

# Über die chemische Struktur des Oxytocins.

Von

H. Tuppy und H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 23. Juli 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Oktober 1953.)

Mit 3 Abbildungen.

Mit Perameisensäure oxydiertes Oxytocin wurde sowohl durch Säurehydrolyse als auch mit Hilfe eines bakteriellen Enzyms abgebaut. Die dabei entstehenden Peptide wurden nach chromatographischer Trennung chemisch charakterisiert. Aus ihrer Natur läßt sich die Struktur des Hormons erschließen:



Oxytocin, das uterusstimulierende Prinzip des Hirnanhanges, ist seiner chemischen Natur nach ein Peptid. Es wurde, ebenso wie auch das zweite Hormon des Hypophysenhinterlappens, Vasopressin, welches sowohl blutdrucksteigernde als auch antidiuretische Eigenschaften besitzt, in den letzten Jahren vor allem von *du Vigneaud* und seinen Mitarbeitern intensiv bearbeitet<sup>1-8</sup>. Beide Hormone enthalten, wie die Untersuchung

<sup>1</sup> A. H. Livermore und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **180**, 365 (1949).

<sup>2</sup> J. G. Pierce und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **182**, 359 (1950).

<sup>3</sup> J. M. Mueller, J. G. Pierce, H. Davoll und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **191**, 309 (1951).

<sup>4</sup> R. A. Turner, J. G. Pierce und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **193**, 359 (1951).

<sup>5</sup> H. Davoll, R. A. Turner, J. G. Pierce und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **193**, 363 (1951).

<sup>6</sup> J. G. Pierce, S. Gordon und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **199**, 929 (1952).

<sup>7</sup> H. G. Kunkel, S. P. Taylor und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **200**, 559 (1953).

<sup>8</sup> R. A. Turner, J. G. Pierce und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **191**, 21 (1951).

ihrer Hydrolysate erwiesen hat, acht Aminosäuren in äquimolekularer Menge und je drei Mole Ammoniak<sup>2, 8</sup>. Sechs von den acht Aminosäureresten kommen in beiden Peptiden vor: Tyrosin, Prolin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glykokoll und Cystin. Oxytocin enthält außerdem noch je einen Leucin- und Isoleucinrest, Vasopressin je einen Arginin- und Phenylalaninrest.

Nachdem in letzter Zeit vor allem durch die Anwendung der Verteilungschromatographie auf Filtrierpapier<sup>9</sup> die Aufklärung der Reihenfolge der Aminosäurereste in kleineren und größeren Peptiden möglich geworden ist<sup>10-12</sup>, schien es uns interessant, eine nähere Untersuchung des oxytocischen Hormons in Angriff zu nehmen. Die wichtigsten Resultate sind in einer vorläufigen Mitteilung kurz dargestellt worden<sup>13</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollen die Versuche, die zur Aufstellung einer Oxytocinformel geführt haben, im einzelnen beschrieben werden.

### Material und Methoden.

*Oxytocin*. Als Ausgangsmaterial diente das aus Rinderhypophysen gewonnene Präparat „*Pituisan*“ der Firma *Sanabo*, Wien, das uns von den Herstellern in freundlicher und großzügiger Weise in Form eines Trockenpulvers zur Verfügung gestellt worden ist. Das mit Äther und Petroläther entfettete und von einer geringen Menge eines in 0,05%iger Essigsäure unlöslichen Produkts befreite Material besaß eine Aktivität von 48 I. E./mg. Es wurde in der von *Livermore* und *du Vigneaud* angegebenen Weise<sup>1</sup> aus seiner Lösung in verd. Essigsäure durch 6maliges Ausschütteln mit Butanol-(2) extrahiert. Die Butanolextrakte wurden durch Waschen mit 2 m Phosphatpuffer vom pH 6,8 gereinigt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bei niedriger Temperatur eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde mit 0,05%iger Essigsäure aufgenommen, Ungelöstes abzentrifugiert und die klare Lösung im gefrorenen Zustand getrocknet. Die Aktivität des so erhaltenen, fast rein weißen und flaumigen Produkts betrug 135 I. E./mg, in einem anderen Versuch 177 I. E./mg.

