Rinder-Neurophysin im entsprechenden Peptid unter Vernachlässigung von Wechselwirkungen berechnet (nach [43]).

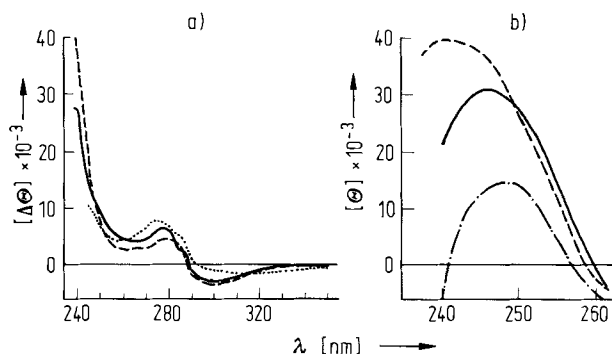


Abb. 9. a) Differenz-CD-Spektrum, erhalten durch Subtraktion der CD-Spektren der einzelnen Komponenten vom CD-Spektrum des Protein-Peptid-Komplexes. In Gegenwart von Oxytocin (—) oder von Lysin-Vasopressin (---) erhaltene Spektren repräsentieren quantitative Sättigung des Proteins mit Hormon, solche mit S-Methyl-Cys-Tyr-PheNH₂ (···) 90proz. Sättigung. b) CD-Spektren von Neurophysin II (----) und von Neurophysin II zusammen mit 2 Äquivalenten Oxytocin (—) oder Lysin-Vasopressin (---) (nach [45]).

Neurophysin (Molekulargewicht 10000) zusammentritt (Abb. 7–9). Durch Gleichgewichtsdialyse bei pH=7.4 unter Benutzung von markiertem Oxytocin, Lysin-Vasopressin und Rinder-Neurophysin II (MSEL-Neurophysin) fanden *Breslow* und *Walter*^[46], daß die beiden Hormone kompetitiv mit Bindungskonstanten von 1.2×10^4 M⁻¹ für Oxytocin und 8×10^3 M⁻¹ für Lysin-Vasopressin gebunden werden. Die Autoren geben außerdem an, daß die Affinitäten für Neurophysin I (VLDV-Neurophysin) ähnlich sind, so daß keine spezifische Assoziation zwischen einem der Neurophysine und einem der Hormone nachweisbar ist.

Andererseits lassen das Konkurrenzverhalten und die sehr ähnlichen Assoziationskonstanten vermuten, daß die Bindungsstellen des Neurophysins für beide Hormone im wesentlichen überlappen und vielleicht sogar identisch sind. Daraus kann direkt geschlossen werden, daß die Bindungsbereiche beider Hormone vor allem die gemeinsamen Reste umfassen (sieben der neun Reste). Die Interpretation von *Breslow* und *Walter* berücksichtigt aber nicht die Tatsache, daß das Neurophysin beim pH-Wert, bei dem Bindung erfolgt, wahrscheinlich als Dimer vorliegt, und nimmt implizit an, daß jedes Monomer seinen Liganden unabhängig bindet.

Kooperative Effekte beim Bindungsprozeß sind jedoch ebenfalls diskutiert worden^[47,48]. Bei Annahme eines stöchiometrischen Verhältnisses von 1 zu 1 für Neurophysin und Hormon muß man bei jedem Monomer mit einer eigenen Bindungsstelle rechnen und die beteiligten Reste identifizieren. Die relative Instabilität der Komplexe, die sich in den niedrigen Bindungskonstanten äußert, erschwert jedoch die Identifizierung der abgeschirmten Reste, wie sie bei der Bindung des pankreatischen Kunitz-Inhibitors an Trypsin und Chymotrypsin möglich war^[49,50].

4.2. Bindungsstelle der Hormone

Rinder-Neurophysine binden nicht nur die Neurohypophysen-Hormone von Säugern (Oxytocin, Arginin-Vasopressin, Lysin-Vasopressin), sondern auch die sechs aktiven Peptide, die man in den übrigen Vertebratenklassen findet (siehe Tabelle 3). Alle diese Hormone sind Nonapeptide, in denen nur die Aminosäuren in Position 3, 4 und 8 variieren^[24]. Bisher wurde vor allem die Rolle des ersten, des zweiten und des dritten Aminosäurerestes der Hormone bei der Bindung an die Neurophysine untersucht.

Aminosäurerest Nr. 1: Acher, Chauvet und Olivry^[20] hatten beobachtet, daß Dialyse bei pH = 2.75 gegen 0.1 M Essigsäure zur Dissoziation des Komplexes führt, wobei die Hormone den Dialysesack verlassen, während bei Dialyse gegen Wasser praktisch keine Dissoziation stattfindet. Diese Beobachtung sprach für die Existenz einer Ionenbindung zwischen Hormonen und Neurophysinen. Da bei den aktiven Peptiden alle Carboxygruppen in der Amidform vorliegen, kann beim pH-Wert, bei dem Bindung erfolgt, nur die α -Aminogruppe geladen sein, die in allen Fällen zu einem Cysteinrest gehört.

Die Entdeckung von du Vigneaud et al.^[51], daß diese Gruppe nicht nur unwichtig für die Hormonaktivität ist, sondern daß bei ihrer Entfernung sogar die Aktivität zunimmt, hat die Untersuchung der Bindung von Desamino-oxytocin an Neurophysin angeregt. Nach Beobachtungen von Stouffer, Hope und du Vigneaud^[52] verbindet sich Desamino-oxytocin im Gegensatz zu Oxytocin aber nicht mit Rinder-Neurophysinen, wenn diese bei pH = 3.9 mit Natriumchlorid präzipitiert wurden, auch sammelt es sich nicht in einem Dialysesack mit Neurophysinen, wenn man diese gegen eine Lösung des Peptids dialysiert.

Diese Beobachtungen wurden durch Breslow und Abrash^[53] bestätigt, die zeigen konnten, daß die Seitenkette des Cysteins in Position 1 ohne Beeinflussung der Bindung verlängert werden kann; 1-Homocystein-Oxytocin bindet sich genauso gut wie Oxytocin an das Protein. Später fanden Breslow et al.^[54,55], daß Tripeptid-Analoga der N-terminalen Sequenz, die in Position 1 S-Methylcystein oder Methionin enthalten, ebenfalls gebunden werden, während sich bei Ersatz durch ein Glycin die Bindungskonstante um das Dreißigfache verringert. Die Aminosäure in Position 1 der Analoga kann offenbar leicht variieren, doch sind Methylengruppen in β - und γ -Position für hydrophobe Kontakte und die an der elektrostatischen Bindung beteiligte α -Aminogruppe notwendig. – Es sei darauf hingewiesen, daß Desamino-Hormone aktiv sind, der Austausch des ersten Restes aber Inaktivität zur Folge hat.

Aminosäurerest Nr. 2: Oxytocin mit dem hydrophoben aliphatischen Isoleucin oder Glycin anstelle von Tyrosin in Position 2 wird im Gegensatz zu 2-Phenylalanin-Oxytocin nicht gebunden^[53]. Die Gegenwart einer aromatischen Aminosäure in Position 2 scheint demnach essentiell zu sein. Dies konnte mit Di- und Tripeptiden bestätigt werden^[54,55]. Diese Ergebnisse sprechen für die Notwendigkeit passender hydrophober Kontakte und vielleicht für die Existenz von π - π -Wechselwirkungen. D-Tyrosin-Oxytocin wird nicht gebunden^[53].

