

Table II. Physical properties of [deamino, 4-threonine]-oxytocin (IIa) and [deamino, 4-threonine]-mesotocin (IIb) compared with those of [4-threonine]-oxytocin, [4-threonine]-mesotocin, oxytocin, mesotocin, and deamino-oxytocin

Physical properties	Deamino-4-Thr-oxytocin ^a	4-Thr-oxy-tocin ^b	Deamino-4-Thr-Mesotocin ^a	4-Thr-Mesotocin ^c	Mesotocin ^d	Deamino-Oxytocin ^e	Oxytocin ^f
Rf ^g	0.56	0.42	0.57	0.39	0.33	0.78 ^h	0.34 (0.59) ^h
$[\alpha]_D^{T^{\circ}K}$	-85.7°	-10.4°	-83.4°	-8.2°	-31.8°	-107°	-24.0°

^aPresent Communication. ^bSee Ref. ^{2b}. ^cValues from M. MANNING and W. H. SAWYER, unpublished data. ^dValue reported by RUDINGER et al. (1969) see Footnote^e Table I. ^eSee Ref. ^{4b}. ^fSee Ref. ⁶. ^gThin layer chromatography in the upper phase of the solvent system Butanol: acetic acid: water: 4:1:5 as described in Ref. ^{2b}. ^hValues reported in Ref. ^{4b}; are for descending chromatography on Whatman No. 1 Paper in the same solvent system as in ^g. ⁱIn 1 N acetic acid (C = 0.50 for all except mesotocin); T° = 22°, 24°, 24–21°, 22.5°, respectively.

resulted in a general marked reduction in potency of all of the characteristic pharmacological activities of both of these highly active analogs. This unexpected pattern of diminished activities is in striking contrast to that obtained by removal of the amino group from oxytocin. The resulting compound, deamino-oxytocin possesses a marked enhancement of all activities except the rat vasopressor. In the case of IIa and IIb it is interesting to note that the most drastic reduction in both instances is in the rat uterus activity. On the other hand the fowl vasodepressor activity of both analogs was not diminished nearly to the same extent. In fact, the fowl vasodepressor potency of IIb is higher than that of deamino-oxytocin. It is of further interest to note that whereas both IIa and IIb exhibit a fowl vasodepressor activity which is more potent in both instances than that possessed by oxytocin and mesotocin respectively, yet all of the other characteristic activities of both IIa and IIb are lower than those of oxytocin and mesotocin respectively.

These results illustrate a rather curious anomaly from the structure-function point of view. On the one hand, the substitution of glutamine by threonine in the 4-positions of oxytocin and mesotocin has resulted in analogs which are much more potent in the characteristic assay systems than the parent peptide in each case: yet, on the other hand, the identical substitution in deamino oxytocin and deamino mesotocin has led to a surprising diminishment of these same activities.

In searching for clues which might lead to a possible explanation for these unexpected findings it is tempting to speculate that the unusual solubility characteristics of both IIa and IIb might somehow be involved. As indicated above, both IIa and IIb were found to be much less soluble in aqueous acetic acid than any oxytocin analogs

hitherto encountered in these laboratories. Also the higher Rf values of IIa and IIb (Table II) as compared to those of [4-threonine]-oxytocin and [4-threonine]-mesotocin indicate that each of the deamino derivatives is generally much more lipophilic than the parent compound in each case. It is thus possible that the overall diminishment of activities may in some way be related to these very pronounced differences in solubilities.

The findings outlined here represent the first reported instance in which the removal of the amino group from an analog of oxytocin, which has been modified in only a single position, has resulted in a diminishment rather than in an enhancement of the characteristic oxytocin-like activities as well as the antidiuretic activity. In a planned extension of these studies, it is hoped that knowledge of the pharmacological and physical characteristics of the deamino derivatives of a) synthetic 4-threonine analogs of the other neurohypophyseal hormones and b) synthetic oxytocin analogs with other hydroxy-amino acids in the 4-position, may help to illuminate and possible further clarify the surprising findings reported here.