Obwohl die reinsten, von *Pierce, Gordon* und *du Vigneaud* mit Hilfe der Gegenstromverteilung erhaltenen Oxytocinpräparate<sup>6</sup> eine Aktivität von bis zu 490 I. E./mg besaßen und das von uns unter alleiniger Verwendung der Butanolextraktion erhaltene Präparat bedeutend weniger aktiv war, zeigten doch papierelektrophoretische und -chromatographische Untersuchungen, daß unser Produkt nur eine einzige Peptidkomponente enthält. Für den niedrigen Wert der biologischen Aktivität scheinen Begleitstoffe verantwortlich zu sein, die einer anderen chemischen Körperklasse angehören.

*Elektrophorese*. Das Oxytocinpräparat wurde der Elektrophorese in

<sup>9</sup> *R. Conden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin*, *Biochemic. J.* **38**, 224 (1944).

<sup>10</sup> *R. Conden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin*, *Biochemic. J.* **41**, 590 (1947).

<sup>11</sup> *F. Sanger und H. Tuppy*, *Biochemic. J.* **49**, 463, 481 (1951).

<sup>12</sup> *F. Sanger und E. O. P. Thompson*, *Biochemic. J.* **53**, 353, 366 (1953).

<sup>13</sup> *H. Tuppy*, *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 449 (1953).

Filtrierpapier bei Spannungsgefällen von 20 bis 40 Volt/cm<sup>14</sup> unterworfen. Bei Behandlung der Papierstreifen mit Bromphenolblau<sup>7</sup> oder Ninhydrin wurde nur ein einziger anfärbbare Bestandteil gefunden; dieser ließ sich weder bei Verwendung von Pyridin-Essigsäure-Puffergemischen<sup>15</sup> bei pH 4 oder 5 noch bei Befolgung der von *Kunkel, Taylor* und *du Vigneaud*<sup>7</sup> angegebenen Prozedur im schwach alkalischen pH-Bereich weiter zerlegen. Auch die quantitative Auswertung eines bei pH 8 entwickelten Elektrophoresediagramms nach der Zylinderlinsen-Graukeilmethode<sup>16</sup> spricht für die Einheitlichkeit der Peptidkomponente (Abb. 1).

*Papierchromatographie.* Das oxytocische Präparat wurde mit dem Butanol-Essigsäure-Gemisch von *Partridge*<sup>17</sup> auf Filtrierpapier chromatographiert; Anfärbung mit Bromphenolblau<sup>7</sup> förderte einen durch „tailing“ etwas in die Länge gezogenen Fleck mit einem  $R_F$ -Wert von 0,37 zutage; nur in der Nähe der Lösungsmittelfront (bei  $R_F$  0,97) trat noch eine sehr schwache Färbung auf.

Die *Bestimmung der biologischen Aktivität* wurde von *A. Lindner* und *W. Schneider* im Pharmakologischen Institut der Universität Wien vorgenommen. Es fand hierbei im wesentlichen eine Methode am isolierten Rattenuterus nach *Holton*<sup>18</sup> Verwendung, die von *Lindner, Schneider* und *Stumpf*<sup>19</sup> etwas modifiziert wurde.

*Oxydation des Oxytocins mit Perameisensäure.* Da bei der chromatographischen Untersuchung cystinhaltiger Peptide Schwierigkeiten auftreten, wurde Oxytocin vor dem hydrolytischen Abbau mit Perameisensäure oxydiert; hierbei erfährt der Cystinrest des Peptidhormons Spaltung unter Bildung von zwei Cysteinsäureresten, während alle Peptidbindungen unversehrt erhalten bleiben. Die Oxydation von Cystinresten im Peptidverband zu Cysteinsäureresten war erstmals von *Sanger*<sup>20</sup> bei der Untersuchung der Peptidketten des Insulinmoleküls verwendet worden; sie wurde vor uns bereits von *Mueller, Pierce, Davoll* und *du Vigneaud*<sup>3</sup> auf Oxytocin angewendet.

10,2 mg des auf die oben beschriebene Weise erhaltenen oxytocischen Materials wurden zu weiterer Reinigung 4mal mit je 2 ccm heißem Aceton extrahiert. Zum ungelösten Rückstand wurde eine aus 9 Teilen 87%iger

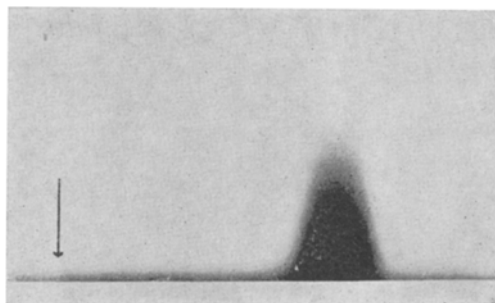


Abb. 1. Elektrophorese des oxytocischen Produkts auf Filtrierpapier. Anfärbung mit Bromphenolblau<sup>7</sup>; Schattenkurve. Dauer der Elektrophorese: 2 Stdn. Veronalpuffer pH 8,0, 0,1 m. 20 Volt/cm; 5 mA. Der Pfeil bezeichnet den Startpunkt. Die Anode befindet sich auf der rechten Seite.

