



universität
wien

DISSERTATION / DOCTORAL THESIS

Titel der Dissertation /Title of the Doctoral Thesis

„Synthese und Testung neuer
Melanocortin-1-Rezeptor-Agonisten“

verfasst von / submitted by

Mag.pharm. Elisabeth Wurzer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

Wien, 2018 / Vienna 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on the student
record sheet:

A 796 610 449

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt /
field of study as it appears on the student record sheet:

Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr. Martin Kratzel

"FORSCHUNG IST DIE KUNST, DEN NÄCHSTEN SCHRITT ZU TUN."

KURT LEWIN (1890 – 1947), DEUTSCH-AMERIKANISCHER PSYCHOLOGE

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie der Medizinischen Universität Wien im Zeitraum von Oktober 2012 bis Juni 2017 durchgeführt.

Als Erstes möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Betreuer ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Kratzel bedanken. Er hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit mit viel Freiheit zu planen und durchzuführen, sondern mir auch durch die Beschäftigung als Program Manager in den Universitätslehrgängen „Pharmazeutisches Qualitätsmanagement“ einen neuen Aspekt der Pharmazie gezeigt, den ich sehr zu schätzen gelernt habe.

Weiters danke ich ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Hohenegger, der mich herzlichst in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat und stets Zeit für interessante Diskussionen hatte, sei es zu Ergebnissen meiner Versuche oder zu denen der Fußball-EM. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Christine Wasinger, die mir die Zellkultur wieder näher gebracht hat und Shahrooz Nasrollahi Shirazi, MSc, der auch in schier endlosen Stunden an cAMP-Experimenten nie die Geduld mit mir verloren und mich dabei sogar noch zum Lachen gebracht hat. Zusätzlich möchte ich mich beim gesamten Institut für Pharmakologie der Medizinischen Universität Wien für die freundliche, respektvolle und kollegiale Arbeitsumgebung bedanken.

Ein großer Dank gebührt auch ao. Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban für die Messung und anschließende gemeinsame Auswertung von NMR-Daten. Seine Begeisterung dafür diese Spektrenrätsel zu lösen war nicht nur ansteckend, sondern auch lehrreich und ermöglichte es mir, diese Techniken selbstständig anzuwenden.

Ao. Univ.-Prof. Dr. Claudia Valenta und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Kooperation zur Durchführung der Hautstudien und ebenso für die vielen gemeinsamen Mittagessen, die eine willkommene Abwechslung zum Labor- und Büroalltag waren. Ein besonderer Dank gilt hier Mag. Astrid Pany, die mir mit ihrer fachlichen Kompetenz eine große Hilfe war und als meine Kollegin und Büronachbarin stets ein offenes Ohr für alle Probleme hatte.

Für ihren steten Rat und ihre Hilfe bei allen Analytikproblemen möchte ich Dr. Judith Wackerlig danken, die auch in stressigen Situationen immer eine Antwort auf meine Fragen gefunden hat. Daniel Dobusch, MSc danke ich für die Messung der hochauflösenden Massenspektren.

Ein ganz neues Gebiet konnte mir Dr. Thomas Seidel näher bringen, sodass ich einen Einblick in die Methoden des Molecular Modelling gewinnen konnte, vielen Dank dafür. Gökhan Ibis, MSc danke ich besonders für den steten „Tech-Support“ und die großartige Hilfe mit allen in silico-Programmen.

Allen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet und mehr oder weniger oft von Freud und Leid der wissenschaftlichen Arbeit zu hören bekommen haben, danke ich für ihre Geduld beim Zuhören und ihre aufmunternden Worte. Besonders möchte ich mich bei Dr. Katharina Zakovsek und Dr. Stefan Brenner bedanken, die für mich beide sowohl Leidensgenossen als auch Vorbilder waren.