Zusammenfassung. Synthese (Merrifield-Methode) und pharmakologische Eigenschaften der Desamino-Derivate von (4-Threonin)-Oxytocin und (4-Threonin)-Mesoxytocin werden beschrieben.

M. MANNING, E. J. COY and W. H. SAWYER

Department of Biochemistry, Medical College of Ohio at Toledo, P.O. Box 6190, Toledo, (Ohio 43614, USA) and Department of Pharmacology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University New York, (New York, USA), 3 May 1971.

PRO EXPERIMENTIS

Redaktionelle Vorbemerkung. Die nachstehende Arbeit bringt unseres Erachtens methodologische Anregungen (z.B. verbesserte Schätzungen für die Parameter der Schätzgleichung), welche geeignet erscheinen, die Qualität der statistischen Auswertung von Versuchsergebnissen zu heben.

H.M.

Ein Beispiel zur Anwendung mehrfacher linearer Regression in der Biochemie

R. STRASSER und A. MISEREZ¹ beschreiben die Ergebnisse von Untersuchungen über das Verhalten von Polysacchariden während der Mikroelektrophorese. Sie geben in ihrer Arbeit Werte für die Wanderstrecke einiger Polysaccharide als Funktion der Zeit und der Stromstärke an.

Die Wanderstrecke ist eine lineare Funktion der Zeit, wobei die Wandergeschwindigkeit wiederum linear zu-

nimmt als Funktion der Stromstärke. STRASSER und MISEREZ geben eine Formel für die Wanderstrecke

$$w(t) = n_{(I)} \cdot t \quad (1)$$

und für die Geschwindigkeit

$$n_{(I)} = m \cdot I + q. \quad (2)$$

¹ R. STRASSER und A. MISEREZ, *Experientia* 27, 239 (1971).

Stromstärke I und Zeit t sind unabhängige Variable, $w(t)$ ist die experimentell beobachtete Wanderstrecke, aus denen die Parameter zur Schätzung der zu erwartenden Wanderstrecke als Funktion von Zeit und Stromstärke ermittelt werden sollen

$$w(t) = (m \cdot I + q) \cdot t \tag{3}$$

STRASSER und MISEREZ¹ gehen so vor, dass sie für jede untersuchte Stromstärke gemäss (1) die Wandergeschwindigkeit schätzen und anschliessend aus den ermittelten Wandergeschwindigkeiten die Parameter in (2) schätzen.

Dieses Vorgehen ist wenig wirkungsvoll, und die Aufgabe kann besser mit Hilfe mehrfacher linearer Regression² gelöst werden.

Bezeichnen wir mit

- x_1 die Stromstärke I
- x_2 die Zeit t .
- y die Wanderstrecke

so können wir folgendes lineares Modell mit Interaktion formulieren

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2. \tag{4}$$

Dem Ansatz von STRASSER und MISEREZ¹ würde das reduzierte Modell

$$y_i = \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 = (\beta_{12} x_1 + \beta_2) x_2 \tag{5}$$

entsprechen. Aus den mitgeteilten Messwerten (unter Vernachlässigung der Werte $y_i = 1$) erhält man für die Regressionskoeffizienten des vollständigen Modells

$$\begin{aligned} \hat{\beta}_0 &= 0.0050 \ 3616 \\ \hat{\beta}_1 &= 0.0005 \ 1975 \\ \hat{\beta}_2 &= 0.0016 \ 8224 \\ \hat{\beta}_{12} &= 0.0038 \ 6317 \end{aligned}$$

und für das reduzierte Modell

$$\begin{aligned} \hat{\beta}_2 &= 0.0018 \ 3291 \\ \hat{\beta}_{12} &= 0.0038 \ 5146 \end{aligned}$$

Diese Werte stimmen annähernd mit den von STRASSER und MISEREZ¹ angegebenen für $q = 1.75 \cdot 10^{-3}$ und $m = 3.94 \cdot 10^{-3}$ überein.