<sup>14</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **83**, 737 (1952).

<sup>15</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

<sup>16</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **83**, 210 (1952).

<sup>17</sup> *S. M. Partridge*, Biochemic. J. **42**, 238 (1948).

<sup>18</sup> *P. Holton*, Brit. J. Pharmacol. **3**, 328 (1948).

<sup>19</sup> *A. Lindner, W. Schneider* und *Ch. Stumpf*, Scient. Pharmaceut. **20**, 224 (1952).

<sup>20</sup> *F. Sanger*, Biochemic. J. **44**, 126 (1949).

Ameisensäure und 1 Teil 30%igen Wasserstoffsperoxyds bestehende Mischung (0,12 ccm) gefügt, die  $\frac{1}{2}$  Std. vor dem Zusatz bereitet worden war. Nach 30 Min. während der Einwirkung bei Zimmertemp. wurde die Reaktionsmischung zur Zerstörung überschüssiger Perameisensäure mit Wasser versetzt, bei niedriger Temperatur zur Trockene verdampft, nochmals mit Wasser aufgenommen und wieder zur Trockene gebracht.

Ein kleiner Teil des oxydierten Produkts wurde mit 5,7 n HCl vollständig hydrolysiert; im Hydrolysat wurden papierchromatographisch die acht Aminosäuren Cysteinsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Tyrosin, Leucin, Isoleucin und Prolin festgestellt, sowie die bei der Umsetzung mit Perameisensäure aus Tyrosin in wechselnder Menge hervorgehende, als Tyrosin X bezeichnete<sup>11</sup> Substanz. In diesem Befund sehen wir einen

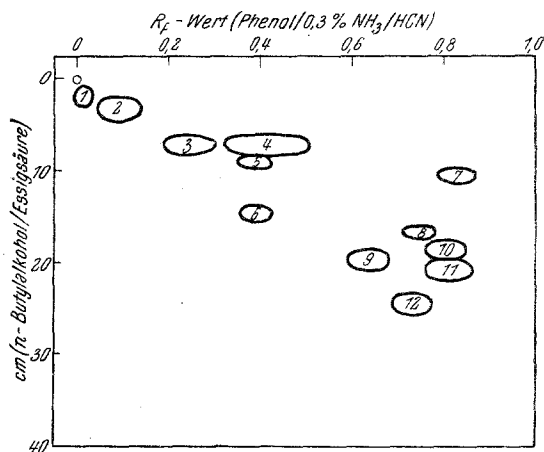


Abb. 2. Chromatogramm des aus oxydiertem Oxytocin mittels konz. HCl erhaltenen Teilhydrolysats P. Vgl. Tabelle I.

weiteren Beweis für die Reinheit der Peptidkomponente im oxytocischen Material; wäre das Oxytocin etwa durch nennenswerte Mengen Vasopressin verunreinigt, müßte sich dies durch die Anwesenheit von Arginin und Phenylalanin im Hydrolysat kundtun.

*Partielle Hydrolyse und Untersuchung des Hydrolysats.* Das mit Perameisensäure oxydierte Produkt wurde 8 Tage lang mit konz. HCl auf 37° erhitzt. Das im folgenden mit dem Buchstaben P bezeichnete Partialhydrolysat wurde bei Zimmertemp. im Exsikkator über Ätzkali eindun-

sten gelassen, der Rückstand zur Entfernung festgehaltener Salzsäure mehrmals mit Wasser aufgenommen und wieder zur Trockene gebracht, hierauf halbiert, je eine Hälfte auf je einen Bogen Whatman Nr. 4-Filtrierpapier gebracht und der zweidimensionalen Verteilungschromatographie unterworfen. Die einzelnen über das Chromatogramm verteilten freien Aminosäuren und Peptide wurden auf den Papierbögen lokalisiert und aus ihnen eluiert. Zur näheren Charakterisierung der Peptide diente die Totalhydrolyse und die Dinitrophenylierung mit nachfolgender Hydrolyse<sup>21</sup>. Einzelheiten dieser Methoden sind in früheren Arbeiten mitgeteilt worden<sup>11, 22</sup>.