Tyrosin in Position 2 ist in allen Neurohypophysen-Hormonen anzutreffen. Diese Konstanz weist vermutlich auf eine Beteiligung an der Assoziation mit den Proteinrezeptoren der Zellmembran hin.

Aminosäurerest Nr. 3: Isoleucin ist in allen Neurohypophysen-Hormonen als dritter Rest enthalten (Ausnahme: Vasopressin, bei dem Phenylalanin diese Position besetzt). Oxytocin mit Glycin in Position 3 besitzt eine dreißigfach geringere Affinität^[53]. Gleichermaßen verringert ein Glycinrest in Position 3 bei Tri- und Tetrapeptiden die Bindungsaffinität^[55]. Demnach scheint eine hydrophobe aliphatische oder aromatische Aminosäure in Position 3 für die Bindung an das Neurophysin notwendig zu sein.

Interessanterweise ist Isoleucin in Position 3 offenbar essentiell für die Bindung der Hormone an den Uterusrezeptor, während Phenylalanin zu einer Bevorzugung des Nierenrezeptors führt. Die antidiuretische Spezialisierung des Säugetier-Arginin-Vasopressins, das vom Arginin-Vasotocin der anderen Vertebraten abgeleitet ist, ist im Verlauf der Evolution gerade durch diesen Austausch entstanden^[24].

Aminosäurereste Nr. 4–9: Die Reste 4–9 scheinen nicht wesentlich für die Bindung an die Neurophysine zu sein. 4-Glycin-Oxytocin wird beinahe so stark wie Oxytocin gebunden^[53], dasselbe gilt für 5-Valin-Oxytocin^[46]. Der Austausch von Glycinamid in Position 9 gegen Glycin verringert die Bindung um 50%^[46]. Position 8 ist in Oxytocin durch ein Leucin und in den Vasopressinen durch Lysin oder Arginin besetzt, ohne die Bindungsstärke zu beeinflussen. Schließlich bindet sich das Tripeptid S-Methyl-Cys-Tyr-PheNH₂, das mit den ersten drei Resten von Vasopressin übereinstimmt, an Mononitro-neurophysin II vom Rind mit $\frac{2}{3}$ der Freien Energie des Oxytocins oder des Lysin-Vasopressins^[45]. Demnach scheinen an der Bindung an die Neurophysine nur die drei ersten Reste der Nonapeptide beteiligt zu sein, während die Aufrechterhaltung der Hormonaktivität nur sehr geringe Sequenzvariationen erlaubt, insbesondere keine „Verstümmelungen“. Der Bereich der Wechselwirkung zwischen Peptid und Protein ist somit im Vergleich zu anderen Modellen mit binären Protein-Protein-Kontakten außergewöhnlich klein. Zu diesen relativ wenigen Kontakten passen die niedrigen Assoziationskonstanten. – Eine Festlegung der „Verankerungsstellen“ der Peptide ist noch nicht möglich.

4.3. Bindungsstelle des Neurophysins

Die Identifizierung von Aminosäureresten in den Hormonen, über die sie sich an die Neurophysine binden, hat zur Suche nach ihren Bindungspartnern in den Proteinen geführt. Das besondere Interesse galt der an der Ionenbindung beteiligten Carboxygruppe; außerdem wurde das einzige, in allen Neurophysinen vorkommende Tyrosin (Tyrosin-49) detailliert untersucht.

4.3.1. Asparaginsäure-30, Glutaminsäure-31 und -47

Die Beteiligung von mindestens einer Carboxygruppe an der Assoziation zeigt sich schon darin, daß bei Blockierung der sauren Reste der Neurophysine ein Derivat entsteht, das die Hormone nicht mehr bindet^[32]. Nach dem Grad der Protonenabgabe, die die Bindung von Oxytocin oder Lysin-Vasopressin an Rinder-Neurophysin II begleitet, kann man dieser bindenden Carboxygruppe einen pK-Wert von 4.3 zuordnen^[17]. Dies spricht mehr für eine Seitenkette als für die freie terminale α -Carboxygruppe des Proteins (pK = 3–3.5). Tatsächlich variiert die C-terminale Kettenregion in der Länge und in der Sequenz^[34], was die Bindung an dieser Stelle unwahrscheinlich macht. *Walter und Hoffman*^[56] wollen mit einem wasserlöslichen Carbodiimid die α -Aminogruppe von Arginin-Vasopressin mit der Carboxygruppe von Neurophysin II kovalent verknüpft und als beteiligte Reste Asp-30 oder Glu-31 identifiziert haben. Jeder dieser beiden Reste könnte im nichtkovalenten Komplex über eine Ionenbindung mit der Aminogruppe des Hormons verknüpft sein. *Breslow*^[45] hat aufgrund von Molekülmodellen die Beteiligung von Glu-47 vorgeschlagen. Die an der elektrostatischen Bindung beteiligten sauren Reste können also noch nicht endgültig lokalisiert werden.

4.3.2. Tyrosin-49

Alle Neurophysine besitzen einen einzigen Tyrosinrest in Position 49. Die gute Nachweisbarkeit durch UV-Spektroskopie, Circulardichroismus und kernmagnetische Resonanz hat die Aufmerksamkeit auf diesen Aminosäurerest gelenkt, der möglicherweise eine wesentliche Rolle bei der Bindung des Proteins spielt. Die erste Beobachtung, die für eine solche Beteiligung sprach, stammt von *Furth und Hope*^[57]. Die Autoren modifizierten das Tyrosin mit Tetranitromethan und zeigten, daß sich das Absorptionsspektrum des entstandenen Mononitrotyrosins während der Bindung von Arginin-Vasopressin so änderte, daß sich auf eine Erniedrigung seines pK_a-Wertes schließen ließ. Dies führte man auf die Nachbarschaft einer positiv geladenen Gruppe, der Guanidylgruppe in Arginin-8, oder auf die Annäherung einer positiv geladenen Gruppe des Proteins infolge einer Konformationsänderung zurück. *Breslow und Weis*^[43] wiederholten dieses Experiment unter Verwendung von CD-Messungen und spektrophotometrischer Titration. Danach erniedrigt Arginin-Vasopressin den pK_a-Wert von Nitrotyrosin von 7.45 auf 6.85 und verändert die Elliptizität des Tyrosins. Da diese Änderungen auch mit Oxytocin und mit Analoga beobachtet wurden, deren drei erste Reste sequenzgleich mit den Hormonen sind, konnten sie nicht durch Arginin-8 hervorgerufen worden sein. Nach NMR-Untersuchungen von *Breslow et al.*^[58, 59] werden die *ortho*- und *meta*-Protonen von Tyr-49 bei der Assoziation des Tripeptids *S*-Methyl-Cys-Phe-IleNH₂ beeinflusst. Dies bestätigt, daß die Umgebung dieses Restes durch die Bindung verändert wird. Durch Anwendung des Kern-Overhauser-Effekts konnte gezeigt werden, daß die Änderungen in der Umgebung von Tyr-49 bei der Komplexbildung der Annäherung des Peptidrestes in Position 2 zuzuschreiben sind^[59]. Beim oben erwähnten Tripeptid nimmt die Intensität der Signale der Ringprotonen von Phenylalanin nach Bestrahlung in Gegenwart von Neurophysin II ab; dies wird in Abwesenheit von Neurophysin II nicht beobachtet. Dieser Effekt tritt auch bei den Hormonen

