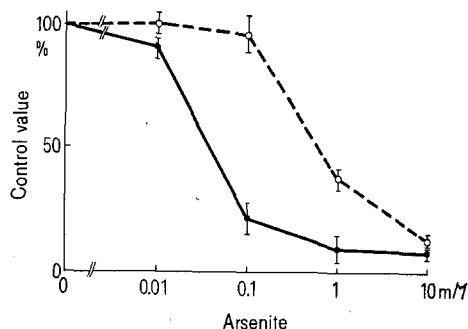


containing 20 mM glutamate, 5 mM ADP, 250 mM sucrose, 15 mM NaCl, 3 mM  $\text{CaCl}_2$  and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). The mitochondria (2.5 mg protein) were incubated in 20 mM glutamate, 5 mM ADP, 250 mM sucrose, 15 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). Protein was determined according to GORNALL et al.<sup>8</sup>. As can be seen from the broken line in the Figure, addition of 0.1 mM arsenite does not result in an inhibition of nuclear respiration. This is in agreement with the result of BETEL and KLOUWEN<sup>3</sup>, who concluded from experiments with this amount of arsenite that this compound has no effect on nuclear respiration.

From the solid line in the Figure one can see that mitochondrial respiration is inhibited by about 80% by 0.1 mM arsenite. A conclusion as made by the former authors<sup>3</sup> based on experiments with arsenite concentrations not exceeding 0.1 mM, is not valid. This is shown



Effect of arsenite on nuclear and mitochondrial respiration. The incubation was performed for 60 min at 37°C in the media described in the text. Without addition of arsenite, the oxygen uptake of the nuclei was 82.5  $\mu\text{l O}_2$  per flask and for the mitochondria 228.0  $\mu\text{l O}_2$  per flask. The solid line represents experiments with mitochondria. The broken line illustrates experiments with nuclei.

in the Figure. While 1 mM arsenite results in an inhibition of nuclear respiration of about 60%, almost complete inhibition is obtained if higher concentrations of this compound are used.

These experiments suggest that the arsenite anion has more difficulties in penetrating the nuclear membrane as compared to the mitochondrial membrane. No basic difference in the mechanism of nuclear and mitochondrial oxidative phosphorylation may be postulated as yet.

**Résumé.** La respiration des noyaux isolés du thymus de rat est inhibée par l'arsénite à une concentration 10 fois supérieure à celle qui inhibe la respiration mitochondriale. Ce fait suggère, une difficulté de pénétration à travers la membrane nucléaire et ne rend pas compte de la différence entre le mécanisme de la phosphorylation oxydative des noyaux et celle des mitochondria.

A. W. T. KONINGS<sup>9</sup>

Laboratory of Physiological Chemistry, Bloemsingel 1,  
University of Groningen (The Netherlands),  
6 January 1972

<sup>1</sup> S. OSAWA, V. G. ALLFREY and A. E. MIRSKY, *J. gen. Physiol.* **40**, 491 (1957).

<sup>2</sup> B. S. McEWEN, V. G. ALLFREY and A. E. MIRSKY, *J. biol. Chem.* **238**, 758 (1963).

<sup>3</sup> I. BETEL and H. M. KLOUWEN, *Biochim. biophys. Acta* **131**, 453 (1967).

<sup>4</sup> A. W. T. KONINGS, *Biochim. biophys. Acta*, **189**, 125 (1969).

<sup>5</sup> A. W. T. KONINGS, *Biochim. biophys. Acta* **223**, 398 (1970).

<sup>6</sup> A. FLUHARTY and D. R. SANADI, *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **46**, 608 (1960).

<sup>7</sup> G. H. HOGEBOOM, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. COLOWIC and N. O. KAPLAN; Academic press, New York 1965), vol. 1, p. 16.

<sup>8</sup> A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL and M. H. DAVID, *J. biol. Chem.* **177**, 751 (1949).

<sup>9</sup> Present address: Laboratory of Radiopathology, Bloemsingel 1, University of Groningen, The Netherlands.

## Zur Struktur von Scotophobin

Scotophobin, ein Pentadekapeptid, das in Ratten eine Veränderung ihrer natürlichen Verhaltensweise bewirkt, wurde 1970 von UNGAR et al.<sup>1</sup> isoliert. Für eine Strukturauflösung standen 300  $\mu\text{g}$  des Peptids zur Verfügung. Nach der Aminosäureanalyse verblieben etwa noch 100  $\mu\text{g}$  zur Sequenzbestimmung. Mikrodansylierung oder Edman-Abbau konnten daher als chemische Methoden nicht verwendet werden. Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde schliesslich die Aminosäuresequenz (I) (Formel) vorgeschlagen.<sup>2</sup> Die C-terminale Aminosäure ist Tyrosinamid. Ungewiss blieb allerdings, ob die Seitenketten der Aminosäuren in Position 2, 5 und 11 Amide tragen oder mit Carboxylgruppen besetzt sind. Da für weitere Untersuchungen kein natürliches Material mehr zur Verfügung stand, konnte nur durch die Synthese der theoretisch möglichen Pentadekapeptide Scotophobin die richtige Struktur zugeordnet werden. Das Resultat von zwei solchen Synthesen<sup>3</sup> deutet darauf hin, dass Scotophobin ein Peptid mit der Sequenz (II) ist (Formel). In einem neuerdings erschienenen Bericht über die Synthese eines Scotophobin-Analogas wird die Struktur von Scotophobin noch einmal zur Diskussion gestellt. WEINSTEIN et al.<sup>4</sup> synthetisierten ein Pentadekapeptid der Sequenz (III) (Formel), das in Position 2 ASP enthält und in den Positionen 5 und 11 jeweils GLU.