Mit Hilfe der eindimensionalen Papierchromatographie lassen sich nicht alle acht Aminosäuren, die im Hydrolysat des oxydierten Oxytocins und seiner Abbaupeptide gefunden werden, in einem Versuch identifizieren. Zweidimensionale Chromatographie andererseits ist bei gleichzeitiger Untersuchung zahlreicher Peptide hemmend und kostspielig. Wir schlugen daher einen Mittelweg ein: Die Aminosäuregemische wurden zuerst eindimensional mit Phenol/0,3%  $\text{NH}_3/\text{HCN}$  entwickelt, wobei sich die langsamer laufenden

<sup>21</sup> F. Sanger, *Biochemic. J.* **39**, 507 (1945).

<sup>22</sup> H. Tuppy, *Mh. Chem.* **84**, 996 (1953).

Tabelle 1. Partielle Hydrolyse des oxydierten Oxytocins mit konz. Salzsäure.

„Spot“ Nr. (Abb. 2)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren		Nach Dimittrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren		Struktur
		DNP-Aminosäuren		Aminosäuren		
P 1	violett	CySO <sub>3</sub> H (× ×) Asp (× ×)	DNP-Asp (×)	CySO <sub>3</sub> H (× ×)		Asp-CySO <sub>3</sub> H
P 2	violett	CySO <sub>3</sub> H (× × × ×)				CySO <sub>3</sub> H
P 3	violett	Asp (× × × ×)				Asp
P 4	bräunlichviolett	Gly (× × × × × ×)				Gly
P 5	violett	Glu (× ×)				Glu
P 6	gelb → violett	CySO <sub>3</sub> H (× ×) Tyr (× ×)	DNP-CySO <sub>3</sub> H (×) O-DNP-Tyr (?)			CySO <sub>3</sub> H-Tyr
P 7	gelb	Pro (× × × ×)				Pro
P 8	bräunlichviolett	CySO <sub>3</sub> H (×) Leu (× ×) Pro (× ×)	DNP-CySO <sub>3</sub> H (× × ×)		Leu (× ×) Pro (×)	CySO <sub>3</sub> H-[Leu, Pro]
P 9	violett	Glu (× × × × ×) Ileu (× × × ×)	DNP-Ileu (× × × ×)		Glu (× × × ×)	Ileu-Glu
P 10	violett	Gly (×) Leu (× ×)	DNP-Leu (×)		Gly (× ×)	Leu-Gly
P 11	violett	Leu (× × × × ×) Ileu (×)				Leu + Ileu
P 12	violett	Glu (× ×) Tyr (×) Ileu (×)			Glu (×) Ileu (×)	Tyr-[Glu, Ileu]

Aminosäuren Cysteinsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll und Tyrosin klar voneinander trennen. Die mit einem  $R_F$ -Wert von 0,84 bis 0,90 wandernden und voneinander nicht geschiedenen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Prolin wurden gemeinsam aus dem nahe der Lösungsmittelfront gelegenen Teil des Chromatogramms eluiert, bevor dieses zur Sichtbarmachung der übrigen Aminosäuren mit einer 0,1%igen alkohol. Ninhydrinlösung besprengt worden war; sie wurden durch eine zweite eindimensionale chromatographische Trennung, diesmal mit wassergesättigtem tert.-Amylalkohol als Lösungsmittel, eindeutig identifiziert. Hierbei findet für Leucin und Isoleucin die Farbreaktion mit Ninhydrin, für Prolin vorteilhaft die Blaufärbung mit Isatin<sup>23</sup> Verwendung.