mit Tyrosin in Position 2 auf. Offenbar werden die Änderungen nicht durch Stapeln der Phenolringe von Tyr-49 des Neurophysins und Tyr-2 des Hormons hervorgerufen. Wahrscheinlicher ist, daß Tyr-49, das im freien Protein möglicherweise durch einen Phenylalaninrest maskiert ist, aus seiner Position verdrängt wird, entweder direkt durch Tyr-2 oder infolge einer allgemeinen Konformationsänderung^[45]. Der Befund, daß Tyr-49 ohne Beeinflussung seiner Bindungskapazität dinitriert^[45] oder acetyliert^[57] werden kann, spricht nicht für ein Stapeln von Tyr-49 und Tyr-2. Tyr-49 des Neurophysins und Tyr-2 des Hormons dürften einander nicht direkt berühren, sondern nur unmittelbar benachbart sein. Die grundlegenden Ergebnisse von *Breslow* und ihrer Gruppe sind in der Folgezeit von anderen Forschern bestätigt worden^[60].

4.4. Konformationsänderungen bei der Bindung

Die Tatsache, daß die Assoziation von Hormonen und Neurophysinen die Ausfällung durch Natriumchlorid begünstigt^[52] und die Sedimentationskonstante erhöht, kann man entweder auf eine Modifikation der Tertiärstruktur des Proteins oder auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zur Seite des Dimers zurückführen. Die Wechselwirkung zwischen Hormon und Monomer ist schwierig von derjenigen zwischen den beiden Monomeren zu unterscheiden. Auch ist unklar, ob diese Wechselwirkungen voneinander unabhängig sind. Wenn das der Fall ist, muß das Protein neben einer Hormon-Bindungsstelle eine Kontaktstelle für die zweite Untereinheit besitzen (zur Struktur der Neurophysine vgl. Abschnitt 3.2 und 3.3).

Die Art der Kontakte und die möglichen Konformationsänderungen als Folge der Wechselwirkung zwischen Hormon und Neurophysin sind immer noch Gegenstand der Spekulation. Da sich die Seitenketten der Hormonreste 1, 2 und 3 an der Bindung beteiligen, kann man vermuten, daß die Disulfidbrücke 1–6 und der Phenolring des invarianten Tyrosins-2 betroffen sind. *Breslow*^[17, 43, 45, 61] hat die circular-dichroitisch gemessenen Effekte bei freiem und assoziiertem Rinder-Neurophysin II auf folgende Phänomene zurückgeführt:

1. den Anstieg der Elliptizität bei 195 nm und bei 240 nm auf eine Störung der Disulfidbrücken bei der Assoziation,
2. den Anstieg der um 280 nm zentrierten Elliptizität auf eine Störung des Tyrosins aus dem Hormon, möglicherweise mit einem geringen Beitrag des Tyrosins aus dem Protein^[43],
3. die Veränderungen im fernen UV-Spektrum auf Änderungen der Tertiärstruktur des Proteins oder auf direkte Störungen verschiedener Chromophore durch das gebundene Peptid.

Die Verschiebungen der Aminosäurereste des Proteins können mit Ausnahme der Änderung in der Orientierung von Tyr-49 (siehe Abschnitt 4.3.2) noch nicht bestimmt werden.

Andererseits sollte auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß die Abnahme der Bindungsaffinität zwischen pH = 6 und 2 die Folge einer carboxyl-abhängigen Änderung der Proteinkonformation ist^[61a]. Aus Temperatursprungrelaxationsmessungen hat man kürzlich abgeleitet, daß Oxytocin und Vasopressin sich mit größerer Affinität an das Neurophysindimer als an das -monomer binden und daß die Bin-

dung von Oxytocin und Vasopressin an das Neurophysindimer für beide Hormone bei pH=7.4 nahezu gleich stark ist^[62a].

5. Der mögliche gemeinsame Vorläufer von Neurophysinen und Neurohypophysen-Hormonen

Die stöchiometrische Assoziation der Neurohypophysen-Hormone und Neurophysine mag zufällig sein, und die durch Extraktion isolierten Komplexe könnten Artefakte sein. Dagegen spricht eine Reihe von Argumenten, die zeigen, daß die beiden Substanztypen bereits in den sekretorischen Granula assoziiert sind. Man muß die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß durch die Spaltung eines inaktiven Proteinvorläufers ein Neurophysin und ein aktives Peptid erzeugt werden, die assoziiert bleiben. Dies geschieht z. B. bei der Spaltung der Ribonuclease durch Subtilisin in das S-Peptid und das verkürzte Protein. Diese Hypothese, die sich auf cytologische und biochemische Beobachtungen stützt, hat man bisher aber noch nicht beweisen können (Abb. 10).

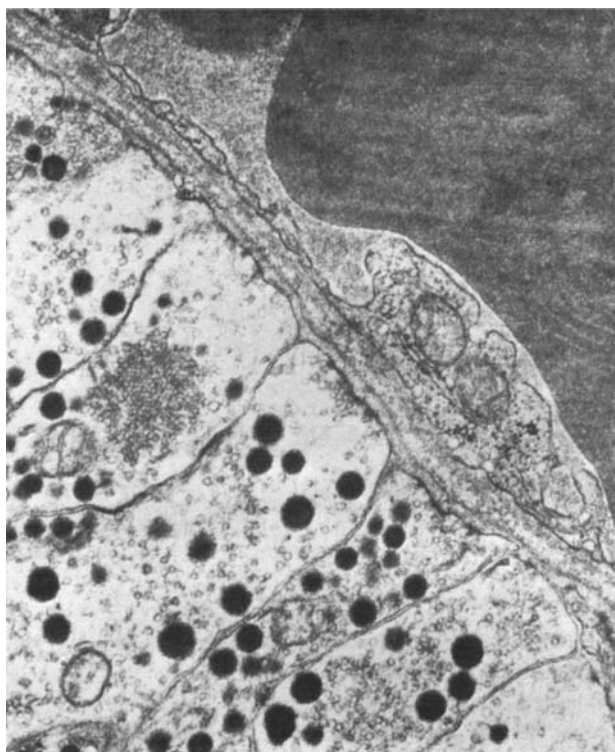


Abb. 10. Neurohypophysen-Ausläufer, die an eine Kapillare mit einem roten Blutkörperchen grenzen (oben rechts). Wie üblich sind die Endabschnitte der Neuronen von den perforierten Kapillarwänden durch die parenchymale und endotheliale Basalmembran abgegrenzt. Die Enden zeigen Anzeichen sekretorischer Aktivität: Sie enthalten nur wenige große, elektronendichte neurosekretorische Granula und viele Mikrovesikeln (synaptische Vesikeln (nach [80])).

