

Programmierte Molekeln*

Von R. SCHWYZER

Institut für Molekularbiologie und Biophysik der Eidg. Technischen Hochschule, CH-8006 Zürich (Schweiz)

1) Informationstragende Biopolymere und Molekularbiologie

Alles Leben auf diesem Planeten ist an das Vorhandensein von *Eiweiss* oder, mit einem andern Worte, *Protein* gebunden. Sämtlichen Lebensäusserungen liegen Proteinmolekeln zugrunde (Figur 1). Eine ausserordentlich wichtige Aufgabe der Molekularbiologie ist die Erforschung der *Zusammenhänge zwischen der Struktur der Eiweissmolekeln und ihrer biologischen Funktion*. Die Ergebnisse dieser Suche bereichern nicht nur laufend unser Wissen um die Grundlagen des normalen Lebens, sondern liefern auch neues, wesentliches Verständnis für pathologische Vorgänge.

Ein anderes Forschungsgebiet, welches wegen seiner glanzvollen Erfolge die Aufmerksamkeit der Welt erst recht auf die Molekularbiologie gelenkt hat, gilt heute bereits fast als «klassisch». Es ist das Gebiet der *molekularen Genetik* (Figur 1). Heutige Lebensformen vermögen die zu ihrem Funktionieren notwendigen Proteine nicht direkt zu kopieren und so zum Beispiel bei der Zellteilung von den Eltern auf die Nachkommenschaft zu übertragen oder aber die Proteinmasse auf diese Weise zu vermehren. Für diese Zwecke ist, wahrscheinlich schon in der frühesten Geschichte des Lebens, ein Umweg eingeschlagen worden, der ungeheure Vorteile in sich birgt: Vorteile evolutionärer, entwicklungsphysiologischer und regulatorischer Art, auf die wir hier allerdings nicht eingehen wollen. Dieser Umweg besteht in der Bereitstellung von Plänen im genetischen Apparat, nach denen die Proteine gebaut werden. Diese Pläne sind in Form von Nukleinsäuremolekeln niedergelegt. Um sie aber für die Zellnachkommenschaft zu vervielfältigen und um nach ihren Vorschriften neue Proteinmolekeln bauen zu können, sind wiederum Proteine notwendig.

Dadurch wird die zentrale Rolle der Struktur-Funktions-Beziehung bei Eiweissmolekeln für *sämtliche* Lebensprozesse ganz deutlich. Wir haben deshalb die Erforschung solcher Zusammenhänge zum Hauptthema der Forschungsarbeiten an unserem Laboratorium erkoren¹.

Wenn ich heute abend zu Ihnen spreche, so versuche ich *Information* zu vermitteln. Ich tue das, indem ich die verschiedenen Laute der deutschen Sprache in wechselnder Zahl und Reihenfolge zu Wörtern und Sätzen aneinanderreihe. In der geschriebenen Sprache würde ich dazu die 29 Buchstaben verwenden. Die *sequentielle Anordnung von Symbolen* zur Formulierung und Übertragung von Information ist aber nicht eine Eigentümlichkeit menschlicher Sprachen. Sie ist seit Anbeginn des Lebens dasjenige Prinzip, welches bei Proteinen und Nukleinsäuren die biologische Funktion einer jeden Molekel im Detail festlegt. Proteine und Nukleinsäuren sind nämlich lange, fadenförmige Makromoleküle, Hochpolymere, die aus einer begrenzten Zahl von immer wiederkehrenden, wie Perlen zu Ketten oder Buchstaben zu Sätzen gefügten Monomeren aufgebaut sind. Diese Monomeren (oder Buchstaben) heissen bei den Proteinen Aminosäuren (20 an der Zahl) und bei den Nukleinsäuren Nukleotide (im Prinzip 4 an der Zahl). Proteine gehören somit zur

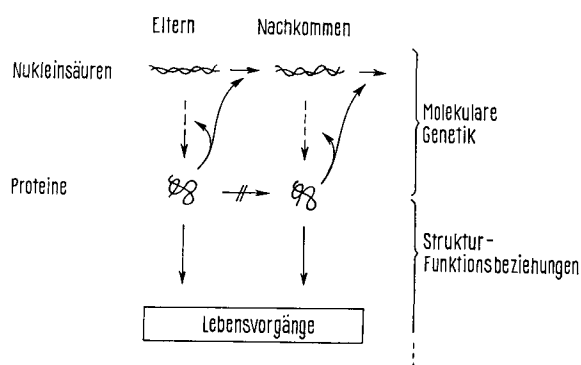


Fig. 1. Informationstragende Biopolymere und molekularbiologische Thematik.

* 11. Paul-Karrer-Vorlesung in der Aula der Universität Zürich am 12. November 1969.

¹ Das entsprechende Institut der Universität Zürich, welches in Zukunft im selben Gebäude wie das unsrige untergebracht sein wird, befasst sich mehr mit Problemen der molekularen Genetik.

chemischen Klasse der Polypeptide, Nukleinsäuren zu derjenigen der Polynukleotide. Die Sprachanalogie geht aber noch weiter, indem man ebenfalls Wörter und Sätze unterscheiden kann. Währenddem das Lexikon der einfachen, Vier-Buchstaben-Sprache der Nukleinsäuren nur 64 Wörter zu je 3 Buchstaben kennt, ist die Proteinsprache mit ihren 20 Buchstaben und mit Wörtern und Sätzen verschiedenster Länge ausserordentlich abwechslungsreich und dadurch unserer geschriebenen Sprache viel ähnlicher.

Jede Proteinmolekel ist für bestimmte biologische Funktionen vorgesehen. Die Information für ihr Verhalten ist in der Aminosäurenreihenfolge, in Wörtern und Sätzen, verschlüsselt. Die Information für die Aminosäurenreihenfolge ist wiederum in der Reihenfolge der Drei-Buchstaben-Wörter der Nukleinsäuren enthalten. Man nennt deshalb Polypeptide und Polynukleotide auch *informationstragende Biopolymere*.

2) Proteine als programmierte Molekeln

Indem die Information für das biologische Verhalten einer Proteinmolekel von der Nukleinsäure des betreffenden, sogenannten Strukturgen stammt, kann man ohne weiteres sagen, diese Proteinmolekel sei für ihre Aufgabe *programmiert*.

Wir wollen kurz zwei Fragen untersuchen: Wie wird die lineare Information in Funktion umgesetzt, das heisst abgelesen, und welches sind die Hauptfunktionen, die einprogrammiert werden müssen, um ein sinnvolles Verhalten zu gewährleisten?

Zahl und Sequenz der Monomereinheiten (Aminosäuren) bestimmen nicht nur den eindimensionalen Aufbau (Primärstruktur) der Polypeptidkette, sondern auch ihre ganz spezifische, räumliche Faltung. Dadurch entstehen kugelige oder mehr länggestreckte Knäuel, in deren Innern, wie in Mikrokristallen, jedes der vielen tausend Atome seinen bestimmten Platz hat. Die Molekeln besitzen deshalb auch Oberflächen mit sehr spezifischer Topographie und Topochemie. Es sind nun hauptsächlich die *topochemischen Eigenschaften*, welche die Funktionsweise der verschiedenen Proteinmolekeln bestimmen: Biokatalyse (enzymatische Funktion), Krankheitsabwehr (Funktion als Antikörper), Muskelarbeit (Kontraktibilität) und viele andere mehr. Als Grundlage für alle Funktionen mag das sehr spezifische *Erkennungsvermögen* der Proteinoberflächen für andere Molekeln gelten. Es ist bedingt durch topochemische Oberflächenelemente, welche zu Teilen dieser andern Molekeln komplementär sind². Figur 2 zeigt die Oberfläche eines Modells des sauerstoffbindenden Proteins Myoglobin (nach KENDREW), um einen Begriff der komplexen Topochemie solcher Molekeln zu geben.

Die Ablesung der Information verläuft also nach dem Schema: Aminosäuresequenz → Knäuelung → Topochemie und Topographie → Funktion, wobei der Pfeil als das Zeitwort «bestimmt» zu lesen ist.

Die lebende Zelle könnte man demnach vergleichen mit einer automatisierten Fabrik, in welcher die einzelnen (Protein-)Maschinen zur Ausführung bestimmter Arbeiten programmiert wären. Wahrlich eine trost- und geistlose Fabrik! Sie würde laufen, ohne Rücksicht auf Lagerhaltung und Markt, und könnte sich bei Rohstoffmangel nicht umstellen. Um eine sinnvolle, in wechselnder Umgebung lebensfähige Einheit zu geben, müssten die Maschinen nicht nur funktionsfähig, sondern auch regulierbar sein. In der Tat enthalten Proteine nicht nur *Funktionsprogramme*, sondern auch *Regulationsprogramme*.

