



Doctoral Thesis

## Untersuchungen über die Organisation der Information in $\alpha$ -Melanotropin und Synthese von spezifisch markierten Analogen zur Rezeptorisolierung

**Author(s):**

Eberle, Alex Niklaus

**Publication Date:**

1976

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000081089> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Untersuchungen über die  
Organisation der Information in  $\alpha$ -Melanotropin  
und Synthese von  
spezifisch markierten Analogen zur Rezeptorisolierung**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung  
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von  
**ALEX NIKLAUS EBERLE**  
Dipl. Naturwissenschaftler ETH  
geboren am 9. November 1945  
von St.Gallen

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. R. Schwyzer, Referent  
Prof. Dr. H. Zuber, Korreferent



Polydruck AG, Spreitenbach  
Druckerei und Verlag  
1976

## ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

---

### 12.1. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der gegenwärtige Stand der Kenntnisse über Struktur, Sekretion und physiologische Bedeutung von  $\alpha$ -Melanotropin wurde im Rahmen einer grossen Uebersichtsarbeit, welche mehrere hundert Originalpublikationen berücksichtigt, neu dargestellt. Dabei wurde aufgezeigt, dass  $\alpha$ -MSH nicht ausschliesslich ein Pigmentzellen steuerndes Hormon niederer Wirbeltiere ist, sondern dass es auch bei Säugetieren eine dermatrope und neurotrope Funktion besitzt.
2. Die biologischen Testsysteme von  $\alpha$ -MSH wurden miteinander verglichen, und der In-vitro-Froschtest wurde modifiziert, um höheren Anforderungen bezüglich Reproduzierbarkeit zu genügen.
3. Es wurde ein neuer Radioimmunoassay für  $\alpha$ -MSH aufgestellt, und zwar durch Immunisieren von Kaninchen mit Hilfe eines Albumin- $\alpha$ -MSH-Komplexes mit definierter Hormon-Proteinbindung ( $\rightarrow$  Antigen mit Exponierung der  $\alpha$ -MSH-Spezifitäten: N <sup>$\alpha$</sup> -Acetylserin --- Valinamid). Es resultierten hochtitrige Antiseren (1 : 100'000 - 1 : 1'000'000) mit sehr guter Spezifität für  $\alpha$ -MSH (keine Kreuzreaktion mit allen bekannten Peptidhormonen, inklusive  $\beta$ -MSH; Kreuzreaktion mit ACTH nur  $\sim$ 0,1%).
4. 60 neue  $\alpha$ -MSH-Analoga und -Fragmente wurden synthetisiert und auf ihre melantrope Aktivität hin untersucht. Die Resultate liessen den Schluss zu, dass neben der bisher bekannten Befehlssequenz -Glu-His-Phe-Arg-Trp- auch dem C-ter-

minalen Rest -Gly-Lys-Pro-Val·NH<sub>2</sub> die Eigenschaft einer zweiten Befehlssequenz zufällt, welche unabhängig von der ersten den Stimulus auslösen kann. Der N-terminale Teil von α-MSH trägt demgegenüber viel weniger zur biologischen Aktivität des Hormons bei; doch vermindern lipophile Modifikationen in diesem Bereich die Potenz des Hormones stärker als das Fehlen der entsprechenden Reste. Für die Stimulierung des Melanozyten-α-MSH-Rezeptors sind nicht dieselben Aminosäurereste wichtig wie für die Stimulierung des Hirnzellen-α-MSH-Rezeptors oder des Adipozyten-ACTH-Rezeptors. Im ersten Fall liegt das Schwergewicht des Informationsgehaltes bei -Phe-Arg- und -Lys-Pro-Val-, im zweiten bei -Met-Glu-His-Phe- und im dritten im Sequenzbereich (5-10), wobei besonders das Tryptophan<sup>9</sup> eine wesentliche Rolle spielt. Aus diesen Daten liess sich ein erstes grobes Schema zur Organisation der Information in α-MSH ableiten.