In der Neurohypophyse von Säugetieren, die bei den verschiedenen Spezies unter ganz unterschiedlichen Aspekten untersucht worden ist, findet man gewöhnlich zwei Hormone, Oxytocin und Arginin-Vasopressin, die sehr oft in etwa gleichen Anteilen auftreten. Die Annahme liegt nahe, daß die beiden mutmaßlichen Proteinvorläufer wie die beiden Hormone nur etwas verschiedene Sequenzen haben und daß, falls die Neurophysine inaktiver Ballast sind, sie in der Drüse in derselben Zahl und wahrscheinlich im äquivalenten

Verhältnis vorkommen sollten. Dieses Argument ist allerdings experimentell nur schwer zu belegen, da einerseits die tatsächliche Zahl der unterschiedlichen Neurophysine nur durch Sequenzuntersuchungen festgestellt werden kann und andererseits das Zahlenverhältnis durch Abbau oder selektive Sekretion verändert werden könnte.

5.1. Biosynthese von Neurophysinen und Hormonen

Eine Reihe von Experimenten belegt, daß die Neurohypophysen-Hormone und die Neurophysine in Zellen synthetisiert werden, die im Hypothalamus lokalisiert sind. Die Zerstörung der supraoptischen und paraventriculären Kerne hat das Verschwinden der beiden Substanztypen zur Folge, wie man über ihre biologische Aktivität und durch cytochemische Reaktionen nachweisen konnte.

Sachs et al.^[62] haben die Biosynthese von Vasopressin studiert. Sie injizierten [³⁵S]-Cystein in die dritte Ventrikel von Hunden und entfernten 1.5 h danach den Hypothalamus. Die sofort untersuchte eine Hälfte des Gewebes enthielt Proteine, aber praktisch kein Vasopressin. Die zweite Hälfte wies nach 4.5 h Inkubation in einem Medium, das Puromycin (einen Syntheseblocker) und unmarkiertes Cystein enthielt, einen bedeutenden Anteil an markiertem Vasopressin auf. Diese Experimente sprechen für die Biosynthese eines inaktiven Makromoleküls als Vorstufe, die in einem Folgeschritt unter Bildung von aktivem Vasopressin gespalten wird. Sachs nahm an, daß diese Vorstufe an den Ribosomen in der Umgebung der Hypothalamuskern entsteht und daß die „Reifung“ (Spaltung) in den sekretorischen Granula während ihres axonalen Transportes zur Neurohypophyse stattfindet. Andererseits konnten Sachs et al.^[63] am Hundehypothalamus nach Infusion von markiertem Cystein ein markiertes Neurophysin nachweisen, dessen Molekulargewicht (durch Gelfiltration bestimmt) elektrophoretische Beweglichkeit (an Celluloseacetat) und immunologische Eigenschaften denen der Rinder-Neurophysine sehr ähnlich waren.

Während der subzellulären Fraktionierung folgte das markierte Protein dem Vasopressin. Bei Tieren, die 10–21 Tage beliebig viel Wasser trinken konnten, ließ sich das Protein aus dem Hinterlappen zurückgewinnen. Dessen in-vitro-Inkubation in einer hochprozentigen Kaliumlösung führte zur gleichzeitigen Sekretion von Vasopressin und markiertem Protein. In vivo erfolgte ihre gleichzeitige Sekretion und Ausschüttung ins Blut bei Hunden nach einem kräftigen Aderlaß. Diese Experimente weisen darauf hin, daß Biosynthese und Sekretion von Vasopressin und einem Neurophysin parallele Vorgänge sind.

Kürzlich zeigten Gainer et al.^[63a], daß direkt neben dem supraoptischen Kern der Ratte injiziertes [³⁵S]-Cystein sehr schnell in ein 20000-Dalton-Protein eingebaut wird, das nach gewisser Zeit in ein markiertes 12000-Dalton-Protein, das Neurophysin, und mehrere kleine Peptide umgewandelt wird, darunter wahrscheinlich auch Oxytocin und Vasopressin.

Brownstein et al.^[63b] beobachteten, daß sich zwei vermeintliche Neurophysinvorläufer ($pI=5.4$ und 6.1) mit Molekulargewichten um 20000 und zwei „Zwischenstufen“ ($pI=5.1$ und 5.6) mit Molekulargewichten um 17000, die aus supraoptischen Kernen extrahiert worden waren, spezifisch an Anti-Rattenneurophysin-Antiserum binden.

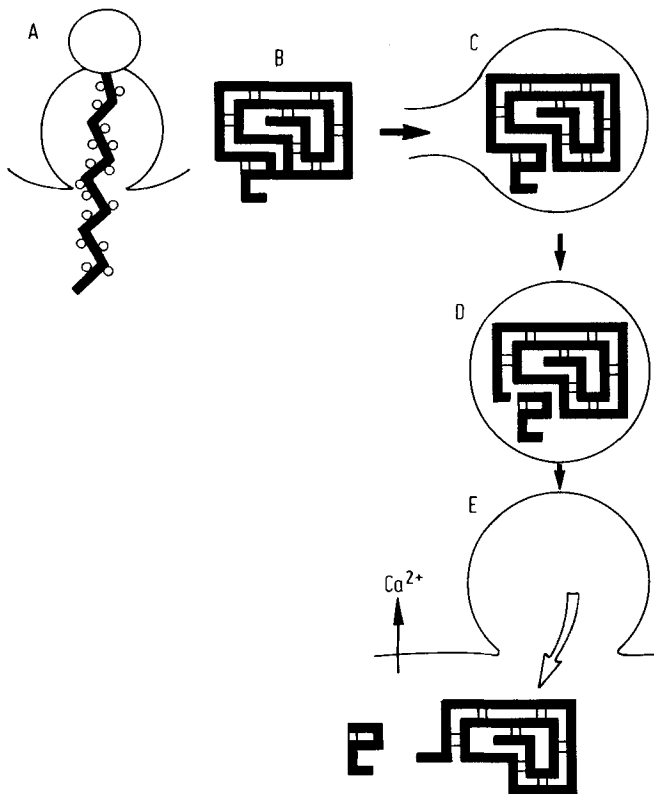


Abb. 11. Modell für Biosynthese, Transport und Ausschüttung der Hypophysenhinterlappen-Hormone und Neurophysine. A: Synthese des Vorläufers im rauen endoplasmatischen Retikulum; B: Faltung des Vorläufers; C: Bildung von neurosekretorischen Vesikeln im Golgi-Apparat; D: Axonaler Transport (2–3 mm/h); das durch eine Proteinase abgespaltene Hormon bleibt innerhalb der Vesikeln an Neurophysin gebunden; E: Exozytose; Depolarisation der neuronalen Plasmamembran durch ein sich ausbreitendes Aktionspotential; Freisetzung des Hormons und des Neurophysins (eventuell Konformationsänderung) (nach [16]).

Die Lokalisierung der Neurophysine und der Neurohypophysenhormone innerhalb der Neuronen scheint die Parallelität zu bestätigen und spricht für die Hypothese des gemeinsamen Vorläufers (vgl. Abb. 11).

5.2. Intrazelluläre Lokalisierung der Neurophysine und Hormone

5.2.1. Lokalisierung in den Neuronen durch immunocytologische Methoden

Die Identifizierung der Neurophysine im Perikaryon des supraoptischen Kerns der Ratte gelang Hope^[16] durch Immunofluoreszenz mit Schweine-Antineurophysin II. Daneben konnte er mit Hunde-Antineurophysin durch diese Technik den Transport des neurosekretorischen Materials durch axoplasmatischen Fluß in den Hypophysenstiel von Hunden demonstrieren: 20 h nach Abschnürung des Stiels beobachtete er im proximalen, nicht aber im distalen Teil eine Anreicherung an immunofluoreszierendem Material^[16] (Abb. 12). Bei der Ratte hat man sogar die Transportgeschwindigkeit eines dem Neurophysin ähnlichen markierten Proteins zu 2–3 mm/h abschätzen können^[64].