*Enzymatischer Abbau des oxydierten Oxytocins mit einer bakteriellen Proteinase.* Für die enzymatische Hydrolyse des Peptidhormons erwies sich

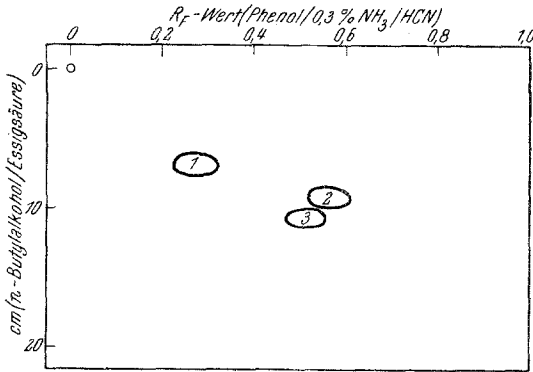


Abb. 3. Chromatogramm der sauren Fraktion S des enzymatischen Hydrolysats. Vgl. Tabelle 2.

eine von *Bacillus subtilis* produzierte Proteinase<sup>24</sup>, die sich durch ihre Fähigkeit, Ovalbumin in Plakalbumin zu verwandeln, auszeichnet<sup>25</sup>, als besonders geeignet. Das Enzym, mit dessen proteolytischer Spezifität sich die vorhergehende Mitteilung befaßt hat<sup>22</sup>, war eine Gabe der Herren Prof. K. Linderström-Lang und Ing. M. Ottesen, Kopenhagen.

10,0 mg unseres Oxytocinpräparates wurden mit Perameisensäure oxydiert (siehe oben). Das trockene Oxydationsprodukt wurde in 0,15 ccm Wasser aufgenommen und mit eben soviel Natriumbikarbonat versetzt, daß das pH einen Wert von zirka 7,3 erreichte. Nun wurde eine Lösung von 0,1 mg *Bacillus subtilis*-Proteinase in 0,15 ccm Wasser hinzugefügt und die Mischung 23 Stdn. lang bei 37° inkubiert. Die proteolytische Hydrolyse ließ sich dadurch beenden, daß das pH mit Eisessig auf 3,5 gebracht wurde; bei dieser Wasserstoffionenkonzentration wird das Enzym rasch inaktiviert.

10,0 mg unseres Oxytocinpräparates wurden mit Perameisensäure oxydiert (siehe oben). Das

*Ionophorese.* Nach Einstellen des pH auf den Umschlagspunkt von Methylrot folgte eine ionophoretische Auftrennung des durch die enzymatische Hydrolyse gewonnenen Gemisches in 3 Fraktionen: eine saure Fraktion S, eine neutrale Fraktion N und eine basische Fraktion B. Die Ionophorese, deren Ausführung früher beschrieben worden ist<sup>11, 22</sup>, dauerte 40 Min. Der Strom erreichte ein Maximum von 68 mA und fiel zu Ende des Versuches auf 30 mA. Die drei erhaltenen Fraktionen wurden getrennt aufgearbeitet und chromatographisch untersucht.

<sup>23</sup> R. Acher, Cl. Fromageot und M. Jutisz, Biochim. Biophys. Acta 5, 81 (1950).

<sup>24</sup> A. V. Güntelberg und M. Ottesen, Nature 170, 802 (1952).

<sup>25</sup> K. Linderström-Lang und M. Ottesen, C. r. trav. lab. Carlsberg, Sér. B 26, Nr. 16 (1949).

Tabelle 2. Enzymatischer Abbau des oxydierten Oxytocins mit der *Bacillus subtilis*-Proteinase.

„Spot“ Nr.	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
S 1	gelb → violett	CySO <sub>3</sub> H (×) Tyr (×)			[CySO <sub>3</sub> H, Tyr]
S 2	gelb → violett	CySO <sub>3</sub> H (× ×) Asp (× ×) Leu (× ×) Pro (× ×)	DNP-Asp (× ×)	CySO <sub>3</sub> H (× ×) Leu (× × ×) Pro (× × ×)	Asp(NH <sub>2</sub> )-[CySO <sub>3</sub> H, Leu, Pro]
S 3	gelb → violett	CySO <sub>3</sub> H (× ×) Glu (× × ×) Tyr (× ×) Ileu (× ×)	DNP-CySO <sub>3</sub> H (× ×) O-DNP-Tyr (×)	Glu (× ×) Ileu (× ×)	CySO <sub>3</sub> H-[Glu(NH <sub>2</sub> ), Tyr, Ileu]
N 1		Glu (×) Ileu (×)			Ileu-Glu(NH <sub>2</sub> )*
B 1	gelb → violett	Gly (× × ×)	DNP-Ileu (?)		Gly(NH <sub>2</sub> )**

\* N 1 ist nicht identisch mit P 9; es wandert in Phenol/0,3% NH<sub>3</sub>/HCN beträchtlich schneller als P 9 und wird in der neutralen Peptidfraktion gefunden; beides spricht dafür, daß N 1 nicht Ileu-Glu, sondern Ileu-Glu(NH<sub>2</sub>) ist.