3) Kybernetik programmierter Molekeln

Innerhalb einzelner Zellen, zwischen den Zellen eines Organismus und sogar zwischen Individuen von Populationen entdeckt man eigentliche *Regelkreise* mit Sollwerten, Regelsignalen und Rückkoppelung, wie sie in der kybernetischen Technik in ähnlicher Form verwendet werden.

Intrazellulär sind jene Regelkreise am besten bekannt, welche zur Steuerung der Enzymaktivität dienen. Wir können hier eine langfristig wirkende *Grobregulierung* und eine sehr schnell wirkende *Feinregulierung* unterscheiden. Je nachdem, ob bestimmte Ausgangsstoffe für den Zellmetabolismus vorhanden

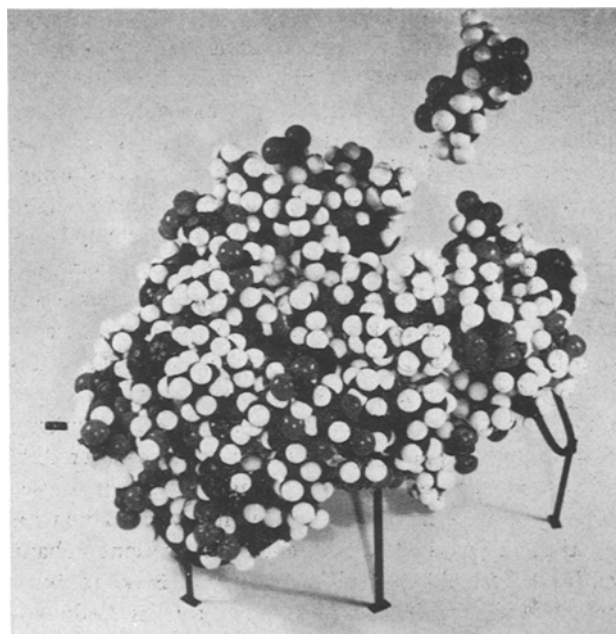


Fig. 2. Raumfüllendes Modell des Myoglobins (Bild von Dr. H. C. WATSON, Cambridge, in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt). In die Oberflächenkluft rechts oben passt (wie ein Schlüssel ins Schloss) das hier abgehobene Protohäm-Molekül.

² Insbesondere beruhen die Aggregation von Proteinmolekeln zu bestimmten «Superstrukturen», wie einzelne Enzyme, Enzymkomplexe und andere, sowie das gegenseitige Erkennungsvermögen von Zellen desselben Gewebes offenbar auf diesem Prinzip.

sind oder fehlen, wird die Herstellung von Enzymen, welche die betreffenden Edukte zu erwünschten Produkten umsetzen können, in die Wege geleitet (induziert) oder unterbunden (reprimiert). Solche Regelkreise betreffen die de novo-Synthese von Enzymprotein und regulieren die Umsetzung genetischer Nukleinsäure-Information zu Protein-Information. Nicht alle Enzyme aber sind induzierbar oder reprimierbar, und oft ist eine schnellwirkende Feinregulierung erwünscht. Auch hier können wir wiederum zwei Fälle unterscheiden: die «homosterische» Hemmung der Enzymaktivität durch das Produkt der betreffenden Enzymreaktion und die «allosterische» Inhibition der Wirkung des ersten Enzyms einer metabolischen Synthesekette durch das Endprodukt derselben Kette (Figur 3). Währenddem es sich beim «homosterischen» Vorgang um eine einfache Massenwirkung handelt, bei welcher derjenige Oberflächenlocus des Enzyms, welcher für die betreffende Umsetzung verantwortlich ist, mehr und mehr vom Produkt statt vom Edukt (Substrat) besetzt wird, bietet die «allosterische» Regulation wesentlich neue Aspekte. Man muss annehmen, dass das Endprodukt der Synthesekette, welches chemisch vom Edukt und vom Produkt der ersten Enzymreaktion der Kette sehr verschieden (allosterisch) sein kann, nicht am enzymatisch wirksamen Oberflächenelement («active site») des ersten Enzyms eingreift, sondern in einem andern Bereich mit anderer Topographie («regulatory site»). Dadurch müsste im «regulatorischen Bereich» (Oberflächenelement) ein Signal ausgelöst werden, welches entweder über die Oberfläche oder durch das Innere des Enzyms hindurch eine Veränderung des «aktiven Bereiches» (im Sinne einer Inaktivierung) hervorrufen würde. Beim *allosterisch regulierbaren Enzym* müssten also prinzipiell drei Funktionen einprogrammiert sein: a) die Funktion eines diskriminierenden *Selektors*, welcher das von Aussen kommende Signal erkennen kann, b) die Funktion einer Vorrichtung zur Erzeugung und Weiterleitung eines zweiten, intramolekularen Signals (Transmitter) und c) die Funktion eines *Verstärkers*, welcher dieses zweite Signal in die entsprechende Modifikation des katalytischen Bereiches umsetzt (Figur 4). Die Anzeichen dafür mehrten sich, dass das intramolekulare Signal ein stereochemisches ist (Änderung der Konformation); auch in dieser Hinsicht scheint der Ausdruck «allosterische» Regulation glücklich gewählt worden zu sein.

Der *interzellulären Regulation* dienen *Hormone*. Wie bei der Radiokommunikation können wir zwei prinzipiell verschiedene Ausführungsformen unterscheiden: Rundfunk- und Richtstrahlverkehr. Beim *Rundfunkverkehr* senden die Stationen ihre Informationen auf verschiedenen Wellenlängen; Empfängerstationen empfangen nur diejenigen Wellenlängen, auf die sie abgestimmt sind. Hormonproduzierende Zellen und Gewebe strahlen ihre Information in Form verschiedener Hormonmolekeln zum Beispiel über die Blut-

bahn im ganzen Organismus aus; nur diejenigen Zellen aber, die auf ein bestimmtes Hormon abgestimmt sind, empfangen die Meldung. So ist die Situation bei der endokrinen Regelung; bei gewissen exokrinen Regelprozessen dient das umgebende Medium (Wasser oder Luft) als Träger der Hormone, die so zu andern Individuen der Population gelangen. Beim *Richtstrahlverkehr* wird zum Beispiel mit nur einer Wellenlänge gesendet, auf welche auch sämtliche Empfänger abgestimmt sind. Die Auswahl der Empfänger erfolgt geometrisch, indem nur derjenige angestrahlt wird, der auch erreicht werden soll. Diesem Modell entspricht die nervöse Regulation. Es wird nur ein Hormon ausgeschieden (zum Beispiel Acetylcholin), auf welches viele Zellen im ganzen Organismus ansprechen könnten. Aber die Ausscheidung erfolgt – elektrisch gesteuert – ganz lokalisiert und in unmittelbarer Nähe derjenigen Empfängerzellen, die erreicht werden sollen. Zur Sicherheit wird das Signal (das Hormon) unmittelbar nach dem Empfang zerstört. Auf diese hübschen Analogien hat OSCAR HECHTER³ hingewiesen.

Zur Illustration eines *hormonalen Regelkreises* möge derjenige des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) der Gehirnanhangsdrüse (Hypophyse, «pituitary gland») dienen (Figur 5). In der Folge gewisser Stimuli, welche verschiedene Funktionszustände des

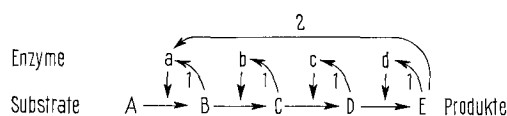


Fig. 3. Homosterische (1) und allosterische (2) Enzymregulation.

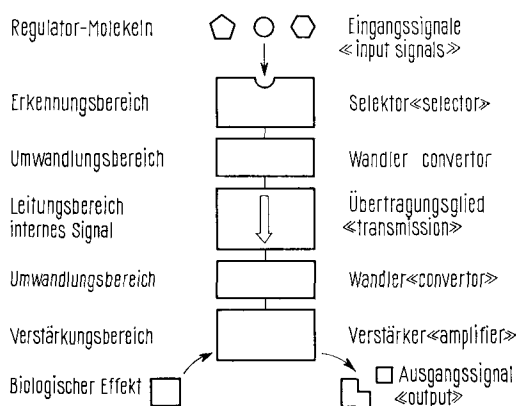


Fig. 4. Beziehung zwischen regulierendem und funktionellem Oberflächenbereich eines regulierbaren Proteins und Analogie zu regeltechnischen Bauelementen.