Die intrazelluläre Verteilung der Neurophysine haben Sokol et al.^[64a] im Hypothalamus und im Hinterlappen von gewöhnlichen Ratten (Long-Evans) und von Ratten mit Vasopressin-Mangel und erblichem Diabetes insipidus (Brattleboro-Stamm) mit der Immunoperoxidase-Technik untersucht (Abb. 13). Bei den homozygoten Brattleboro-Ratten

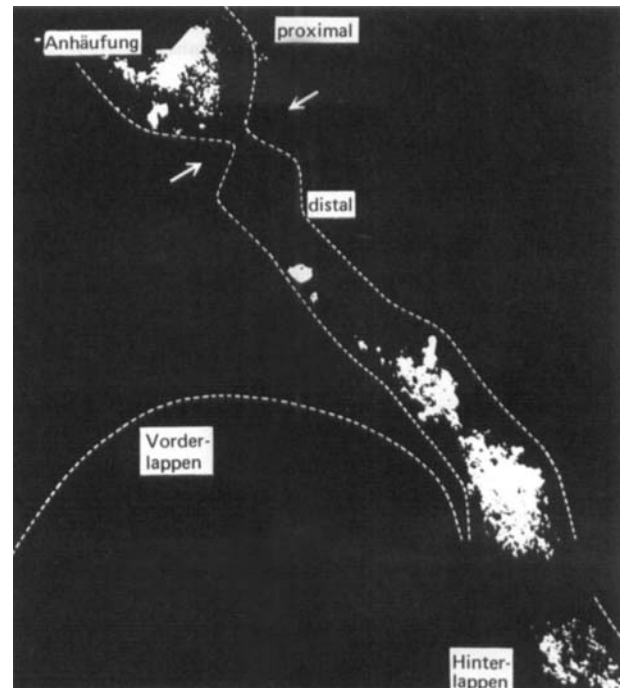


Abb. 12. Verteilung der Neurophysin-Immunofluoreszenz im Neurohypophysenstiel proximal und distal zur Einschnürung. Man beachte die Anhäufung von fluoreszierendem Material an der proximalen Seite (Pfeile), sein Fehlen in den Axonen in der Region kurz hinter der Einschnürung und sein Verschwinden in der proximalen Neurohypophyse (nach [81]).

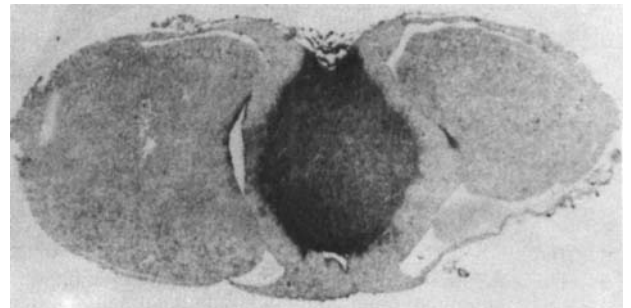


Abb. 13. Schwachlichtphotographie einer kränzförmig angeschnittenen Hypophyse der Maus; Immunoperoxidase-Färbung unter Verwendung von Anti-Mensch-Östrogen-stimuliertem Neurophysin. Der ganze Hinterlappen ist stark angefärbt. Der Mittel- und der große Vorderlappen sind praktisch frei von Reaktionsprodukten (nach [82]).

enthielten im Gegensatz zu normalen Ratten etwa 50% der magnozellularen Neuronen der supraoptischen und paraventriculären Kerne kein immunoreaktives Neurophysin. Offenbar fehlte den Vasopressin-defizienten Neuronen zugleich auch Neurophysin, was wiederum für eine gemeinsame Biosynthese spricht.

5.2.2. Lokalisierung innerhalb der neurosekretorischen Granula

Nach Isolierung der sekretorischen Granula aus Rinderhinterlappen durch gründliche Ultrazentrifugation in einem Rohrzuckergradienten konnte man durch Elektrophorese nachweisen, daß die beiden Hauptkomponenten des Rinder-Neurophysins wie auch die beiden Hormone in etwa gleichem Verhältnis vorliegen^[65]. Dean und Hope^[65] fanden, daß die beiden Neurophysine etwa 50% des Proteins in den Granula ausmachen. Darüber hinaus lagen in 15 einzeln untersuchten Drüsen jeweils die beiden Neurophysine vor, was

eine genetische Heterogenität ausschließt. Die Aminosäurezusammensetzung des ungereinigten „granulären“ Neurophysins entspricht einem 1:1-Gemisch der Neurophysine I und II^[65]. Außerdem legt die Verteilung von Oxytocin und Vasopressin im Zuckerrohrgradienten nahe, daß die beiden Hormone getrennt in verschiedenen Granula gespeichert sind^[65]. Dabei liegt Neurophysin I vermutlich in den das Oxytocin enthaltenden Granula und Neurophysin II in den das Vasopressin enthaltenden Granula vor^[66]. Das Auftreten zweier Kategorien von Granula mit jeweils eigenen Typen von Hormonen und Neurophysinen stützt wiederum die Hypothese des gemeinsamen Vorläufers der beiden Substanzen. Beim Schwein ist Lysin-Vasopressin in den Granula mit Neurophysin I (MSEL-Typ) assoziiert^[67]. Die Menge dieses Neurophysins verringert sich beim Dursten des Tieres. Durst hat auch die Ausschüttung von Lysin-Vasopressin zur Folge^[68]. Sämtliche Daten sprechen für die Verbindung des MSEL-Neurophysins mit dem Vasopressin. Interessanterweise entspricht dem Überschuß an Vasopressin (bezogen auf Oxytocin) in den Hinterlappen von Rinderföten ein Überschuß an MSEL-Neurophysin^[38].

Die gleichzeitige Ausschüttung eines Hormons und des entsprechenden Neurophysins läßt sich durch Exocytose erklären^[69]. Der Befund, daß die Neurophysine einer Spezies keine besondere Bindungsspezifität gegenüber dem einen oder dem anderen Hormon aufweisen, läßt vermuten, daß die Assoziation keine biologische Funktion beim Materialtransport hat, sondern daß sie einfach das Ergebnis der gemeinsamen Biosynthese ist.

Bei den höheren Wirbeltieren haben die in der Neurohypophyse endenden Neuronen ihren Ursprung in zwei Hypothalamus-Regionen, den Nuclei supraoptici und paraventriculares. Man konnte also annehmen, daß sich jede Region auf die Synthese eines Hormons spezialisiert hat. Neuere Untersuchungen sprechen jedoch nicht für eine solche Spezialisierung^[70,71]. Dies beeinträchtigt nicht die „ein-Neuron-ein-Hormon“-Hypothese, da jeder Nucleus beide Neuronentypen enthalten kann. Diese Ansicht wird auch durch cytologische Analysen von Brattleboro-Ratten gestützt, die an erblichem Diabetes insipidus leiden und Neuronen mit und ohne Granula aufweisen^[72].

