



Doctoral Thesis

Untersuchungen über die Organisation der Information in α -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 α -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 α -Melanotropin wurde im Rahmen einer grossen Uebersichtsarbeit, welche mehrere hundert Originalpublikationen berücksichtigt, neu dargestellt. Dabei wurde aufgezeigt, dass α -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 α -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 α -MSH aufgestellt, und zwar durch Immunisieren von Kaninchen mit Hilfe eines Albumin- α -MSH-Komplexes mit definierter Hormon-Proteinbindung (\rightarrow Antigen mit Exponierung der α -MSH-Spezifitäten: N ^{α} -Acetylserin --- Valinamid). Es resultierten hochtitrige Antiseren (1 : 100'000 - 1 : 1'000'000) mit sehr guter Spezifität für α -MSH (keine Kreuzreaktion mit allen bekannten Peptidhormonen, inklusive β -MSH; Kreuzreaktion mit ACTH nur \sim 0,1%).
4. 60 neue α -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·NH₂ 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 Tryptophan⁹ 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^α-Bromacetyl- und N^α-Diazoacetyl-α-MSH (Tritium auf Tyrosin², d.h. Affinitäts- und radioaktiver Label getrennt) und ein α-MSH-Derivat mit tritiiertem p-Azidophenylalanin ([ala¹,Pap(t₂)²,Nva⁴]-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 Dansylserin¹-α-MSH und N^ε-Dansyllysin¹¹-α-MSH hergestellt, das erste zusätzlich mit 3',5'-Dijodtyrosin² für eine Tritium-Fluoreszenz-Doppelmarkierung.
9. Die Radiojodierung von α-MSH mit allen gebräuchlichen Methoden wurde eingehend getestet, und [¹²⁵I]-α-MSH wurde mit einer spezifischen Aktivität von ~ 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 α -MSH-Rezeptor-Interaktionen (besonders hinsichtlich Affinitätsmarkierung). Eventuell könnte der isolierte Antikörper in diese Studien miteinbezogen werden (s. unten).
- 2) Synthese von pharmakologisch interessanten α -MSH-Analogen und -Fragmenten, insbesondere im Hinblick auf die Suche nach einem α -MSH-Antagonisten und besseren Morphin-Agonisten.
- 3) Neue Synthesewege zur rationelleren Herstellung von Peptiden wie α -MSH.
- 4) Ausbau des Radioimmunoassay zur routinemässigen Anwendung; eventuell Produktion grosser Mengen von hochspezifischen α -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 α -MSH.