³ O. HECHTER, K. YOSHINAGA, I. D. K. HALKERSTON, C. COHN und P. DODD, in *Molecular Basis of Some Aspects of Mental Activity* (Academic Press, London and New York 1966), vol. 1, p. 291.

Körpers (via Hypothalamus) an die Hypophyse melden (sogenannte Stress-Zustände, insbesondere ein zu kleiner Blutspiegel der Nebennierenrindenhormone Cortisol, Cortison und Corticosteron), scheidet dieses Organ ACTH in die Blutbahn aus. Dessen Information kann von allen darauf abgestimmten Zellen empfangen werden. Im Hauptregelkreis sind dies Zellen der Nebennierenrinde. Sie werden zur Ausschüttung und zur de novo-Synthese der oben erwähnten Steroidhormone sowie zum Wachstum (welches mit Proteinsynthese in den Zellen verbunden ist) angeregt. (Wegen der Wachstumsanregung erhielt ACTH auch den Namen adrenocorticotrophes Hormon, währenddem die Bezeichnung adrenocorticotrop sich auf die Induktion der Funktionszustandsänderung in der Nebennierenrinde bezieht.) Erreicht nun der Blutspiegel der Nebennierenrindenhormone den Sollwert, wird durch einen Rückkoppelungsmechanismus die Ausschüttung des ACTH durch die Hypophyse verringert. Auf diese Weise stellt sich ein den jeweiligen Bedürfnissen des Organismus entsprechendes Gleichgewicht ein, in welchem alle wichtigen «peripheren» Aufgaben der Nebennierenrindenhormone befriedigend erfüllt werden können. Eine andere bekannte Wirkung des ACTH betrifft den Fettabbau in den Fettzellen. Diese Aufgabe wird offenbar nicht selbständig, sondern durch den Hauptregelkreis Hypophyse-Nebennierenrinde gesteuert. Eine weitere Eigenschaft des ACTH, nämlich die Pigmentausbreitung in den Melanophorenzellen der Amphibien, gehört vielleicht gar nicht zu den physiologischen, sondern beruht nur auf dem Vorhandensein eines kurzen «Aminosäuren-Wortes», welches auch im melanophoren-stimulierenden Hormon (α - und β -MSH) zu finden ist.

Der klinisch und biochemisch beobachtbare Erfolg des ACTH in den Empfängerzellen (und das gilt wohl für alle Hormone) setzt sich also zusammen aus einer Vielzahl von Reaktionsabläufen. Einzelne davon, zum Beispiel die Biosynthese von Steroidhormonen⁴ sind relativ gut bekannt. Wir wissen aber so gut wie nichts über die Art und Weise der Auslösung solcher Reaktionsfolgen durch ein Hormon. Die Situation erinnert mich immer wieder an die letzten zwei Bilder eines (sehr zerlesenen) Kinderbuches: «Joggeli soll ga Birli schüttle» von LISA WENGER⁵. In einer Phase des Geschehens (Figur 6) ruht der ganze «Reaktionsweg» vom Metzger, der das Kälblein stechen sollte, über den Hund, der den Joggeli aktivieren muss, bis zu den Birnen, die nicht fallen wollen. Ein Peitschenknall des Meisters bringt das Ganze in Bewegung und sofort stellt sich der Erfolg ein.

Die uns interessierende Frage lautet: «Was passiert zwischen Peitschenzweck und Rücken des Metzgers?» Mit andern Worten: «Welches ist der chemische Mechanismus der Reaktion zwischen dem Hormon und derjenigen Molekel, der Rezeptormolekel, auf welche das Hormon direkt einwirkt, um die erste in einer

Reihe von Reaktionen auszulösen, welche zum physiologischen Erfolg führen?»⁶.

Um diese Frage zu beantworten, müsste man eine genaue Kenntnis haben der Chemie: a) des Hormons, b) der Rezeptormolekel, c) des Hormon-Rezeptor-Komplexes und d) des chemischen Signals (und seiner Verstärkung), welches bei der Bildung des Komplexes generiert wird. Wir wissen einiges über die Chemie der Hormone, wir beginnen etwas zu wissen über die allgemeine Natur der Rezeptormolekeln (welche wahrscheinlich Proteine sind) und ihrer ungefähren Lokalisierung in der Zelle, aber wir wissen nichts über Einzelheiten ihrer Chemie oder über die Art der Hormonbindung und Signalerzeugung. Allerdings kann man spekulieren und allgemeine Parallelen zur «allosterischen Regulation» von Enzymen (siehe oben) ziehen⁷. Danach könnte ein Hormon durch Adsorption (Bindung) an ein regulatorisches Oberflächenelement eines Enzyms die Aktivität des katalytischen Bereiches erhöhen (die beiden Bereiche wären durch das oben erwähnte allosterische Signal miteinander verbunden). Das erzeugte Signal für den Stoffwechsel wäre das Stoffwechselprodukt des Enzyms. Wenn regulatorisches und katalytisches Oberflächenelement sich auf zwei verschiedenen Seiten einer Membran befänden, könnte mit diesem Mechanismus ein Signal (ohne Stofftransport!) durch eine Membran hindurch ins Zellinnere gelangen. Diese Situation dürfte für eine ganze Reihe von Hormonen gelten, wobei jedes Hormon von einem andern «Selektor» auf der Membranaussenseite erkannt wird. Dieses Erkennen führt zur Aktivierung (des katalytischen Oberflächenelements) des Enzyms «Cyclase», welches daraufhin auf der Innenseite der Membran beginnt, Adenosintriphosphat

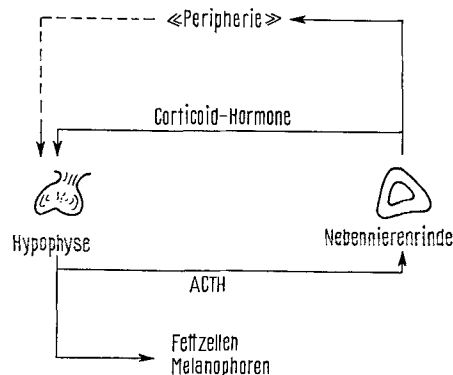


Fig. 5. Hormonaler Regelkreis zwischen Hypophyse und Nebennierenrinde.

⁴ A. WETTSTEIN, *Experientia* 17, 329 (1961). – E. R. SIMPSON, D. Y. COOPER und R. W. ESTABROOK, *Recent Prog. Horm. Res.* 25, 523 (1969).

⁵ Erschienen im Verlag Francke AG, Bern.

⁶ R. SCHWYZER, *Proceedings of the 1st International Pharmacological Meeting* (Pergamon Press, Oxford 1963), vol. 7, p. 203.

⁷ J. MONOD, *Endocrinology* 78, 412 (1966).