Der Rf-Wert sowie die biologische Aktivität (Tabelle I) dieses Peptids stimmen mit dem natürlichen Scotophobin nicht überein, woraus geschlossen wurde, dass Scotophobin nicht die Struktur (III) besitzt.

Wir synthetisierten zunächst das Peramidoscotophobin (IV) (Formel). Die Synthese dieses Peptids wurde bereits beschrieben<sup>5</sup>. Das gereinigte Produkt zeigte eine biologische Aktivität von 300 E/mg<sup>5</sup> (10–12%) verglichen mit dem natürlichen Scotophobin (Tabelle I). Biologische Tests und verschiedene chemische Untersuchungen ergaben, dass (IV) nicht identisch ist mit dem natürlichen Scotophobin.

<sup>1</sup> G. UNGAR, D. M. DESIDERIO und W. PARR, *Nature, Lond.* in press.

<sup>2</sup> D. M. DESIDERIO, G. UNGAR und P. A. WHITE, *Chem. Commun.* **9**, 432 (1971).

<sup>3</sup> W. PARR und G. HOLZER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 1043 (1971).

<sup>4</sup> A. ALI, J. H. R. FAESL, D. SARANTAKIS, D. STEVENSON und B. WEINSTEIN, *Experientia* **27**, 1138 (1971).

<sup>5</sup> Eine Aktivitätseinheit (E/mg) ist diejenige Substanzmenge, welche die mittlere Aufenthaltsdauer in der Dunkelheit von 130 sec auf 60 sec verringert.

Ser-Asx-Asn-Asn-Glx-Gln-Gly-Lys-Ser-Ala-Glx-Gln-Gly-Gly-Tyr-NH<sub>2</sub> (I)

Ser-Asp-Asn-Asn-Gln-Gln-Gly-Lys-Ser-Ala-Gln-Gln-Gly-Gly-Tyr-NH<sub>2</sub> (II)

Ac-Ser-Asp-Asn-Asn-Glu-Gln-Gly-Lys-Ser-Ala-Glu-Gln-Gly-Gly-Tyr-NH<sub>2</sub> (III)

Ser-Asn-Asn-Asn-Gln-Gln-Gly-Lys-Ser-Ala-Gln-Gln-Gly-Gly-Tyr-NH<sub>2</sub> (IV)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Sequenz (I) wurde auf Grund von massenspektrometrischen Untersuchungen erhalten. Die Aminosäuren in den Positionen 2, 5 und 11 konnten nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Die Sequenzen (II), (III) und (IV) wurden synthetisiert. Biologische und chemische Eigenschaften von Sequenz (II) entsprechen denen des natürlichen Scotophobins.

Als nächstes entschlossen wir uns, eine Amidgruppe durch eine Carboxylgruppe zu ersetzen. Von den drei zur Wahl stehenden Möglichkeiten bot die Synthese des Pentadeka-peptids, worin ASN in Position 2 durch ASP ersetzt wurde, den geringsten Aufwand. Dieses Peptid (II) wurde nach der Festkörpermethode von MERRIFIELD<sup>6</sup> synthetisiert und ist ebenfalls beschrieben<sup>3</sup>.

Das Rohprodukt dieser Synthese wurde auf einer Sephadex-LH-20 Säule gereinigt. Das erhaltene Peptid zeigte eine biologische Aktivität von 67%. Weitere Reinigung mittels Dünnschichtchromatographie ergab ein Material, das bei Ratten in biologischen Tests auf Furcht vor Dunkelheit ein vollständig identisches Verhalten hervorrief wie das natürliche Scotophobin (Tabelle I).

Das chemische Verhalten des natürlichen und synthetischen Scotophobins (II) wurde in folgenden vergleichenden Untersuchungen geprüft.

Dünnschichtchromatographie auf Silikagel-Platten mit *n*-Butanol/Äthanol/Essigsäure/Wasser 80/20/10/30 ergab für (II) einen Rf-Wert von 0,57; das natürliche Scotophobin hat im gleichen Fließmittel Rf = 0,58. Zur

weiteren Identifizierung wurde (II) mit Trypsin gespalten. Man erhielt zwei Peptide, deren Rf-Werte mit den tryptischen Fragmenten des natürlichen Scotophobins übereinstimmen (Tabelle II).

