

the data from sleep studies with MAO inhibitors suggests that 5-HT may be antagonistic to sleep production and cause stimulation<sup>12</sup>.

It has been reported that indole-3-acetaldehyde and the 5-hydroxyl analog, when injected i.p. into 1-2-day-old chicks, produce sleep states as from 5-HT or 5-hydroxytryptophan<sup>13</sup>. Whereas effects of the latter compounds could be reduced by pretreatment with the MAO inhibitor, pargyline, it had no effect on the sleep producing properties of the aldehydes. Since enzyme catalysis is reversible, the aldehydes and alcohols are introconvertible, the effects of the alcohol dehydrogenase inhibitor, pyrazole, would be to increase the half-life of administered 5-HTol and to diminish accumulation of the corresponding aldehyde. Since pyrazole in this study increased the sleep effects of the alcohol, it is inferred that increased quantities of the latter in spite of a resultant decrease of the aldehyde correlate with increased sleep production.

The necessity of using a high dosage of 5-HTol compared to 5-HT to produce sleep might be explained by a greater polarity of the former or its inability to form lipophilic complexes. Thus even in the chick it may not cross the blood-brain barrier appreciably. The expectedly more lipophilic 5-MTol was a more potent sleep producing agent. However, even with it in past studies the tagged compound when injected i.p. into rats caused only a maximum of 0.04% of the radioactivity to appear in the brain<sup>14</sup>.

It is concluded from these studies and past reported data that it is probable that 5-HTol is the sleep producing neutral metabolite of 5-HT and that the sleep producing effects of indoleacetaldehydes are also due to their conversions to quantities of the tryptophols which are the active agents.

**Résumé.** Chez le poussins de 1-14 jours l'agent inhibitoire de déhydrogénation d'alcool et pyrazol prologeait considérablement la période de sommeil produit par 5-hydroxy-tryptophol, les données d'ensemble suggérant que ce dernier composé est le métabolite neutre, somnifère, de 5-hydroxytryptamine.

R. G. TABORSKY

26415 Somerset Lane, Kent (Washington 98031, USA),  
5 March 1971.

<sup>12</sup> D. J. MAHLER and F. HUMOLIER, *Int. J. Neuropsychol.* 3, 229 (1967).

<sup>13</sup> H. C. SABELLI, W. J. GIARDINA, S.G.A. ALIVISATOS, P. K. SETH and F. UNGAR, *Nature, Lond.* 223, 73 (1969).

<sup>14</sup> P. DELVIGS, W. M. MCISAAC and R. G. TABORSKY, *J. biol. Chem.* 240, 348 (1965).

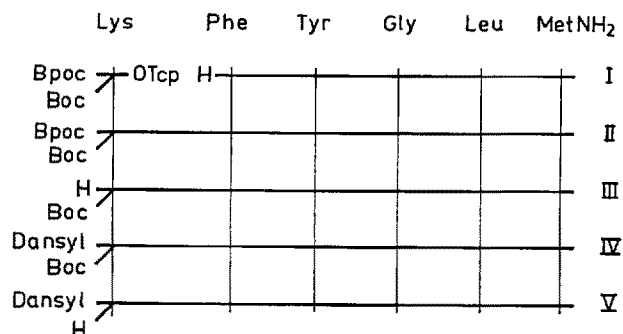
## Ein fluoreszenzmarkiertes Physalaemin-Analoges mit hoher biologischer Aktivität

Die kovalente Fluoreszenz-Markierung von Molekeln zur Gewinnung von Informationen über deren Verteilung, Konformation und Wechselwirkung mit anderen Molekülen hat sich in der Protein-Chemie allgemein bewährt<sup>1</sup>. Als besonders günstig erwies sich die Dansyl-Gruppe<sup>2,3</sup>, die in einigen Fällen auch zur Markierung von Peptid-Wirkstoffen herangezogen wurde<sup>4-6</sup>.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über Physalaemin-Peptide haben wir ein kurzkettiges fluoreszenzmarkiertes Peptid synthetisiert, das am  $\alpha$ -Stickstoff des N-terminalen Lysins eine Dansyl-Gruppe trägt (Figur, Peptid V). Für die Substitution wählten wir die  $\alpha$ -Position, weil bereits von LÜBKE et al.<sup>7</sup> an einer Serie von Eledoisin-Heptapeptiden und von uns<sup>8</sup> bei analogen Hexapeptiden des Physalaemins festgestellt wurde, dass die  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins für die biologische Aktivität dieser Peptide von weitaus geringerer Bedeutung ist als die  $\epsilon$ -Aminogruppe. Das Pentapeptid I<sup>9</sup> wurde von uns durch stufenweisen Aufbau mit Hilfe von Boc-Aminosäure-2,4,5-trichlor-phenylestern ohne Schutz des phenolischen Hydroxyls des Tyrosins dargestellt<sup>8</sup>. Umsatz dieses Pentapeptids I mit N $\alpha$ -Bpoc-N $\epsilon$ -Boc-Lysin-2,4,5-trichlorphenylester [C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>, (664,01) ber. 59,69% C, 5,62% H, 4,22% N; gef. 59,48% C, 5,61% H, 4,37% N; Schmp. 67-71°; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>-18,4° (c = 1; DMF)] lieferte das geschützte Hexapeptid II. Selektive Abspaltung der Bpoc-Schutzgruppe mit Ameisensäure/Essigsäure-Gemisch<sup>10</sup> führte zu dem Hexapeptid III.