5. Zwei α-MSH-Albumin-Komplexe mit eindeutig definierter, kovalenter Bindung zwischen Hormon und Protein wurden hergestellt und gereinigt. Die biologische Aktivität dieses makromolekular gebundenen α-MSH von  $\sim 10^7$  U/mMol ist ein starker Hinweis dafür, dass der MSH-Rezeptor auf der Membranaussenseite der Melanophoren lokalisiert ist.
6. Die Synthese von α-MSH wurde überarbeitet und mit Hilfe einer neuen, basenlabilen Aminoschutzgruppe wesentlich verbessert. Zugleich wurde die Eignung von 3',5'-Dijodtyrosin als tritierbarer Aminosäurerest im Rahmen dieser Synthese mit Erfolg getestet.
7. Drei radioaktiv markierte (tritierte) α-MSH-Analoga mit (Photo-)Affinitätsmarkergruppen wurden synthetisiert, nämlich N<sup>α</sup>-Bromacetyl- und N<sup>α</sup>-Diazoacetyl-α-MSH (Tritium auf Tyrosin<sup>2</sup>, d.h. Affinitäts- und radioaktiver Label getrennt) und ein α-MSH-Derivat mit tritierterm p-Azidophenylalanin ([ala<sup>1</sup>,Pap(t<sub>2</sub>)<sup>2</sup>,Nva<sup>4</sup>]-α-MSH: Tritium und Photolabel auf demselben Rest). Spezifische Aktivitäten: 10-30 Ci/mMol. Biologische Aktivitäten: 5-10% α-MSH-Aktivität.
8. Für Fluoreszenzpolarisationsuntersuchungen wurden Dansylserin<sup>1</sup>-α-MSH und N<sup>ε</sup>-Dansyllysin<sup>11</sup>-α-MSH hergestellt, das erste zusätzlich mit 3',5'-Dijodtyrosin<sup>2</sup> für eine Tritium-Fluoreszenz-Doppelmarkierung.
9. Die Radiojodierung von α-MSH mit allen gebräuchlichen Methoden wurde eingehend getestet, und [<sup>125</sup>I]-α-MSH wurde mit einer spezifischen Aktivität von  $\sim 1000$  Ci/

mMol hergestellt. Als beste Methode erwies sich die Jodierung mit Lactoperoxidase.

## 12.2. AUSBLICK

Die synthetische Zielsetzung nach Figur 4 (eingerahmt links) ist weitgehend erfüllt, weshalb die biologischen Arbeiten nun intensiviert werden können. Dabei ergeben sich aus dem weitgesteckten Rahmen (Figur 4, rechts) kurzfristig die folgenden Schwerpunkte:

- 1) Kulturen von Melanomzellen zum Studium von  $\alpha$ -MSH-Rezeptor-Interaktionen (besonders hinsichtlich Affinitätsmarkierung). Eventuell könnte der isolierte Antikörper in diese Studien miteinbezogen werden (s. unten).
- 2) Synthese von pharmakologisch interessanten  $\alpha$ -MSH-Analogen und -Fragmenten, insbesondere im Hinblick auf die Suche nach einem  $\alpha$ -MSH-Antagonisten und besseren Morphin-Agonisten.
- 3) Neue Synthesewege zur rationelleren Herstellung von Peptiden wie  $\alpha$ -MSH.
- 4) Ausbau des Radioimmunoassay zur routinemässigen Anwendung; eventuell Produktion grosser Mengen von hochspezifischen  $\alpha$ -MSH-Antikörpern und Isolierung ( $\rightarrow$  potentielle Rezeptoren). Ferner wäre ein weiteres biologisches Testsystem (z.B. *Anolis carolinensis*) sehr wertvoll.
- 5) Konformations- und Bindungsstudien mit fluoreszierenden und radioaktiven ( $[^3\text{H}]$ ,  $[^{125}\text{I}]$ ) Derivaten von  $\alpha$ -MSH.