Meiner Familie danke ich von Herzen für die Unterstützung, die sie mir in all den Jahren gegeben hat, auch wenn nicht immer ganz klar für sie war, was ich denn da so wirklich im Labor treibe. Dennoch haben mir die oft kritischen Worte und auch die Sicht von außen viel dabei geholfen, so weit zu kommen.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann Martin, der mich mit abwechselnd aufbauenden Worten und ungewöhnlichen Fragen dazu brachte, nie mein Ziel aus den Augen zu verlieren. Danke für die vielen Gespräche, die Schulter zum Anlehnen und das Stärken meines Rückens, auch wenn ich selbst an mir gezweifelt habe.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1 EINLEITUNG | 5 |
| 1.1 DIE HAUT ALLGEMEIN – AUFBAU UND FUNKTIONEN | 5 |
| 1.1.1 AUFBAU DER HAUT | 5 |
| 1.1.1.1 Epidermis | 6 |
| 1.1.1.2 Dermis | 8 |
| 1.1.1.3 Subcutis | 8 |
| 1.1.2 FUNKTIONEN DER HAUT | 9 |
| 1.2 ERKRANKUNGEN DER HAUT | 10 |
| 1.2.1 KRANKHEITEN DER HAUT UND DER UNTERHAUT DURCH STRAHLENEINWIRKUNG | 10 |
| 1.2.2 MELANOZYTENNAEVI | 11 |
| 1.2.3 BÖSARTIGE NEUBILDUNGEN DER HAUT | 12 |
| 1.2.3.1 Nicht-melanozytärer Hautkrebs | 13 |
| 1.2.3.2 Malignes Melanom | 13 |
| 1.3 MELANOCORTIN-SYSTEM UND HAUTBRÄUNUNG | 14 |
| 1.4 AKTIVE LIGANDEN AM MC1R | 16 |
| 1.5 GRUNDLAGEN DER TOPISCHEN/TRANSDERMALEN APPLIKATION VON ARZNEISTOFFEN | 18 |
| 2 ZIELSETZUNG | 21 |
| 3 MATERIAL | 23 |
| 3.1 ORGANISCHE SYNTHESE UND PEPTIDSYNTHESE | 23 |
| 3.1.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN | 23 |
| 3.1.2 GERÄTE | 23 |
| 3.2 ANALYTIK | 23 |
| 3.2.1 DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAPHIE/SÄULENCHROMATOGRAPHIE | 23 |
| 3.2.2 HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC) | 23 |
| 3.2.3 MASSENSPEKTROMETRIE (MS) | 25 |
| 3.2.4 KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR) | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 ZELLKULTUR | 25 |
| 3.3.1 ZELLINIEN | 25 |
| 3.3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN | 26 |
| 3.4 BIOLOGISCHE TESTUNGEN | 26 |
| 3.4.1 TESTKITS | 26 |
| 3.4.2 PRIMER | 26 |
| 3.4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN | 27 |
| 3.4.4 PUFFER-REZEPTE | 27 |
| 3.4.5 GERÄTE | 28 |
| 3.5 TAPE STRIPPING | 29 |
| 3.6 FRANZ-DIFFUSIONSZELL-VERSUCHE | 29 |
| 3.7 DATENANALYSE | 29 |
| 3.7.1 MASSENSPEKTROMETRIE | 29 |
| 3.7.2 KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE | 30 |
| 3.7.3 HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE | 30 |
| 3.7.4 BIOLOGISCHE TESTUNGEN | 30 |
| 3.7.4.1 PCR | 30 |
| 3.7.4.2 cAMP assays | 30 |
| 3.7.4.3 Proliferationsassay | 31 |
| 3.7.5 IN SILICO STUDIEN | 31 |
| 3.7.6 HAUTSTUDIEN | 31 |
| 3.7.6.1 Tape Stripping | 32 |
| 3.7.6.2 Franz-Zell-Experimente | 32 |
| 4 METHODEN | 33 |
| 4.1 PEPTIDSYNTHESE | 33 |
| 4.1.1 GENERELLES ARBEITEN AM FESTPHASENPEPTIDSYNTHESIZER | 33 |
| 4.1.2 ANKOPPLUNG DER ERSTEN AMINOSÄURE AN DAS HARZ | 33 |
| 4.1.3 ABSCHÄTZUNG DER HARZBELADUNG | 34 |
| 4.1.4 ENDCAPPING | 35 |
| 4.1.5 ABSPALTUNG DER FMOC-SCHUTZGRUPPE | 35 |
| 4.1.6 KOPPLUNG WEITERER AMINOSÄUREN | 36 |
| 4.1.7 KAISER-TEST | 36 |
| 4.1.8 ABSPALTUNG VOM HARZ | 36 |
| 4.2 ANALYTIK | 37 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.2.1 | HPLC-METHODEN | 37 |
| 4.2.1.1 | Analytische Methoden | 37 |
| 4.2.1.2 | Präparative Methoden | 40 |
| 4.2.2 | NMR-EXPERIMENTE | 40 |
| 4.2.3 | MASSENSPEKTROMETRIE | 40 |
| 4.3 | ZELLKULTUR | 41 |
| 4.3.1 | KULTIVIERUNG DER ZELLEN | 41 |
| 4.3.2 | PASSAGIEREN | 41 |