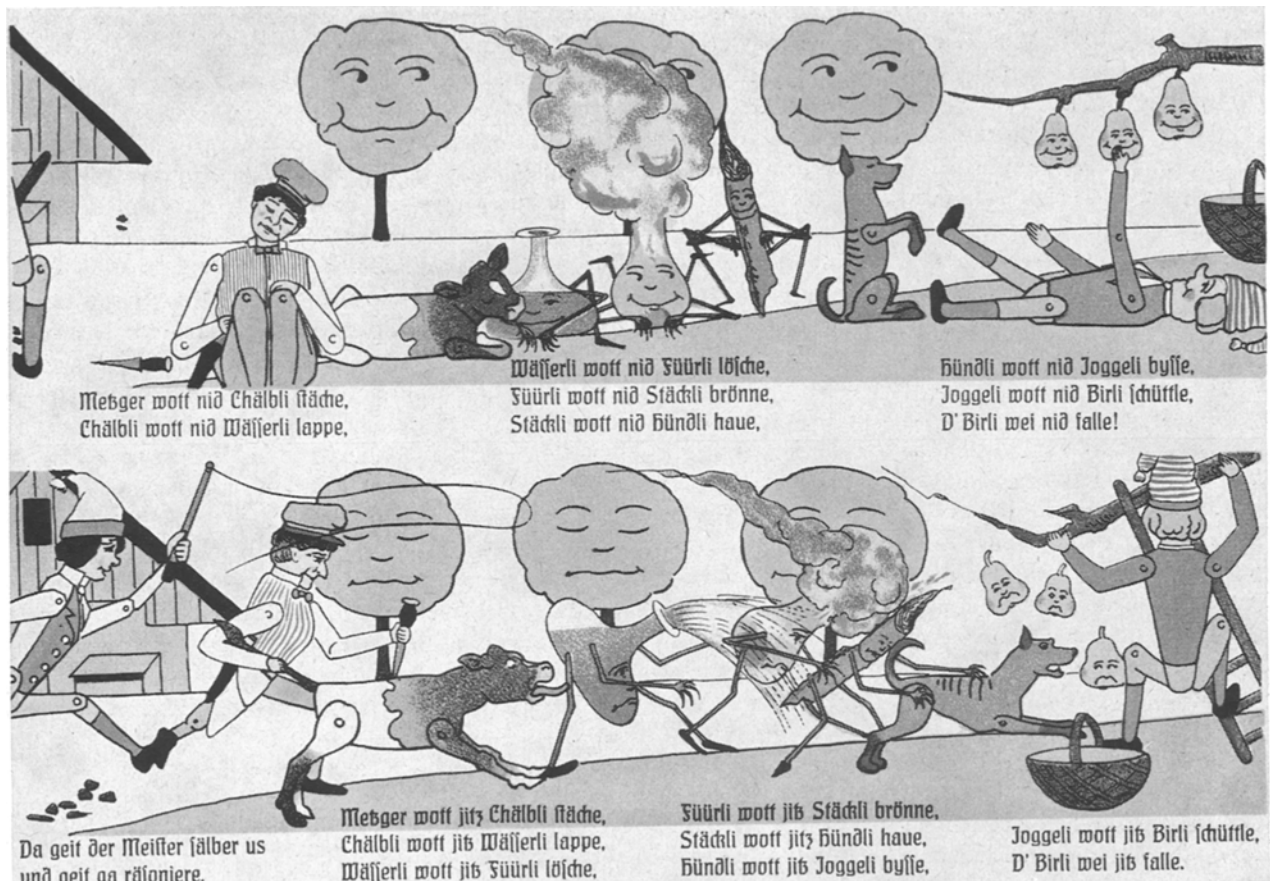


Fig. 6. Hormonanalogie aus «Joggeli sött ga Birli schüttle».

(ATP) in Cyclo-3',5'-adenosinmonophosphat (CAMP) umzuwandeln. Dieses dient als (verstärktes) Signal zur Auslösung der weiteren physiologischen Schritte (vergleiche ⁸).

4) Chemie der Polypeptidhormone und Arbeitshypothesen betreffend Hormon-Derivate, welche zum Studium potentieller Rezeptoren dienen könnten

Intensive chemische Untersuchungen an Polypeptidhormonen, an denen auch mein Arbeitskreis beteiligt war⁹, haben uns ziemlich Einblick in die *eindimensionale Organisation der biologischen Information* erlaubt. Die Gruppierung von Aminosäure-Buchstaben in zusammenhängende («continue») und unzusammenhängende Wörter («discontinue words») und die möglichen Konsequenzen dieser Organisation auf die konformationelle Stabilität und die Topographie der Kontaktfläche zwischen Hormon und Rezeptor («interface topography») wurden bereits eingehend behandelt¹⁰. Andererseits müssen wir annehmen, dass jede Rezeptormolekel im ersten Schritt das Hormon erkennen und binden muss, bevor in der zweiten Stufe das Signal ausgelöst wird. Jede Molekel, die ein Hormon *spezifisch* binden kann, ist deshalb eine *potentielle* Rezeptormolekel.

Vielleicht können wir uns diese Einsichten zunutze machen, um Hormonderivate zu synthetisieren, welche dazu dienen können, um a) potentielle Rezeptoren zu lokalisieren und identifizieren, b) die Dynamik der Komplexbildung zu studieren und c) – vielleicht sogar – kristalline Komplexe herzustellen, welche für eine Röntgen-Strukturanalyse geeignet sein könnten.

Diese Ideen möchte ich mit einem Beispiel aus dem Gebiete des adrenocorticotropen Hormons (welches wir vor einiger Zeit als erste synthetisch herstellen konnten¹¹) illustrieren, um zu zeigen, auf welchen Wegen wir das Hormon-Rezeptor-Problem zur Zeit bearbeiten.

⁸ L. BIRNBAUMER und M. ROBBELL, J. biol. Chem. 244, 3477 (1969). – E. W. SUTHERLAND, G. A. ROBISON und R. W. BUTCHER, Circulation 37, 279 (1968).

⁹ E. SCHRÖDER und K. LÜBKE, *The Peptides: Synthesis, Occurrence, and Action of Biologically Active Polypeptides* (Academic Press, New York 1966), vol. 2.

¹⁰ R. SCHWYZER, Excerpta Medica Intern. Congress Series No. 161: *Protein and Polypeptide Hormones* (1968), p. 201; J. mond. Pharm. 3, 254 (1968); Proceedings of the 4th International Pharmacological Meeting (Schwabe, Basel 1969), im Druck.

¹¹ R. SCHWYZER und P. SIEBER, Nature 199, 172 (1963); Helv. chim. acta 49, 134 (1966).

4.1) *Substitutionsmöglichkeiten im ACTH*. Die ACTH-Molekel (Figur 7) ist in eine Reihe scheinbar zusammenhängender Wörter mit verschiedener biologischer Bedeutung unterteilt^{10,12}. Die ersten 18 Buchstaben (Aminosäuren) enthalten praktisch alle Information für die Nebennierenrinde, für Fettzellen und für Melanophorenzellen. Die steroidogene Wirkung auf die Nebenniere wird durch die Hexapeptidsequenz 19–24 (die im synthetischen Hormon Synacthen CIBA® enthalten ist) noch etwas verstärkt; der Rest der Molekel, 25–39, enthält Information für die Spezifität, für Antigenizität und für gewisse Transporteigenschaften. Auf Melanophoren- und Fettzellen übt die Verlängerung durch die Sequenz 19–24 kaum eine Wirkung aus. Deshalb dürfte eine Markierungsgruppe, die an der ϵ -Aminogruppe des Lysins 21 angebracht wäre, die biologische Wirkung (und damit die Spezifität der Bindung an den Rezeptor und den Rezeptormechanismus) weniger beeinträchtigen, als eine solche Gruppe an irgendeinem anderen Lysinrest (11, 15 oder 16). Diese Annahme dürfte auch für Änderungen an andern Aminosäureresten in den Sequenzen 19–24 oder 25–39 im Vergleich zu Änderungen in der essentiellen Sequenz 1–18 gelten. Allerdings könnten auch hier «fast isostere» Veränderungen (Phenylalanin zu Hexahydrophenylalanin, Methionin zu Aminobutyl¹³ etc.) biologisch normal reagierende Hormonanalogue liefern. Ob alle diese Derivate im Einzelfall für das Studium des

Rezeptors geeignet sind, kann natürlich erst nach sorgfältiger Prüfung ihrer Eigenschaften als Agonist oder Antagonist mit klassischen pharmakologischen Methoden entschieden werden.

Derivate, die im oben erwähnten Sinne brauchbar wären, müssten solche chemische Gruppierungen enthalten, die a) covalente Bindungen mit dem Rezeptor eingehen, b) die Adsorption (Bindung) an den Rezeptor in einer physikalisch-chemisch sinnvollen Weise signalisieren könnten, und c) zur Lösung des Phasenproblems in der Röntgen-Strukturanalyse beitragen könnten.

Zur Zeit sind wir damit beschäftigt, solche geeigneten Derivate aufzufinden, ihre pharmakologischen Eigenschaften zu studieren und sie auf Zellen, Zellpartikel und -membrane und auf isolierte Proteine einwirken zu lassen.

4.2) *N^ε-Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetraokosipeptid*. Eine Markierungsgruppe, die für Bindungsstudien und für röntgenanalytische Zwecke geeignet sein könnte, ist die 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonyl-Gruppe (Dansylgruppe). Ihre Fluoreszenz könnte für Bindungs-

¹² R. SCHWYZER, *Ergebn. Physiol.* 53, 1 (1963).

¹³ K. HOFMANN, R. D. WELLS, M. YAJIMA und J. ROSENTHALER, *J. Am. chem. Soc.* 85, 1546 (1963).