5.2.3. Gemeinsame genetische Kontrolle von Vasopressin und einem Neurophysin

Der erbliche Diabetes insipidus der Brattleboro-Ratten ist entweder durch Fehler bei der Vasopressin-Biosynthese oder bei der Freisetzung von Vasopressin aus dem inaktiven Vorläufer bedingt^[73,74]. Dieser Mangel rührt von einem einzigen Gen her; bei heterozygoten Tieren liegt der Grad der Diuresekontrolle zwischen der von normalen Tieren und von homozygoten Mutanten. Es ist deshalb wichtig festzustellen, ob bei Abwesenheit von Vasopressin auch ein Neurophysin fehlt. Bei normalen Ratten hat man durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese drei Neurophysine (I oder A, II oder B, III oder C) gefunden^[75,76]. Bei Injektion von [³⁵S]-Cystein vor der Tötung beobachteten *Pickering* et al., daß das Verhältnis der Radioaktivität, die in die Neurophysine I und II eingebaut wurde, nahe beim Verhältnis von Vasopressin und Oxytocin in den Drüsen lag^[75]. Nun fehlt aber Neurophysin I bei den homozygoten Brattleboro-Ratten, und bei heterozygoten Ratten liegt es in geringerer Menge vor als Neuro-

physin II. *Pickering* et al.^[29,75] schlossen daraus, daß Vasopressin zusammen mit Neurophysin I (oder A) und Oxytocin zusammen mit Neurophysin II (oder B) synthetisiert wird. *Pickering* hat versucht, die jeweiligen Mengen an Neurophysin I und II mit Antiseren zu bestimmen. Trotz der geringen Spezifität – das Antiserum für Neurophysin I präzipitiert zu 20% auch Neurophysin II – schloß er daraus, daß Vasopressin und Neurophysin I (oder A) in der Drüse in etwa äquivalenten Mengen vorliegen. Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz eines Provasopressins, das bei der Spaltung Vasopressin und Neurophysin I ergibt, was wiederum mit der Schlußfolgerung von *Sachs* et al. übereinstimmt^[62,63].

Sunde und *Sokol*^[76] konnten ebenfalls beim Vergleich der Neurophysine normaler Ratten mit denen von homozygoten Brattleboro-Ratten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese das Verschwinden von Neurophysin I (Neurophysin A nach *Pickering*) bei den Brattleboro-Ratten beobachten. Dagegen liegen nach ihren Ergebnissen Neurophysin II (B) und III (C) in gleichen Mengen vor. Die Autoren haben die Molverhältnisse von Vasopressin/Neurophysin I und Oxytocin/(Neurophysin II + III) untersucht und Werte von 0.91 und 1.8 bei normalen Ratten und (0.0) sowie 1.77 bei den homozygoten Brattleboro-Ratten gefunden. Der Vasopressingehalt in den Hinterlappen von durstenden Ratten war beträchtlich geringer. Das Molverhältnis von Vasopressin zu Neurophysin I war aber bei drei Tage durstenden Tieren mit 1.31 ähnlich wie bei Kontrolltieren mit freiem Zugang zu Wasser (1.37). Wenn auch das Verhältnis zwischen Oxytocin und den Neurophysinen II + III zu schwanken scheint, so ist es für Vasopressin und Neurophysin I offenbar konstant. Es ist noch offen, ob Ratten-Neurophysin I zu den MSEL- oder VLDV-Neurophysinen gehört.

Sämtliche Beobachtungen an Brattleboro-Ratten sprechen dafür, daß ein einziges Gen die Biosynthese des Vasopressins und eines der Neurophysine kontrolliert und daß die beiden Substanzen Fragmente einer gemeinsamen Vorstufe sind.

6. Schlußbetrachtung

Das Problem der Biosynthese der Neurohypophysen-Hormone betrifft ganz allgemein auch die Biosynthese der Polypeptidhormone und im weiteren Sinne auch die Proteinsekretion. Seit den Arbeiten von *Steiner* et al.^[77] weiß man, daß die meisten Polypeptidhormone in Form eines inaktiven, größeren Vorläufers synthetisiert werden. So hat man Proinsulin, Proparathormon, Proglucagon, die Progastrine usw. in geringen Mengen in den sezernierenden Zellen nachweisen können. Es handelt sich hier um ein allgemeines Charakteristikum von sekretorischen Proteinen, da auch Proalbumin, Proenzyme usw. nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus hat man vor kurzem festgestellt, daß diese Proproteine selbst wieder Spaltprodukte sehr kurzlebiger chemischer Verbindungen sind, die als Prä-Proproteine bezeichnet werden. *Habener* et al.^[78] haben – inspiriert durch Untersuchungen am Prä-Proparathormon – ein allgemeines Schema für Biosynthese und Umwandlung vorgeschlagen. Die ursprüngliche Proteinkette, das Ergebnis der Translation der Messenger-RNA, verläßt das Ribosom mit seinem Aminoterminus und durchdringt die Membran einer Zisterne des endoplasmatischen Reticulums. Ein N-terminaler, aus etwa 20 meistens hydrophoben Aminosäuren bestehender Kettenab-

schnitt bildet den „Perforator“ der Membran, die selbst hydrophob ist. Der Rest der Kette soll in den so geformten Kanal eindringen können. Der N-terminale Abschnitt, das Präpeptid, wird innerhalb von 1–2 min vermutlich enzymatisch von der übrigen Kette abgespalten. Die Isolierung der Präproproteine und die Bestimmung der N-terminalen Sequenzen erfordern Mikromethoden (radioaktive Markierung, spezielle Abbauprozesse), die auch noch auf nanomol-Mengen angewendet werden können. Auf diese Weise sind z. B. die Sequenzen der Präpeptide des Prä-Proparathormons^[78] und des Prä-Proinsulins^[79] bestimmt worden.

Innerhalb der Zisternen nehmen die Ketten, sobald sie sich von den Ribosomen gelöst haben, die native Konformation der Prohormone an. An den Enden der Zisternen lösen sich Vesikeln ab, die zu den sekretorischen Granula fusionieren. In diesen Granula werden die Prohormone durch eine zweite proteolytische Spaltung in die Hormone umgewandelt. Wenn man auch die Enzyme noch nicht isoliert hat, die diese Spaltung bewirken, so darf bei ihnen doch eine Trypsin-ähnliche Spezifität vermutet werden. Die Lebensdauer der Prohormone in den Granula beträgt etwa 1–2 h; innerhalb dieser Zeit haben sich z. B. 95% des Proinsulins unter Freisetzung eines Peptids (des Peptids C) in aktives Insulin umgewandelt. Erreichen die sekretorischen Granula den sekretorischen Pol der Zelle, so wird vermutlich ihr gesamter Inhalt durch Exocytose aus der Zelle entleert (Abb. 14).