Durch Dansylierung der freien  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysyl-Restes von III erhielten wir das geschützte Dansyl-Peptid IV, das wir auf mit 30 g Kieselgel PF<sub>254</sub> (Merck) beschichteten Platten von 20 × 20 cm im Gemisch Chloroform/Methanol (9:1) reinigten. Dabei isolierten wir ein Nebenprodukt mit höherem R<sub>f</sub>-Wert als IV, das bei der sauren Hydrolyse ausser Phenylalanin, Glycin, Leucin, Methionin und N $\alpha$ -Dansyl-Lysin noch O-Dansyl-Tyrosin

lieferte, wie durch Papierelektrophorese mit authentischen Vergleichssubstanzen gezeigt werden konnte. Wir schreiben dieser Verbindung daher die Struktur N $\alpha$ -Dansyl-N $\epsilon$ -Boc-Lys-Phe-Tyr (O-Dansyl)-Gly-Leu-MetNH<sub>2</sub> zu.



Syntheschema für das fluoreszenzmarkierte Physalaemin-Hexapeptid.

Wirkung des fluoreszenzmarkierten Peptides im Vergleich zu dem entsprechenden unsubstituierten Peptid

|                                                                | Meer-schweinchen-Ileum | Meer-schweinchen-Blutdruck |
|----------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| ED <sub>50</sub> bzw. ED <sub>30</sub> von Dansyl-Hexapeptid V | 12,4 ng/ml             | 290 ng/kg                  |
| ED <sub>50</sub> bzw. ED <sub>30</sub> von Hexapeptid VI       | 8,7 ng/ml              | 130 ng/kg                  |
| Relative Aktivität VI = 100%                                   | 84                     | 45                         |

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von IV mit Chlorwasserstoff/Eisessig ergab schliesslich das fluoreszenzmarkierte Hexapeptid V vom Schmp. 193–196°; UV: max  $\lambda$  334 nm, Fluoreszenz:  $\lambda_{em}$  535 nm ( $\lambda_{exc}$  335 nm), Aminosäureanalyse nach 20 h. Hydrolyse mit 20%iger Salzsäure

bei 110°: Phe 0,95; Tyr 0,72; Gly 1,05; Leu 1,00; Met 0,95; Dünnschichtchromatographie homogen im System Chloroform/Methanol/Essigsäure (80:20:1,5) und Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1) auf Eastman Kieselgel-Chromatographiefolie Type K 301 V.

Physalaemin und seine C-terminale Hexapeptid-Sequenz [6–11] Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-MetNH<sub>2</sub> (VI) kontrahieren in ausserordentlich niedriger Dosis extravasculäre glatte Muskulatur und bewirken eine starke Blutdrucksenkung bei verschiedenen Spezies<sup>9,11,12</sup>. Dabei ist die Aktivität des Hexapeptids VI in etwa der des Physalaemins selbst gleichzusetzen<sup>13</sup>.

Zur Testung des Dansyl-Hexapeptids V im Vergleich zur unsubstituierten Sequenz VI wurde von uns als in vitro-Modell das Meerschweinchen-Ileum und als in vivo-Modell die Blutdruckmessung am Meerschweinchen verwendet<sup>14</sup>. Am Meerschweinchen-Ileum diente die halbmaximale Wirkung (ED<sub>50</sub>) und am Meerschweinchen-Blutdruck eine Senkung um 30% des Ausgangswertes (ED<sub>30</sub>) als Vergleichsgrösse (Tabelle).

**Summary.** The synthesis of fluorescent labelled derivative of the N-terminal physalaemin hexapeptide [6–11], which contains a 1-dimethylaminoaphthalene-5-sulfonyl residue at the  $\alpha$ -amino group of the N-terminal Lysine, is described. Pharmacological data of the fluorescent labelled compound as compared with the unsubstituted peptide are reported.