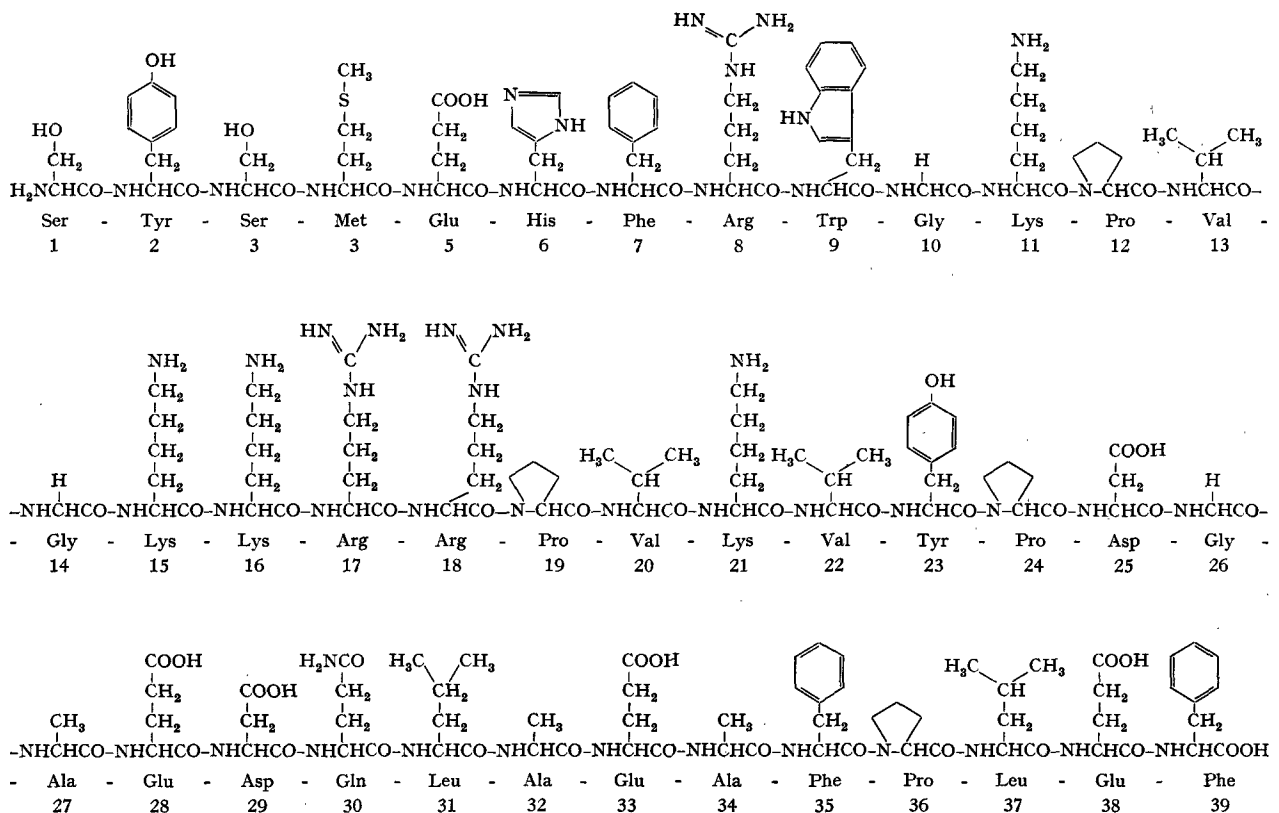


Fig. 7. Primärstruktur des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus Schweine-Hypophysen.

studien mit der Methode der Fluoreszenzpolarisation¹⁴, ihr Naphthalin-Ringsystem plus die Sulfonylgruppe bei der Herstellung und Interpretation von Elektronendichte-Karten nützlich sein.

N⁶-Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid (Figur 8) wurde synthetisch, mit kleinen Modifikationen analog der Herstellung von ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid¹⁵ aufgebaut und durch Gegenstromverteilung gereinigt¹⁶. Während der Verteilung in Gegenwart von Luft und Licht entsteht laufend ein Nebenprodukt mit (wahrscheinlich) oxydierter Dansylgruppe. Die Fluoreszenzeigenschaften werden dadurch geringfügig geändert (Maximum der Emission verschoben). Für die hier beschriebenen Versuche wurde ein Material verwendet, welches dieses Oxydationsprodukt noch enthält.

Das ACTH-Derivat erzeugt in isolierten Fettzellen der Rattenepididymis dieselbe maximale Wirkung (Ausscheidung von Glycerin und von freien Fettsäuren) wie ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid. Es zeigte dieselbe Abhängigkeit der Wirkung von der Calcium-Konzentration; die Dosis-Wirkungskurve zeigte identischen, sigmoiden Verlauf, nur erschien sie erst bei 20mal höherer Konzentration. Man darf deshalb in erster Näherung annehmen, dass dieselbe Rezeptorpopulation betroffen wird wie im Falle des unsubstituierten Polypeptids¹⁷.

Hingegen wurde an der überlebenden Nebenniere keine steroidogene Aktivität gefunden¹⁸. Ob dieser Befund auf veränderte Transportverhältnisse, gestörten Rezeptormechanismus oder gar Antagonismus zurückzuführen ist, muss noch genau abgeklärt werden.

4.3) *Affinität von Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid zu Glucose-6-phosphat-dehydrogenase aus Rinder-Nebenniere*. Neue Versuche weisen darauf hin, dass es auf der Oberfläche von Zellen eines Nebennierenrindentumors Rezeptoren für ACTH gibt¹⁹. Dieser Befund stimmt mit dem heutigen Wissen über Lokalisierung und Rezeptoreigenschaften der Cyclase⁸ überein. Die Möglichkeit eines Angriffs des ACTH auf verschiedene Rezeptoren an verschiedenen Orten auf und in der Zelle darf aber nicht ausser Betracht gelassen werden. Mehrere Sorten von Rezeptoren für ein Hormon hätten den biologischen Vorteil, dass die «redundancy» des kybernetischen Systems vergrössert würde, das heisst, dass bei Versagen (genetisches Versagen, somatische Mutationen und dergleichen) des einen Rezeptors noch andere spielen würden. Als weiterer Rezeptor wurde das Enzym Glucose - 6 - phosphat - dehydrogenase (G6PD), die D-Glucose-6-phosphat:NADP⁺-oxidoreductase (E.C. 1.1.1.49), vorgeschlagen²⁰. Auch damit könnten metabolische Reaktionsketten (wie Steroid-Hydroxylierung und die für die Proteinsynthese wichtige Synthese von Ribose-Zuckern) durch ACTH reguliert werden. Experimente weisen auf eine Aktivierung des Enzyms durch ACTH (besonders auch durch

ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid) hin: sie betrug in vitro maximal 50–60% (Beschleunigung der NADP⁺-Reduktion bei 10⁻⁹ M Enzym, 10⁻⁹ M ACTH, 10⁻⁶ M NADP⁺ und 10⁻⁵ M Glucose-6-phosphat in Phosphatpuffer).

Es wäre nun wichtig, eine spezifische Affinität des ACTH für dieses Enzym nachzuweisen: dadurch könnte man den einen Aspekt des Rezeptors, eben die spezifische Bindung, genauer beschreiben und später mit dem Signal, hier die NADP⁺-Reduktion, korrelieren. Als erste Stufe untersuchten wir die Bindung unseres Dansylderivates.

Wird eine 1,1 × 10⁻⁷ M Lösung von Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid in Natriumacetatpuffer (0,3 M, pH 5,5) bei Zimmertemperatur mit planpolarisierendem Licht angeregt, so beträgt die experimentelle Polarisation der Fluoreszenz, p_{\min} , nur 0,075²¹. Dieser Befund bedeutet hauptsächlich, dass während der kurzen Zeit ($\sim 10^{-8}$ sec), die für die Übertragung der Energie vom molekularen Anregungsoszillator auf den Emissionsoszillator gebraucht wird, sich die Molekeln (infolge schneller Brown'scher Rotation) stark aus derjenigen Lage entfernen können, in der sie sich im Moment der Anregung befanden. Wenn nun der Lösung grosse Molekeln, Zellpartikel oder Zellen zugefügt werden, welche imstande sind, das dansylierte Hormon zu adsorbieren, so wird derjenige Anteil der Gesamtpopulation der fluoreszierenden Molekeln, der adsor-

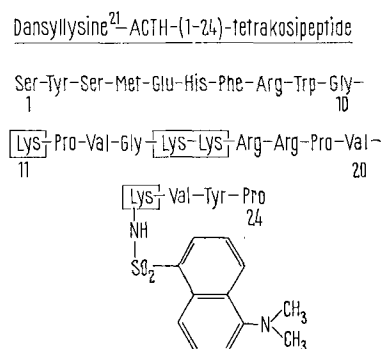


Fig. 8. N⁶-Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetrakosipeptid.

¹⁴ G. WEBER, Adv. Protein Chem. 8, 415 (1953) und dort zitierte Literatur.

¹⁵ R. SCHWYZER und H. KAPPELER, Helv. chim. acta 46, 1550 (1963).

¹⁶ Experimentelle Arbeit P. SCHILLER. Wegen Platzmangels in unserem Laboratorium durften Teile der Arbeit in den Laboratorien der CIBA-Aktiengesellschaft, Basel, ausgeführt werden, wofür wir Herrn Dr. W. RITTEL und seinen Mitarbeitern bestens danken.