Auch für die Neurosekretion kann man dieses Schema akzeptieren; die neurosekretorischen Neuronen funktionieren wie Drüsenzellen^[80]. Hier ist aber der axoplasmatische Weg für den Transport der Granula aus dem Zellkörper im Hypo-

thalamus zum Axonende in der Neurohypophyse besonders lang, so daß die Umwandlung der Proteine innerhalb der Granula („Reifung“) besonders wichtig sein könnte. Die Annahme scheint sinnvoll, daß die Nonapeptidhormone der Neurohypophyse in Form von viel längeren Ketten synthetisiert werden und daß eine Folge von Spaltungen, wie sie auch bei vielen anderen Peptidhormonen beobachtet wird, schließlich zur stabilen aktiven Verbindung führt, die man dann in relativ großen Mengen isolieren kann. Das gleichzeitige Auftreten von Hormonen und Neurophysinen im Perikaryon der neurosekretorischen Neuronen, angezeigt durch immunocytoologische Methoden; ihre räumliche Nachbarschaft innerhalb der Granula, durch Isolierung und chemische Charakterisierung bewiesen; der indirekte Nachweis eines makromolekularen Vasopressin-Vorläufers durch Einbau markierter Aminosäuren; das gleichzeitige Verschwinden von Vasopressin und einem Neurophysin als Folge einer Mutation bei der Ratte: Alle diese Beobachtungen sind ein sehr starkes Argument für die Existenz eines gemeinsamen Vorläufers, aus dem durch Spaltung ein Hormon und ein Neurophysin entstehen.

Der Autor ist Frau Professor Bertha Scharrer für ihre Hilfe bei der Abfassung dieses Manuskripts zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 13. Februar 1978 [A 294]
Übersetzt von Dr. Wolfram Bode, Martinsried

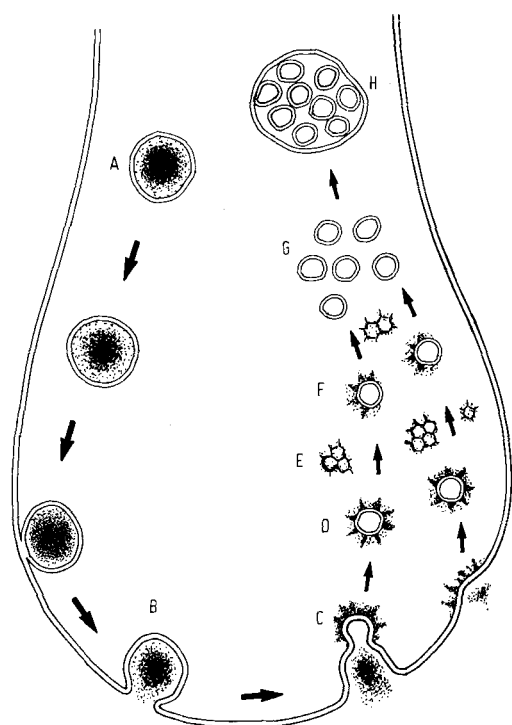


Abb. 14. Schema zur Beschreibung der Aufeinanderfolge von Exocytose und Vesikelbildung, wie es für die Neurohypophysenenden vorgeschlagen worden ist. Der Inhalt der neurosekretorischen Granula (A) wird bei der Exocytose (B) direkt in den extrazellulären Raum entleert. Die Granulamembran entsteht durch mikropinocytose-ähnliche Aktivität aus der terminalen Oberfläche (Vesikelbildung) und bildet belegte Einstülpungen (C), die sich als belegte Mikrovesikeln (D) abspalten, danach die Schichtfragmente (E) abwerfen und so teilweise belegte Mikrovesikeln (F) und schließlich glatte (synaptische) Mikrovesikeln (G) werden. Diese wiederum werden in Lysosomkörper (H) eingebettet (nach [80]).

- [1] E. Scharrer, Z. Vgl. Physiol. 7, 1 (1928).
- [2] H. Waring, Biol. Rev. 17, 120 (1942).
- [3] W. Bargmann, Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 34, 610 (1949).
- [4] G. Gomori, Am. J. Pathol. 17, 395 (1941).
- [5] W. Bargmann, E. Scharrer, Am. Sci. 39, 255 (1951).
- [6] J. J. Abel, J. Pharmacol. Exp. Ther. 40, 139 (1930).
- [7] M. Rosenfeld, Bull. Johns Hopkins Hosp. 66, 398 (1940).
- [8] H. B. Van Dyke, B. F. Chow, R. O. Greep, A. Rothen, J. Pharmacol. Exp. Ther. 74, 190 (1942).
- [9] O. Kamm, T. B. Aldrich, I. W. Grote, L. W. Rowe, E. P. Bugbee, J. Am. Chem. Soc. 50, 573 (1928).
- [10] V. du Vigneaud, Harvey Lect. 50, 1 (1954/1955).
- [11] R. Acher, C. Fromageot, Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol. 48, 287 (1955).
- [12] E. Scharrer, B. Scharrer, Recent Progr. Horm. Res. 10, 183 (1954).
- [13] W. Hild, G. Zetter, Z. Gesamte Exp. Med. 120, 236 (1953).
- [14] C. W. M. Adams, J. C. Sloper, J. Endocrinol. 13, 221 (1956).
- [15] R. Acher in W. Bargmann, B. Hanstrom, B. Scharrer, E. Scharrer: Proc. II. Int. Conf. Neurosecretion. Springer, Berlin 1958, S. 71 ff.
- [16] D. B. Hope, J. C. Pickup: Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology. Vol. IV, Part 1. Am. Physiol. Soc., Washington 1974, S. 173 ff.
- [17] E. Breslow, Adv. Enzyme Regul. 40, 271 (1974); B. T. Pickering, C. W. Jones in C. H. Li: Hormonal Proteins and Peptides. Vol. 5. Academic Press, New York 1978; E. Breslow, Annu. Rev. Biochem., im Druck; S. M. Seif, Annu. Rev. Physiol., im Druck.
- [18] R. Walter: Neurophysins: Carriers of Peptide Hormones. Ann. N. Y. Acad. Sci. 248 (1975).
- [19] R. Acher, G. Manoussos, G. Olivry, Biochim. Biophys. Acta 16, 155 (1955).
- [20] R. Acher, J. Chauvet, G. Olivry, Biochim. Biophys. Acta 22, 421 (1956).
- [21] G. W. Irving, Jr., V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 123, 485 (1938).
- [22] R. Acher, A. Light, V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 233, 116 (1958).
- [23] J. Chauvet, M. T. Lenci, R. Acher, Biochim. Biophys. Acta 38, 266 (1960).
- [24] R. Acher in [16], S. 119 ff.
- [25] R. Acher, J. Chauvet, M. T. Chauvet, D. Crepy, Biochim. Biophys. Acta 51, 419 (1961).
- [26] W. B. Watkins, J. Endocrinol. 59, 17 (1973).
- [26a] M. Chretien, C. Gilardeau, Acta Endocrinol. (Kopenhagen) 74, 226 (1973).
- [27] M. T. Chauvet, G. Coffe, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 53, 331 (1975).
- [27a] M. T. Chauvet, G. Coffe, J. Chauvet, R. Acher, C. R. Séances Soc. Biol. Paris 170, 257 (1976).
- [28] K. W. Cheng, H. G. Friesen, J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 165 (1972).
- [29] G. D. Burford, C. W. Jones, B. T. Pickering, Biochem. J. 124, 809 (1971).
- [30] H. Sachs, D. Pearson, A. Nuredin, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 36 (1975).
- [31] K. W. Cheng, H. G. Friesen, J. Biol. Chem. 246, 7656 (1971).