\*\* B 1 ist nicht freies Glykokoll; es gibt mit Ninhydrin eine anfangs gelbe Farbe, während Glykokoll sich sofort violett färbt; es wird in der basischen Fraktion gefunden, während Glykokoll und Peptide, die sich ausschließlich aus Glycinresten zusammensetzen, in der neutralen Fraktion gefunden werden müßten; das chromatographische Verhalten von B 1 ist mit dem von Glycinamid identisch.

### Ergebnisse.

Die mit dem Säurehydrolysat *P* des oxydierten Oxytocins erhaltenen Resultate sind in Abb. 2 und Tabelle 1 dargestellt. Abb. 3 gibt ein Chromatogramm der sauren Peptidfraktion *S* des enzymatischen Hydrolysats wieder; die mit allen drei Fraktionen *S*, *N* und *B* des enzymatischen Abbaues gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Auf Grund der früheren Befunde *du Vigneauds* und seiner Mitarbeiter, denen zufolge sich das Oxytocinmolekül ausschließlich aus acht Aminosäureresten, die im Verhältnis 1:1 zueinander stehen und peptidartig verknüpft sind, sowie aus drei Resten amidartig gebundenen Ammoniaks zusammensetzt, läßt sich aus unseren eigenen Versuchsergebnissen die chemische Struktur des Hormons ableiten.

Die beiden Dipeptide  $\text{CySO}_3\text{H-Tyr}$  (*P* 6) und  $\text{Ileu-Glu}$  (*P* 9) geben zu erkennen, daß die Reihenfolge der Aminosäurereste im Tetrapeptid *S* 3  $\text{CySO}_3\text{H-Tyr-Ileu-Glu}$  sein muß; das Tripeptid  $\text{Tyr-[Ileu, Glu]}$  (*P* 12) erbringt einen zusätzlichen Beweis für die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung. Aus der Kenntnis des Dipeptids  $\text{Asp-CySO}_3\text{H}$  (*P* 1), des Tripeptids  $\text{CySO}_3\text{H-[Leu, Pro]}$  (*P* 8) und des Dipeptids  $\text{Leu-Gly}$  (*P* 10) folgt ferner, daß die Sequenz der Aminosäurereste im zweiten Tetrapeptid des enzymatischen Hydrolysats, *S* 2,  $\text{Asp-CySO}_3\text{H-Pro-Leu}$  lauten muß.

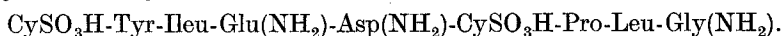
In den oben formulierten Tetrapeptidsequenzen dürften sowohl der Glutaminsäure- als auch der Asparaginsäurerest in Form ihrer Amide Glutamin und Asparagin vorliegen. Die Abwesenheit freier Carboxylgruppen in Oxytocin war schon von *Turner*, *Pierce* und *du Vigneaud* angenommen worden<sup>8</sup>. Daß nun in der Tat der in Peptidbindung stehende Glutaminsäurerest keine freie  $\gamma$ -Carboxylgruppe trägt, geht daraus hervor, daß das im enzymatischen Hydrolysat aufgefundene, bei der Hydrolyse Glutaminsäure und Isoleucin liefernde Dipeptid (*N* 1) in der neutralen Peptidfraktion gefunden wird. Dafür, daß auch die  $\beta$ -Carboxylgruppe des Asparaginsäurerestes mit Ammoniak zu einer Säureamidgruppe vereint ist, liegt kein ähnlicher direkter Hinweis vor, doch scheint diese Annahme nicht unbillig und jedenfalls die beste Erklärung für das Vorhandensein von drei Molen Ammoniak im Hydrolysat des Oxytocins zu sein.

Der Ursprung des dritten, bei der Hydrolyse gefundenen Mols Ammoniak muß im basischen Produkt *B* 1 gesucht werden; *B* 1, bei dessen Hydrolyse Glykokoll als einzige Aminosäure entsteht, gibt sich dadurch und durch sein chromatographisches Verhalten als Glycinamid zu erkennen.