¹⁷ Diese Untersuchungen wurden in freundlicher Weise von Herrn Dr. P. BALLY, Pharmakologisches Institut der Universität Bern, ausgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken möchten.

¹⁸ Untersuchungen von Herrn Dr. P. DESAULLES, CIBA-Aktiengesellschaft, Basel, wofür wir auch hier bestens danken möchten.

¹⁹ B. P. SCHIMMER, K. UEDA und G. H. SATO, Biochem. biophys. Res. Commun. 32, 806 (1968).

²⁰ K. W. MCKERNS, in Functions of the Adrenal Cortex (Ed. K. W. MCKERNS; Appleton-Century-Crofts, New York 1968). – W. E. CRISS und K. W. MCKERNS, Biochemistry 7, 2364 (1968).

biert ist, mit der kleineren Geschwindigkeit der grösseren Teilchen rotieren. Die Lösung wird deshalb eine entsprechend grössere Fluoreszenzpolarisation aufweisen. Ein vorläufiges Experiment dieser Art, welches mit kristallisierter Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Rinder-Nebennieren gemacht wurde, ist in Figur 9 dargestellt²³. Mit einem 20- bis 30fachen Überschuss von Enzym über Hormon wird p auf etwa 0,23 erhöht. Die Darstellung der Ergebnisse in der Form einer «Scatchard-Auftragung» ist in Figur 10 gezeigt. Aus der Tatsache, dass die Punkte über den ganzen Sättigungsbereich auf einer Geraden liegen, dürfen wir schliessen, dass wir es nur mit einer Bindungskonstante zu tun haben. Es ist also mit grösster Wahrscheinlichkeit nur eine Sorte von topochemischem Bindungsbereich auf der Enzymoberfläche für die Bindung verantwortlich.

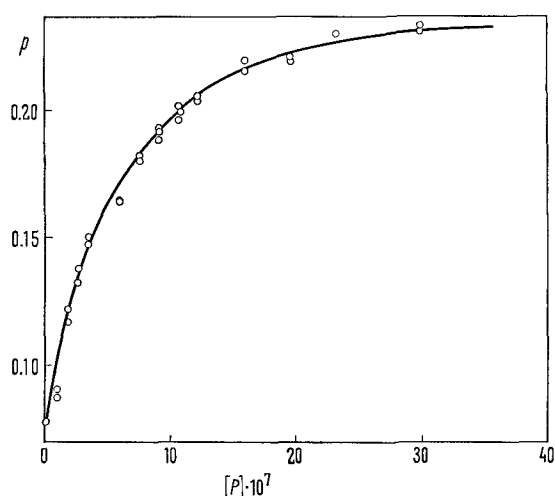


Fig. 9. Titration von N-Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetraokosipeptid mit Glucose-6-phosphat-dehydrogenase. p = Exp. Fluoreszenzpolarisation²¹, $[P]$ = Konzentration des Enzyms. Übrige Bedingungen siehe Text.

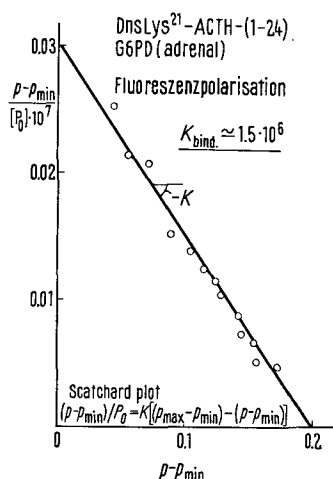


Fig. 10. Affinität von N⁶-Dansyllysin²¹-ACTH-(1-24)-tetraokosipeptid zu Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Scatchard-Auftragung).

Daraus (und aus der Grösse der Assoziationskonstante von ca. $1,5 \times 10^6$ l/Mol) dürfen wir auf eine *grosse Spezifität* schliessen.

Man wird einwenden, dass die Affinität dieses fluoreszierenden Derivates nichts mit derjenigen des nativen Hormons zu tun hat. Wir sind nun aber in der Lage, auch diese (und diejenige vieler anderer Peptide) zu studieren. Man braucht nur Kompetitions-Experimente durchzuführen, in denen man die eben beschriebene Fluoreszenzpolarisation in Gegenwart verschiedener Mengen des nativen Hormons oder anderer zu untersuchenden Peptide beobachtet, um die Spezifität desselben Bindungsbereiches (oder, um ganz genau zu sein, eventuell anderer, mit diesem in «allosterischer» Beziehung stehenden Bereiche) für diese Polypeptide zu bestimmen.

5) Eigene Programmierung

Bisher haben wir von Polypeptidmolekeln gehört, welche von der Natur programmiert wurden. Wir wollen uns zum Schluss die Frage stellen, ob wir schon in der Lage sind, selbst einfache Funktions- und Regulationsprogramme in Polypeptidsprache zu schreiben. Den Anfang zu einem solchen Versuch möchte ich Ihnen im Folgenden kurz beschreiben.

Unter den Wirkungen vieler Hormone finden sich solche auf den energieverknüpften Transport von Ionen, speziell auch von Alkaliionen durch Zellmembran hindurch. Das Problem eines solchen Ionen-transportes besteht darin, ein hydratisiertes Kation aus der wässrigen Phase auf der einen Seite der Membran durch die lipophile Membran hindurch und gegen einen Konzentrationsgradienten in die wässrige Phase auf der andern Seite zu bringen. Wenn wir ein naives Modell bauen wollen, so müssen wir zwei Aspekte des Problems berücksichtigen. Erstens die Konstruktion eines Trägers, welcher das Kation komplexieren und in der lipophilen Phase der Membran löslich machen kann. Zweitens die Verknüpfung der Komplexierung beziehungsweise der Diffusion des Komplexes durch die Membran mit einer Energiequelle, um das Anlaufen gegen den Konzentrationsgradienten zu ermöglichen.

²¹ Die experimentelle Polarisation wird definiert als $p = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp})$, wobei $I_{||}$ und I_{\perp} die Intensitäten derjenigen Komponenten des emittierten Fluoreszenzlichtes bedeuten, welche parallel beziehungsweise senkrecht zur Polarisationssebene des anregenden Strahles polarisiert sind. Herr PETER SCHILLER hat die Messungen am Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, mit freundlicher Erlaubnis und Hilfe der Herren Prof. Dr. D. A. DERANLEAU²² und Prof. Dr. H. NEURATH an einem automatischen Fluoreszenzspektropolarimeter ausgeführt. Wir möchten auch an dieser Stelle für die gewährte Gastfreundschaft bestens danken.

²² D. A. DERANLEAU, *Analyt. Biochem.* 16, 438 (1966).

²³ Das Experiment wurde 3fach ausgeführt. Für die Überlassung des kristallisierten Enzyms (Molekulargewicht 240 000, Reinheit 80%) danken wir Herrn Prof. Dr. P. G. SQUIRE, Vorsteher des Department of Biochemistry, University of Colorado, Fort Collins²⁴.

²⁴ P. G. SQUIRE, *Int. J. Protein Res.* 7, 141 (1969).

5.1) *Konzept eines Polypeptid-Trägers für A-Kationen.* Für die spezifische Komplexierung von A-Kationen (mit kugelsymmetrischer Verteilung der chemischen Eigenschaften auf der Kationoberfläche) gibt es Beispiele. Gut bekannt sind gewisse Antibiotika, die besonders an der Eidg. Technischen Hochschule von DUNITZ, PRELOG und SIMON und ihren Mitarbeitern sehr genau untersucht wurden (zum Beispiel²⁵). In diesen Komplexen sitzen die Kationen im Innern von Käfigen, die aus Keto-, Ester- und Äthersauerstoff bestehen. Die Spezifität wird weitgehend durch die Grösse des Käfigs – entsprechend den verschiedenen Durchmessern der nicht ionisierten Kationen – bestimmt. Zu grosse Kationen finden in einem bestimmten Käfig keinen Platz, zu kleine «wackeln» darin.

Könnte man nun auf reiner Polypeptidbasis einen solchen Käfig konstruieren? Eine Möglichkeit ist in Figur 11 skizziert. Kombiniert man zwei kleine Cyclopeptidringe (durch die das Kation nicht hindurchschlüpfen kann) um ein Zentralkation (Z), so könnten bei paralleler Ausrichtung der C=O-Dipole der Peptidbindungen geeignete Kationen im entstandenen Käfig gefangen werden. Berücksichtigt man, dass zwei Ringe und ein Kation an der Reaktion teilnehmen und das dazu noch die Konformation der Ringe geändert werden muss, so erscheint dieses Modell als energetisch sehr unwahrscheinlich. Könnte man die Ringe aber an einer oder an mehreren Stellen miteinander verknüpfen, so wäre die Situation wesentlich besser.