- [32] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, unveröffentlicht.
- [33] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 52, 212 (1975).
- [34] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 58, 234 (1975).
- [34a] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, Eur. J. Biochem. 69, 475 (1976).
- [34b] T. C. Wu, S. E. Crumm, Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 634 (1976).
- [35] R. Walter, D. H. Schlesinger, I. L. Schwartz, J. D. Capra, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 293 (1971).
- [36] D. H. Schlesinger, M. Ernst, A. Nicholas, W. B. Watkins, R. Walter, FEBS Lett. 57, 57 (1975).
- [37] T. C. Wu, S. Crumm, M. Saffran, J. Biol. Chem. 246, 6043 (1971).
- [37a] T. C. Wu, S. E. Crumm, J. Biol. Chem. 251, 2735 (1976).
- [37b] M. T. Chauvet, P. Codogno, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 71, 291 (1976).
- [37c] M. T. Chauvet, P. Codogno, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 80, 374 (1977).
- [37d] M. T. Chauvet, P. Codogno, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. (1978).
- [38] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 62, 89 (1976).
- [39] D. H. Schlesinger, B. Frangione, R. Walter, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3350 (1972).
- [40] T. C. Wu, S. Crumm, 9th Int. Congr. Biochem. Stockholm 1973, Abstract Db 9.
- [40a] M. T. Chauvet, P. Codogno, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 98, 37 (1979).
- [40b] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, A. G. Robinson, FEBS Lett. 101, 391 (1979).
- [41] J. D. Capra, J. M. Kehoe, D. Kotelchuck, R. Walter, E. Breslow, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 431 (1972).
- [41a] D. H. Schlesinger, T. K. Audhya, R. Walter, J. Biol. Chem. 253, 5019 (1978).
- [42] W. G. North, R. Walter, D. H. Schlesinger, E. Breslow, J. D. Capra, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 408 (1975).
- [42a] D. H. Schlesinger, G. T. Pickering, W. B. Watkins, J. C. Peek, L. G. Moore, T. K. Audhya, R. Walter, FEBS Lett. 80, 371 (1977).
- [42b] R. Walter, T. K. Audhya, D. H. Schlesinger, S. Shin, S. Saito, H. Sachs, Endocrinology 100, 162 (1977).
- [43] E. Breslow, J. Weis, Biochemistry 11, 3474 (1972).
- [44] C. J. Menendez-Botet, E. Breslow, Biochemistry 14, 3825 (1975).
- [44a] M. T. Chauvet, J. Chauvet, R. Acher, FEBS Lett. 71, 96 (1976).
- [45] E. Breslow, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 423 (1975).
- [46] E. Breslow, R. Walter, Mol. Pharmacol. 8, 75 (1972).
- [47] V. Pliska, H. Sachs, Eur. J. Biochem. 41, 229 (1974).
- [48] D. B. Hope, M. Wälti, D. J. Winzor, Biochem. J. 147, 377 (1975).
- [49] J. Chauvet, R. Acher, J. Biol. Chem. 242, 4274 (1967).
- [50] J. Chauvet, R. Acher, Eur. J. Biochem. 54, 31 (1975).
- [51] D. B. Hope, V. V. S. Murti, V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 237, 1563 (1962).
- [52] J. E. Stouffer, D. B. Hope, V. du Vigneaud in C. F. Cori, G. Foglia, L. F. Le-loir, S. Ochoa: Perspectives in Biology. Elsevier, Amsterdam 1963, S. 75 ff.
- [53] E. Breslow, L. Abrash, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 640 (1966).
- [54] E. Breslow, H. L. Aanning, M. Schmir, J. Biol. Chem. 246, 5179 (1971).
- [55] E. Breslow, J. Weis, C. J. Menendez-Botet, Biochemistry 12, 4644 (1973).
- [56] R. Walter, P. L. Hoffman, Fed. Proc. 32, 567 (1973).
- [57] A. Furth, D. B. Hope, Biochem. J. 116, 545 (1970).
- [58] P. Balaram, A. A. Bothner-By, E. Breslow, Biochemistry 12, 4695 (1973).
- [59] P. Balaram, A. A. Bothner-By, E. Breslow, J. Am. Chem. Soc. 94, 4017 (1972).
- [60] P. Cohen, M. Camier, J. Wolff, R. Alazard, J. S. Cohen, J. H. Griffin, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 463 (1975).
- [61] E. Breslow, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 493 (1970).
- [61a] E. Breslow, P. Gargiulo, Biochemistry 16, 3397 (1977).
- [62] H. Sachs, Y. Takabatake, Endocrinology 75, 943 (1964).
- [62a] A. F. Pearlmutter, C. McMains, Biochemistry 16, 628 (1977).
- [63] C. P. Fawcett, A. E. Powell, H. Sachs, Endocrinology 83, 1299 (1968).
- [63a] H. Gainer, Y. Sarne, M. J. Brownstein, Science 195, 1354 (1977).
- [63b] M. J. Brownstein, A. G. Robinson, H. Gainer, Nature 269, 259 (1977).
- [64] A. Norström, J. Sjöstrand, J. Neurochem. 18, 29 (1971).
- [64a] H. W. Sokol, E. A. Zimmerman, W. H. Sawyer, A. G. Robinson, Endocrinology 98, 1176 (1976).
- [65] C. R. Dean, D. B. Hope, Biochem. J. 106, 565 (1968).
- [66] C. R. Dean, D. B. Hope, T. Kazic, Br. J. Pharmacol. Chemother. 34, 192 (1968).
- [67] J. C. Pickup, C. I. Johnston, S. Nakamura, L. O. Utenthal, D. B. Hope, Biochem. J. 132, 361 (1973).
- [68] H. G. Friesen, E. B. Astwood, Endocrinology 80, 278 (1967).
- [69] W. W. Douglas in [16], S. 191 ff.
- [70] E. A. Zimmerman, K. C. Hsu, A. G. Robinson, P. W. Carmel, A. G. Franz, M. Tannenbaum, Endocrinology 92, 931 (1973).
- [71] G. D. Burford, R. E. J. Dyball, R. L. Moss, B. T. Pickering, J. Anat. 2, 261 (1974).
- [72] H. Valtin, J. Stewart, H. W. Sokol in [16], S. 131 ff.
- [73] J. J. Jones, J. Lee, J. Endocrinol. 37, 335 (1967).
- [74] H. Valtin, Am. J. Med. 42, 814 (1967).
- [75] B. T. Pickering, C. W. Jones, G. D. Burford, M. McPherson, R. W. Swann, P. F. Heap, J. F. Morris, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 15 (1975).
- [76] D. A. Sunde, H. W. Sokol, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 345 (1975).
- [77] H. S. Tager, D. F. Steiner, Annu. Rev. Biochem. 43, 509 (1974).
- [78] B. Kemper, J. F. Habener, M. D. Ernst, J. T. Potts, Jr., A. Rich, Biochemistry 15, 15 (1976).
- [79] S. J. Chan, P. Keim, D. F. Steiner, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 1964 (1976).
- [80] W. W. Douglas in [16], S. 191 ff.
- [81] B. G. Livett, Ann. N. Y. Acad. Sci. 148, 112 (1975).
- [82] E. A. Zimmerman, R. Defendini, H. W. Sokol, A. G. Robinson, Ann. N. Y. Acad. Sci. 248, 92 (1975).