Mit Hilfe einer Streuungszerlegung² kann geprüft werden, ob das reduzierte Modell zur Beschreibung der Beobachtungen genügt.

Streuungszerlegung	FG	Quadratsummen	Durchschnittsquadrate
Regression, vollständiges Modell ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}$)	4	4.2597 4630	
Regression, reduziertes Modell (β_2, β_{12})	2	4.2597 1666	
Differenz für β_0, β_1	2	0.0000 2964	0.0000 1482
Rest	17	0.0034 5370	0.0002 0316
Insgesamt	21	4.2632	

Da das Durchschnittsquadrat für die Differenz für den zusätzlichen Einbezug von β_0 und β_1 kleiner ist als das Durchschnittsquadrat für den Rest, darf geschlossen werden, dass das reduzierte Modell (5) zur Beschreibung der Wanderstrecke der Polysaccharide als Funktion von Stromstärke und Zeit genügt.

Die in Modell (5) enthaltene Grösse β_2 bewirkt, dass selbst bei der Stromstärke $x_1 = 0$ eine gewisse Wanderung erfolgt, was nach den physikalischen Gegebenheiten nicht zu erwarten ist. Man würde erwarten, dass die Wanderstrecke der Substanzen proportional zur Zeit x_2 und zur Stromstärke x_1 ist, was einer Modellgleichung

$$y_i = \beta_{12} x_1 x_2 \tag{6}$$

entspräche. Es sei deshalb noch geprüft, ob β_2 aus dem Modell weggelassen werden kann. Für dieses Modell lautet die Schätzung des Regressionskoeffizienten

$$\hat{\beta}_{12} = 0.0042 \ 2150$$

Die Signifikanz von $\hat{\beta}_2$ wird wiederum mit einer Streuungszerlegung² geprüft.

Streuungszerlegung	FG	Quadratsummen	Durchschnittsquadrate	F
Regression, vollständiges Modell (β_2, β_{12})	2	4.2597 1666		
Regression, reduziertes Modell (β_{12})	1	4.2480 9545		
Differenz für β_2	1	0.0116 2121	0.0116 2121	63.390
Rest	19	0.0034 8334	0.0010 8333	
Insgesamt	21	4.2632		

Der Quotient der beiden Durchschnittsquadrate übersteigt bei weitem die Signifikanzschranke der F-Verteilung mit 1 und 19 Freiheitsgraden ($F_{0.001 \ 1,19} = 15.080$). Daraus muss geschlossen werden, dass β_2 signifikant von Null verschieden ist und in der Modellgleichung enthalten sein muss.

Damit ist die Feststellung, dass die Extrapolation der Wanderungsgeschwindigkeit auf die Stromstärke Null einen von Null verschiedenen Wert ergab, statistisch untermauert, d.h. dass es sich bei diesen Abweichungen nicht nur um blosse Zufallsabweichungen handelt. Offenbar wird die Wandergeschwindigkeit durch einen unbekannten Einfluss um einen konstanten Betrag über den zur Stromstärke proportionalen hinausgehoben.

Summary. Multiple linear regression is a versatile tool to describe the dependence of an observed variable from a number of experimentally varied factors. It makes it possible to estimate the parameters of a response function simultaneously from a single set of data and to test the appropriateness of a proposed model. An example illustrates the application of multiple linear regression to an experiment in biochemistry: the estimation of the distance travelled by a chemical in micro-electrophoresis. Tests based on multiple linear regression prove that the travelling speed is not completely proportional to the electric current applied but also contains a constant term.

H. THÜNI

Laboratorium für Biometrie und
Populationsgenetik,
Eidg. Technische Hochschule
CH-8006 Zürich (Schweiz), 9. September 1971.

² O. KEMPTHORNE, *The Design and Analysis of Experiments* (John Wiley and Sons, Inc., New York 1952; Fifth printing 1966), Chapter 5.