Angenommen, dieses Schema würde zum gewünschten Erfolg der Komplexbildung führen: Wie könnte man den Transport mit einer Energiequelle verknüpfen? Würde man die Verknüpfungsstelle der beiden Ringe zum Beispiel als Disulfidbindung zwischen zwei Cysteinresten ausbilden, so liesse sich ein in der oxydierten Form (mit verknüpften Ringen) gebildeter Komplex durch Reduktion lösen. Daraus ergäbe sich das in Figur 12 dargestellte Transportschema, welches die Umwandlung von Redoxenergie in osmotische Energie (Konzentrationsenergie) erlauben sollte. Links der Membran möge die Kaliumionen-Konzentration grösser sein als rechts; links befinde sich ein geeignetes Reduktionsmittel, rechts ein Oxydationsmittel, in der Membran die Cyclopeptide. Rechts würde durch Oxydation die Trägermolekel entstehen, ein Kation annehmen und es *entlang dem Konzentrationsgradienten des Komplexes* (aber entgegen dem äusseren, in der Membran nicht vorhandenen K^+ -Gradienten) transportieren. Links angelangt, würde die Molekel reaktiv zerfallen und das Kation abgeben (welches ja selbst nicht durch die Membran zurück kann). Die Molekelhälften würden darauf – wieder entlang ihrem eigenen Konzentrations-Gradienten – nach rechts zurückdiffundieren.

Die praktische Verwirklichung wenigstens des ersten Teils dieses Konzepts, des Baus eines Polypeptid-Trägers für A-Kationen, ist kürzlich gelungen. Der Auf-

bau der nötigen Systeme und analytischen Werkzeuge für den zweiten Teil wird noch einige Zeit beanspruchen²⁶. Als Komplexbildner haben wir S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-glycyl-L-prolyl hergestellt (Figur 13). Die in Wasser sehr schwer lösliche Verbindung löst sich leicht in Gegenwart von Lithium-, Natrium- und Kaliumsalzen (dies gilt auch für gewisse organische Lösungsmittel). Nach SIMON und PIODA²⁷

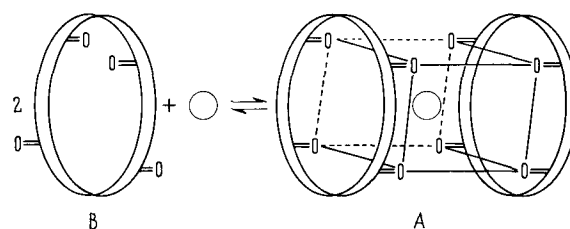


Fig. 11. Idee für die Komplexierung eines zentralen A-Kations mittels zweier kleiner Peptidringe.

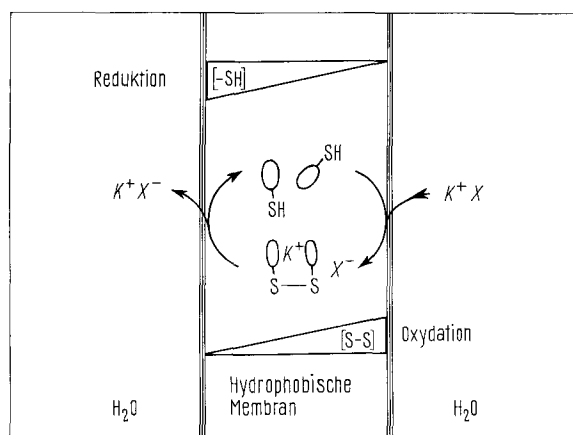


Fig. 12. Idee für ein Modell eines energieverknüpften Kationen-transportes.

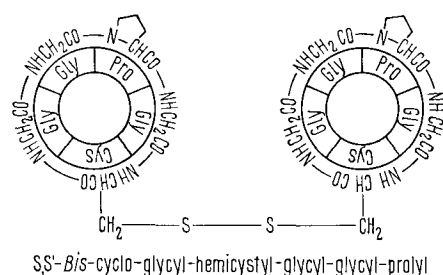


Fig. 13. Strukturformel des «programmierten» Transportpeptids.

²⁵ B. T. KILBOURN, J. D. DUNITZ, L. A. R. PIODA und W. SIMON, J. molec. Biol. 30, 559 (1967).

²⁶ R. SCHWYZER, AUNG TUN-KYI, M. CAVIEZEL und P. MOSER, Helv. chim. Acta 53, 15 (1970).

²⁷ Fräulein Dr. L. A. R. PIODA und Herrn Prof. Dr. W. SIMON, Organisch-chemisches Laboratorium der ETH, Zürich, danken wir auch hier bestens für ihre Zusammenarbeit und Hilfe.

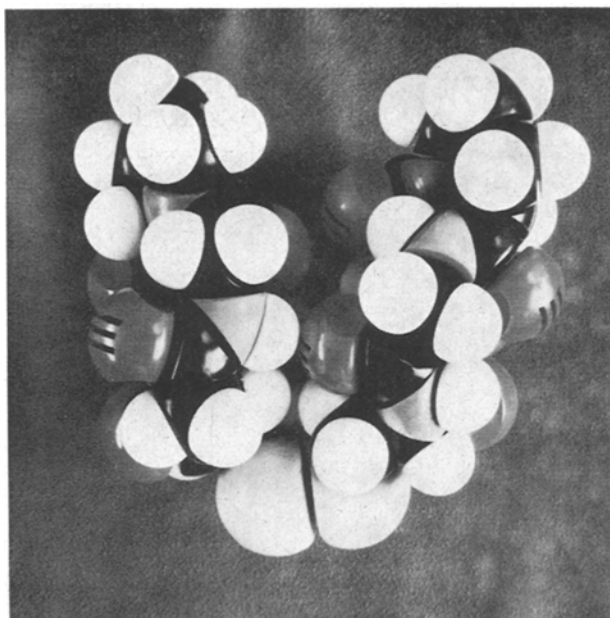


Fig. 14. Raumfüllendes Modell von S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-L-prolyl.

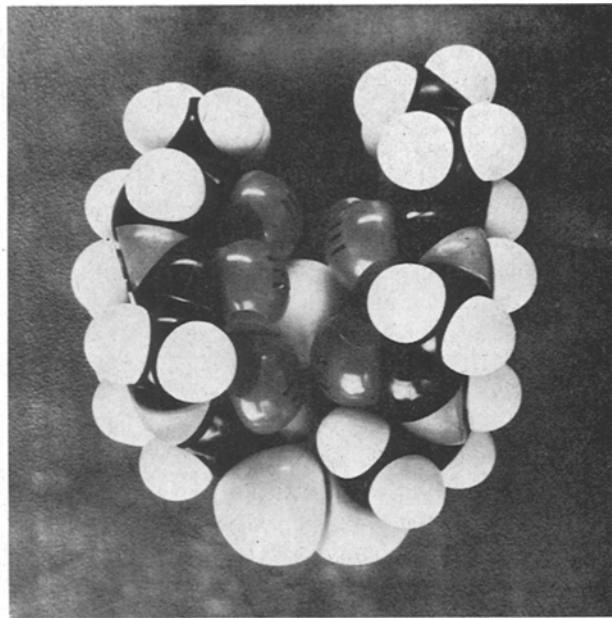


Fig. 15. Raumfüllendes Modell des Kaliumkomplexes von S,S'-Bis-cyclo-glycyl-L-hemicystyl-glycyl-L-prolyl (ohne Gegenion).

transportiert die Verbindung Kationen durch künstliche Lipidmembrane hindurch. Die Spezifität zeigt die Reihenfolge: $K^+ > Na^+ > Li^+ > Ca^{++}$. Bei der Komplexbildung erfolgt eine deutliche, im Zirkulardichroismus und in der optischen Rotationsdispersion sich ausdrückende Änderung der Konformation der Peptidbindungen. Im Zirkulardichroismus sieht man auch den Beitrag der Disulfidbindung. Eine Analyse davon zeigt, dass der Diederwinkel um die Disulfidbrücke wie normal für sterisch ungehinderte Systeme etwa 90° beträgt und dass die Chiralität der Bindung einer rechtsgängigen Schraube entspricht. Daraus und aus dem Komplexierungsverhalten kann man die folgenden Modelle als Arbeitshypothesen ableiten: Figur 14 zeigt die unkomplexierte Verbindung und Figur 15 den Kaliumkomplex.