Mikrodansylierung<sup>7</sup> des natürlichen und synthetischen Scotophobins mit 5-Dimethylamino-naphthalinsulphonylchlorid, führte ebenfalls zu vergleichbaren Resultaten. Die dansylierten Peptide wurden auf Polyamid-Dünnschichtplatten aufgetragen und zweidimensional chromatographiert. Natürliches und synthetisches Scotophobin erschienen als ein Fleck, mit sehr eng beieinanderliegenden Rf-Werten (Tabelle II). Die Ergebnisse der biologischen Tests an Mäusen wurden inzwischen von anderen Laboratorien bestätigt<sup>8,9</sup>. Ferner injizierten DOMAGK et al.<sup>8</sup> Goldfischen in 500 ng und 1000 ng Dosen unser synthetisches Pentadeka-peptid (II). Die Einspritzung führte bei den Fischen zu einer Meidung der Dunkelheit, während eine Kontrollgruppe weiterhin Dunkelheit bevorzugte. Nach 16 bzw. 10 Tagen nahmen die injizierten Fische wieder ihr ursprüngliches Verhalten – Bevorzugung der Dunkelheit – an. GUTTMAN et al.<sup>9</sup> konnten in Versuchen mit Goldfischen ebenfalls die biologische Aktivität des synthetischen Scotophobins bestätigen. Goldfische, die während 3 min 90% dieser Zeit in einem dunklen Behälter verbrachten, erhielten eine Injektion mit synthetischem Scotophobin. Auch in diesem Fall konnte eine eindeutige Änderung des Verhaltens beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind kürzlich von BRYANT<sup>10</sup> bestätigt worden. Auf Grund dieser biologischen und chemischen Befunde glauben wir Scotophobin die Struktur (II) zuordnen zu können.

**Summary.** The biological and chemical properties of one of the synthetic peptides Seryl-asparagil-asparaginy-l-asparaginy-l-glutaminy-l-glutaminy-l-glycyl-glycyl-lysyl-se-ryl-alanyl-glutaminy-l-glutaminy-l-glycyl-glycyl-tyrosylamid are identical with those of the natural scotophobin.

W. PARR und G. HOLZER<sup>11</sup>

Tabelle I. Vergleich der biologischen Aktivitäten von natürlichem und synthetischem Scotophobin an Mäusen

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Natürliches Scotophobin        | 3000 E/mg |
| Synthetisches Scotophobin (II) | 3000 E/mg |
| Peramidoscotophobin (IV)       | 300 E/mg  |
| Sequenz (III)                  | 75 E/mg   |

Tabelle II. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an natürlichem und synthetischem Scotophobin

|                            | Natürliches Scotophobin | Synthetisches Scotophobin (II) |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Rf-Werte                   | 0,58 <sup>a</sup>       | 0,57 <sup>a</sup>              |
| Rf-Werte nach Dansylierung |                         |                                |
| erste Dimension            | 0,16 <sup>b</sup>       | 0,16 <sup>b</sup>              |
| zweite Dimension           | 0,16 <sup>c</sup>       | 0,18 <sup>c</sup>              |
| Rf-Werte der trypt. Fragm. |                         |                                |
| T <sub>1</sub>             | 0,26 <sup>a</sup>       | 0,30 <sup>a</sup>              |
| T <sub>2</sub>             | 0,40 <sup>a</sup>       | 0,37 <sup>a</sup>              |

<sup>a</sup> Laufmittel: *n*-Butanol/Äthanol/Essigsäure/Wasser 80:20:10:30.

<sup>b</sup> Laufmittel: Ameisensäure/Wasser 1,5:100. <sup>c</sup> Laufmittel: Benzol/Essigsäure 9:1.

University of Houston, Department of Chemistry,  
Cullen Boulevard, Houston (Texas 77004, USA),  
18. Februar 1972.

<sup>6</sup> R. B. MERRIFIELD, *Biochemistry* 3, 1385 (1964); *J. Am. chem. Soc.* 85, 2149 (1969); *Adv. Enzym.* 32, 221 (1969).

<sup>7</sup> V. NEUHOF und F. KIEHL, *Arzneimittelforschung* 19, 1898 (1969).

<sup>8</sup> G. F. DOMAGK, Privatmitteilung.

<sup>9</sup> H. N. GUTTMAN, G. MATWYSHYN und G. H. WARRINER, III, *Nature, Lond.* 235, 26 (1972).

<sup>10</sup> R. C. BRYANT, Privatmitteilung.

<sup>11</sup> Wir danken der Robert A. Welch Foundation, Houston, Texas, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. G. UNGAR, Baylor College of Medicine, Houston, Texas danken wir für die Ausführung der biologischen Tests.