B. MEHLIS, H. APELT, J. BERGMANN,  
H. NIEDRICH und P. OEHME

*Institut für Pharmakologie,  
Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,  
DDR-1115 Berlin-Buch, 15. Februar 1970.*

- <sup>1</sup> R. F. STEINER und H. EDELHOCH, Chem. Rev. 62, 457 (1962).
- <sup>2</sup> Abkürzungen: Dansyl, 1-Dimethylaminoaphthalin-5-sulfonyl; Boc, tert.-Butyloxycarbonyl; Bpoc, 2-(p-Biphenyl)-isopropoxy-carbonyl. Abkürzungen für Aminosäuren vgl. IUPAC Commission on Biochem. Nomenclature, Europ. J. Biochem. 7, 259 (1967); alle Aminosäuren liegen in der L-Konfiguration vor.
- <sup>3</sup> W. R. GRAY, in *Methods in Enzymology* (Ed. C. H. W. HIRS; Academic Press, New York 1967), vol. 11, p. 139.
- <sup>4</sup> J. L. PRADO, Z. TAMURA, E. FURANO, J. J. PISANO und S. UDEN-FRIEND, in *Hypotensive Peptides*, Proc. Int. Symposium Florence 1965 (Eds. E. G. ERDÖS, N. BACK, F. SICUTERI und A. F. WILDE; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1966), p. 93.
- <sup>5</sup> R. SCHWYZER, Experientia 26, 577 (1970).
- <sup>6</sup> P. SCHILLER und R. SCHWYZER, Experientia 26, 695 (1970).
- <sup>7</sup> K. LÜBKE, G. ZÖLLNER und E. SCHRÖDER, in *Hypotensive Peptides*, Proc. Int. Symposium Florence 1965 (Eds. E. G. ERDÖS, N. BACK, F. SICUTERI und A. F. WILDE; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1966), p. 45.
- <sup>8</sup> B. MEHLIS, H. APELT und H. NIEDRICH, J. prakt. Chem., im Druck (1971).
- <sup>9</sup> L. BERNARDI, G. BOSISIO, F. CHILLEM, G. DE CARO, R. DE CASTIGLIONE, V. ERSAPMER und O. GOFFREDO, Experientia 22, 29 (1966).
- <sup>10</sup> P. SIEBER und B. ISELIN, Helv. chim. Acta 51, 622 (1968).
- <sup>11</sup> G. BERTACINI, J. M. CEI und V. ERSAPMER, Br. J. Pharmac. 25, 363 (1965).
- <sup>12</sup> G. BERTACINI, J. M. CEI und V. ERSAPMER, Br. J. Pharmac. 25, 380 (1965).
- <sup>13</sup> L. BERNARDI, in *Hypotensive Peptides*, Proc. Int. Symposium Florence 1965 (Eds. E. G. ERDÖS, N. BACK, F. SICUTERI und A. F. WILDE; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1966), p. 45.
- <sup>14</sup> P. OEHME, J. BERGMANN, H. NIEDRICH, F. JUNG und G. MENZEL, Acta biol. med. germ. 25, 613 (1970).

## X Ray-Induced Mutations of the Genetically-Determined Melanoma System of Xiphophorus Fish

We have reported previously<sup>1</sup> that platyfish (*Platyfiscus maculatus*) which develop from irradiated embryos reveal an increase in macromelanophore gene expression. This increase results in an overproduction of macromelanophores to premelanomas, which can be compared to that observed in F<sub>1</sub> hybrids between the platyfish and swordtail (*Xiphophorus helleri*). Since this increase in gene expression is inherited, we conclude that both somatic and germ cells are irreversibly altered in the same direction.

In order to examine more closely the genetics of this X ray-induced increase in macromelanophore gene expression, several crosses were made between irradiated and nonirradiated fish, the most important of which are discussed in this paper. The significance of our findings is considered with respect to the mutation theory of carcinogenesis.

**Methods and results.** 1. Nonirradiated females of *Sp* stocks<sup>2</sup> bred from fish which were irradiated as embryos (1500 R)<sup>1</sup> were crossed with nonirradiated males of *Sd* stocks<sup>2</sup> bred from nonirradiated fish. Reciprocal crosses with respect to sex and the stocks mentioned above were also made. The details of these crosses are given in Table I. All of these crosses reveal an increased expression in both irradiated and nonirradiated macromelanophore genes in the offspring ( $n = 242$ ) to almost the same extent as observed in those parents having only irradiated chromosomes.

2. Males and females having half of their chromosomes irradiated were crossed with fish having none of, half of or the complete set of irradiated chromosomes. The resulting offspring ( $n =$  approximately 500) reveals a variation in macromelanophore gene expression which corresponds to the variation in the number of irradiated chromosomes present. (Table II).

3. Finally, nonirradiated platyfish of *Sp* stocks bred from fish which were irradiated as embryos (1500 R) were crossed with nonirradiated swordtails bred from nonirradiated fish. The resulting hybrids ( $n = 155$ ) reveal an overproduction of macromelanophores additional to that displayed by normal hybrids.

**Discussion.** These crosses have excluded several hereditary constituents as possible targets of the X ray-induced alteration which results in an overproduction of macromelanophores to premelanomas.

Mutations of the macromelanophore genes themselves cannot be responsible for this alteration, since both irradiated and nonirradiated macromelanophore genes reveal an increase in expression in the offspring (Table I). Furthermore, this genetic alteration cannot involve mutations of the sex chromosomes or of cytoplasmic constituents contributed in different quantities by ovum and sperm because the increase in macromelanophore gene expression is independent of the sex of the parent contributing the irradiated chromosomes to the offspring (Tables I and II).