6) Schlussbemerkungen

Alle diese Arbeiten und die vielen, die ihnen vorangegangen sind, hätten ohne die Mitarbeit vieler lieber Kollegen und Kolleginnen, Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen nicht geleistet werden können. Es sind dies (zur Hauptsache) diejenigen, die in Figur 16 aufgezählt sind.

Ausserdem habe ich von vielen Freunden, Vorgesetzten und Kollegen in den Laboratorien, an denen ich tätig war, immer wieder selbstlose Förderung meiner Interessen erfahren dürfen. Ihnen allen sei herzlich gedankt; sie alle hier aufzuzählen wäre ein Ding der Unmöglichkeit.

Nur einem möchte ich hier ganz speziell und besonders herzlich danken: meinem verehrten und lieben Lehrer, Herrn Prof. Dr. PAUL KARRER. Mein Dankes-

wort darf sich vielleicht an dasjenige anlehnen, welches schon von KÉKULÉ in stark verkürzter Form einmal gebraucht wurde.

Aus dem 11. Jahrhundert ist uns durch John of Salisbury folgende Aussage des Bischofs Bernard von Tours überliefert: «Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos gigantium humeris insidentes; ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine aut eminentia corporis, sed quia in altum subvehimur et extollimur magnitudine gigantea»^{28, 29}.

Mitarbeiter

M. FEURER	H. BOSSHARD
B. GORUP	J. CARRIÓN
B. ISELIN	M. CAVIEZEL
H. KAPPELER	D. DERANLEAU
B. RINIKER	B. DONZEL
W. RITTEL	E. FISCHER
P. SIEBER	C. DE HAËN
H. ZUBER	U. LUDESCHER
CIBA bis 1963	P. MOSER
	P. SCHILLER
A. COSTOPANAGIOTIS	AUNG TUN-KYI
C. HÜRLIMANN	Eidg. Technische Hochschule
G. TESSER	ab 1965
Universität Zürich bis 1963	

Fig. 16. Mitarbeiter, die zu diesen Arbeiten beigetragen haben.

²⁸ JOHN OF SALISBURY, *Metalogicus*, III4, ed. Webb, p. 136; vgl. auch PIERRE DE BLOIS, *Epist.*, 92, ed. Migne, *Patr. lat.*, Bd. CCVII, c. 290, und ALEXANDER NECKHAM, *De naturis rerum*, ch. 78, ed. WRIGHT, p. 123.

²⁹ Herrn Dr. RINGGER, Kantonales Literaturgymnasium Zürichberg, danke ich für die freundliche Angabe der Literaturzitate.

In meiner etwas laienhaften Übersetzung etwa: «Bernhard von Tours pflegte zu sagen, wir seien wie Zwerge, die auf den Schultern von Riesen sassen; dass wir mehr und entlegeneres als diese sehen, ist offensichtlich nicht unserer besonderen Sehschärfe oder unserem hohen Wuchse zuzuschreiben, sondern der Tatsache, dass wir von ihrer gigantischen Grösse in die Höhe geführt und emporgehoben wurden». Einer dieser Riesen ist PAUL KARRER.

Summary. Polypeptides and proteins are compared with programmed machines capable of automatic functioning and of regulation. Among the regulatory processes, endocrine regulation is examined in more detail. Parallels are drawn to kybernetic devices, and concepts of organization and read out of information contained in polypeptide hormones are briefly dealt

with. These views lead to recent work on a fluorescent derivative of ACTH, dansyllysine-21-ACTH-(1-24)-tetrakosipeptide, which is capable of binding to potential receptors. By means of fluorescence polarization it was discovered that this hormone derivative is specifically and strongly bound to glucose-6-phosphate dehydrogenase from cow adrenals.

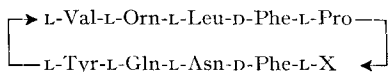
Other work is described which pertains to the question of whether it is possible to write an original program in polypeptide language in order to obtain molecules with new (biological) activities. We were able to construct a bicyclic peptide, S,S'-bis-cyclo-glycyl-hemicystyl-glycyl-glycyl-prolyl, capable of specifically complexing potassium cations and transporting them through a lipophilic membrane. It is hoped to be able to achieve coupling of this transport to redox energy differences.

SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

Synthesis of Tyrocidine B¹

BATTERSBY and CRAIG² fractionated in 1952 a mixture of tyrocidine family into 3 components designated as tyrocidine A, B and C, using a technique of counter-current distribution. In 1955 KING and CRAIG³ isolated a crystalline hydrochloride of tyrocidine B (TB), and proposed the structure of TB to be a cyclic decapeptide shown as II in Figure⁴. However, they did not mention a quantitative feature of its antibacterial activity and data of some measurements such as melting point and specific rotation^{3,4}.



Structure of tyrocidine A (I) and B (II). X represents an amino acid residue such as Phe (I) and Trp (II).

We reported previously the synthesis of tyrocidine A⁵ and E⁶, and have been attempting to synthesize other tyrocidines. We wish to report here the synthesis of the cyclic decapeptide (II) designated as TB, and the chemical and biological properties of the synthetic product⁷.

Z-Gln-Tyr-OEt⁸ was hydrogenated in the presence of palladium black and an equivalent of hydrogen chloride in a mixture of ethanol and DMF to produce H-Gln-Tyr-OEt·HCl (III)⁸, 94%, mp 157–158°, $[\alpha]_D^{25} + 22.4^\circ$. Condensation of Z(OMe)-Asn-ONp⁹ with III gave Z(OMe)-Asn-Gln-Tyr-OEt (IV), 63%, mp 213–214° dec, $[\alpha]_D^{25} - 11.0^\circ$ (DMF), which was treated with hydrazine in DMF to produce Z(OMe)-Asn-Gln-Tyr-NHNH₂ (V), 95%, mp 243° dec, $[\alpha]_D^{25} - 11.0^\circ$ (dimethyl sulfoxide). Condensation of the azide derived from V with H-Val-Orn(δ -Z)-

Leu-D-Phe-Pro-OH·HCl⁵ gave Z(OMe)-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn(δ -Z)-Leu-D-Phe-Pro-OH (VI), 87%, mp 226–227°, $[\alpha]_D^{25} - 22.2^\circ$ (DMF). (Anal. calcd. for C₆₅H₈₅O₁₇N₁₁·2H₂O: C, 58.77; H, 6.75; N, 11.60. Found: C, 59.03; H, 6.88; N, 11.67.) Removal of the *p*-methoxybenzyloxycarbonyl group from VI by treatment with trifluoroacetic acid yielded amorphous H-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn(δ -Z)-Leu-D-Phe-Pro-OH·CF₃COOH (VII) in quantitative yield.

¹ Presented at the 7th Symposium on Peptide Chemistry at Tokyo University, Tokyo (Japan), 22 November 1969.

² A. R. BATTERSBY and L. C. CRAIG, J. Am. chem. Soc. 74, 4019 (1952).

³ T. P. KING and L. C. CRAIG, J. Am. chem. Soc. 77, 6624 (1955).

⁴ T. P. KING and L. C. CRAIG, J. Am. chem. Soc. 77, 6627 (1955).

⁵ M. OHNO and N. IZUMIYA, J. Am. chem. Soc. 88, 376 (1966). – M. OHNO, T. KATO, S. MAKISUMI and N. IZUMIYA, Bull. chem. Soc. Japan 39, 1738 (1966).

⁶ N. MITSUYASU, M. WAKI, S. MATSUURA, K. KUROMIZU and N. IZUMIYA, Abstract of 21st Annual Meeting of Chem. Soc. Japan, Tokyo (April 1968), vol. 3 p. 2242. – N. MITSUYASU and N. IZUMIYA, Experientia, submitted.

⁷ The synthesis of Z-Val-Orn(δ -Tos)-Leu-Phe-Trp-Phe-OMe, has been reported; H. ZAHN and D. BRANDENBURG, Justus Liebigs Annln. Chem. 692, 220 (1966).

⁸ Satisfactory elemental analyses and chromatographic data were obtained for all crystalline compounds described here. $[\alpha]_D$ refers to a solution in methanol at 20° otherwise noted. Z-, benzyloxycarbonyl; Z(OMe)-, *p*-methoxybenzyloxycarbonyl; -ONp, *p*-nitrophenyl ester; DMF, dimethylformamide; HOSu, N-hydroxy-succinimide; DCC, dicyclohexylcarbodiimide. Amino acid symbols except D-Phe denote the L-configuration.

⁹ E. SCHRÖDER and E. KIEGER, Justus Liebigs Annln. Chem. 673, 208 (1964).