Der Glycinamidrest ist als der C-terminale Aminosäurerest, als das Endglied der Peptidkette des Oxytocins anzusehen. Nun ist Glykokoll, wie das Dipeptid *P* 10 zeigt, mit Leucin verknüpft; daraus ergibt sich,

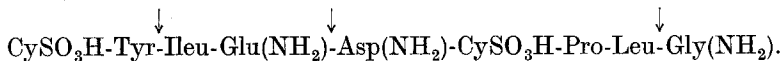


daß das Tetrapeptid *S* 2, Asp(NH<sub>2</sub>)-CySO<sub>3</sub>H-Pro-Leu, welches Leucin als carboxyl-endständigen Rest trägt, das Mittelstück der Peptidkette des oxydierten Oxytocins repräsentiert. Sodann bleibt keine andere Wahl, als im anderen Tetrapeptid CySO<sub>3</sub>H-Tyr-Ileu-Glu(HN<sub>2</sub>) (*S* 3) die N-terminale Sequenz des Peptidmoleküls zu sehen. Die Formel des oxydierten Oxytocins ist demnach



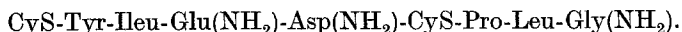
In dieser Formel bildet Cysteinsäure das erste Glied der Kette von Aminosäureresten; dies steht in Einklang mit dem von *Davoll, Turner, Pierce* und *du Vigneaud* mitgeteilten Befund<sup>5</sup>, daß der Cystinrest des oxytocischen Hormons bei dessen Umsetzung mit Fluordinitrobenzol<sup>21</sup> dinitrophenyliert wird und somit eine freie  $\alpha$ -Aminogruppe besitzt.

Das bakterielle Enzym, welches zur Aufklärung der Reihenfolge der Aminosäurereste im oxydierten Oxytocin herangezogen worden ist, spaltet dessen Peptidkette zwischen Glutamin und Asparagin, zwischen Leucin und Glycinamid, sowie in geringerem Ausmaß zwischen Tyrosin und Isoleucin:



Eine sehr ähnliche Spezifität hat die *Bacillus subtilis*-Proteinase bei ihrer Einwirkung auf die „Fraktion B“ des oxydierten Insulins gezeigt<sup>22</sup>. Hierbei ist unter anderem Spaltung einer Bindung eingetreten, die Glutamin und Asparagin, allerdings in der umgekehrten Reihenfolge -Asp(NH<sub>2</sub>)-Glu(NH<sub>2</sub>)-, miteinander verknüpft. Ferner sind vom bakteriellen Enzym alle jene Peptidbindungen der „Fraktion B“, an denen Glykokoll mit seiner Aminogruppe, Leucin mit seiner Carboxylgruppe und Tyrosin mit seiner Carboxylgruppe beteiligt sind, angegriffen worden.

Die in der Peptidkette des oxydierten Oxytocins vorkommenden zwei Cysteinsäurereste sind bei der Oxydation des Hormons mit Perameisensäure aus den zwei Hälften eines einzigen Cystinrestes hervorgegangen. Es folgt daraus, daß das oxytocische Hormon durch eine einzige Peptidkette, die durch die Schwefelatome der zwei halben Cystinreste (CyS) in die Form einer Schleife zusammengebunden ist, wiedergegeben werden muß:



Vor kurzem beschrieben *Acher, Chauvet* und *Fromageot* die chromatographische Trennung und Charakterisierung einiger Peptide aus einem Säurehydrolysat des Vasopressins<sup>26</sup>. Aus deren Natur folgern die Autoren die Anwesenheit einer Aminosäurefolge Pro-Arg-Gly-Glu in diesem

<sup>26</sup> *R. Acher, J. Chauvet* und *P. Fromageot*, *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 471 (1952).

1020 H. Tuppy u. H. Michl: Über die chemische Struktur des Oxytocins.

ebenfalls aus Rinderhypophysen isolierten Hormon. Ein Vergleich dieser Sequenz mit der Struktur des Oxytocins läßt erkennen, daß sich die beiden Hypophysenhinterlappenhormone trotz ihrer ähnlichen Zusammensetzung voneinander in der Reihenfolge der Aminosäurereste beträchtlich unterscheiden müssen.

Dieser Arbeit kam eine Zuwendung zugute, welche die *Rockefeller Foundation* dem Vorstand des II. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien, Herrn Prof. *F. Wessely*, zur Unterstützung der unter seiner Leitung ausgeführten Arbeiten gewährt hat. Wir danken hierfür sowie für die Hilfe, die wir von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften aus den Mitteln der *Seegen-Stiftung* erhalten haben.