| 4.3.3 | ZELLZAHLBESTIMMUNG UND AUSSAAT | 41 |
| 4.3.4 | EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON VORRATSALIQUOTEN | 42 |
| 4.4 | BIOLOGISCHE TESTUNGEN | 42 |
| 4.4.1 | MRNA ISOLIERUNG | 42 |
| 4.4.2 | UMSCHREIBEN DER MRNA IN CDNA | 42 |
| 4.4.3 | POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) | 43 |
| 4.4.4 | AGAROSE-GELELEKTROPHORESE | 43 |
| 4.4.5 | cAMP ASSAYS | 43 |
| 4.4.5.1 | Herstellung der Säulen | 44 |
| 4.4.5.1 | Regeneration der Säulen | 45 |
| 4.4.6 | PROLIFERATIONSASSAYS | 45 |
| 4.5 | TAPE STRIPPING | 46 |
| 4.6 | FRANZ-ZELL-VERSUCHE | 47 |
| 4.7 | IN SILICO STUDIEN | 47 |
| 4.7.1 | FILTERN DER LIGANDEN, EXTRAKTION VON LIGANDEN | 47 |
| 4.7.2 | CLUSTERN VON LIGANDEN | 48 |
| 4.7.3 | ERSTELLUNG VON PHARMAKOPHOREN | 48 |
| 5 | HAUPTTEIL | 49 |
| 5.1 | SYNTHESE VON MODIFIZIERTEN AMINOSÄUREBAUSTEINEN | 49 |
| 5.1.1 | MODIFIKATION VON HISTIDIN | 49 |
| 5.1.2 | ALKYLIERUNG VON TYROSIN | 51 |
| 5.1.3 | VARIATIONEN AN DER PHENYLPIPERIDINCARBONSÄURE | 52 |
| 5.1.2.1 | One-pot-Syntheserversuche | 55 |
| 5.1.2.2 | Zweistufige Syntheserversuche | 57 |
| 5.1.2.3 | Dreistufige Synthesen | 59 |
| 5.2 | PEPTIDSYNTHESE VON MUTMÄBLICHEN LIGANDEN | 63 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 5.3 | AUFBAU EINES SYSTEMS ZUR BIOLOGISCHEN TESTUNG DER PEPTIDE | 66 |
| 5.3.1 | PCR DER FÜNF MELANOCORTINREZEPTOREN | 67 |
| 5.3.2 | ETABLIERUNG EINES CAMP-ASSAYS | 72 |
| 5.3.3 | KONZENTRATIONSABHÄNGIGE STIMULATION DURCH NDP-MSH | 75 |
| 5.4 | BIOLOGISCHE TESTUNG VON EEKE, EEDCK, EGGSVES UND HFRW | 78 |
| 5.5 | SYNTHESE UND VERGLEICH DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON D- UND L-AMINOSÄUREN IN POSITION 2 | 80 |
| 5.6 | AUSTAUSCH DER POSITIONEN 1, 3 UND 4 DURCH NATÜRLICHE AMINOSÄUREN | 85 |
| 5.7 | IN SILICO-STUDIEN ZUR WEITEREN CHARAKTERISIERUNG DER LIGANDEN-MC1R- INTERAKTION | 88 |
| 5.8 | EINBAU VON VARIATIONEN DER NATÜRLICHEN AMINOSÄUREN | 94 |
| 5.8.1 | STRATEGIE ZUM ERSATZ EINZELNER POSITIONEN DURCH SYNTHETISCHE AMINOSÄUREN | 95 |
| 5.8.2 | BIOLOGISCHE TESTUNG DER PEPTIDE | 98 |
| 5.9 | PROLIFERATIONSASSAY DER PEPTIDE | 100 |
| 5.10 | HAUTSTUDIEN | 102 |
| 5.10.1 | ERSTELLUNG EINES ANALYSESYSTEMS | 103 |
| 5.10.2 | TAPE STRIPPING EXPERIMENTE | 104 |
| 5.10.3 | FRANZ-DIFFUSIONSZELLEN EXPERIMENTE | 106 |
| 6 | DISKUSSION UND AUSBLICK | 109 |
| <hr/> | | |
| 6.1 | SYNTHESE VON AMINOSÄUREBAUSTEINEN | 109 |
| 6.2 | SYNTHESE VON OLIGOPEPTIDEN | 110 |
| 6.3 | BIOLOGISCHE TESTUNGEN | 112 |
| 6.4 | HAUTPENETRATION UND –PERMEATION VON HFRW | 114 |
| 7 | EXPERIMENTELLER TEIL | 117 |
| <hr/> | | |
| 7.1 | ORGANISCHE SYNTHESE | 117 |
| 7.1.1 | 1-BENZYLOXYCARBONYL-4-PHENYLPYRIDIN-4-CARBONSÄURE | 117 |
| 7.1.2 | 1-(TERT-BUTOXYCARBONYL)-4-PHENYLPYRIDIN-4-CARBONSÄURE | 118 |
| 7.1.3 | N-METHOXY-N-METHYL-1H-IMIDAZOL-1-CARBOXAMID | 119 |
| 7.1.4 | 1-[METHOXY-(METHYL)CARBAMOYL]-3-METHYL-1H-IMIDAZOL-3-IUMIODID | 120 |
| 7.1.5 | 1-(TERT-BUTOXYCARBONYL)-4-[METHOXY(METHYL)CARBAMOYL]-4-PHENYL-PIPERIDINSÄUREAMID | 121 |
| 7.1.6 | O-METHYL-BOC-TYROSIN | 122 |
| 7.2 | PEPTIDSYNTHESE | 123 |
| 7.2.1 | GLU-GLU-LYS-GLU (EEKE) | 124 |
| 7.2.2 | GLU-GLU-ASP-CYS-LYS (EEDCK) | 126 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 7.2.3 | GLU-GLY-GLY-SER-VAL-GLU-SER (EGGSVES) | 128 |
| 7.2.4 | HIS-PHE-ARG-TRP (HFRW) | 130 |
| 7.2.5 | HIS-D-PHE-ARG-TRP (HFRW) | 132 |
| 7.2.6 | HIS-TYR-ARG-TRP (HYRW) | 134 |
| 7.2.7 | HIS-D-TYR-ARG-TRP (HYRW) | 136 |
| 7.2.8 | LYS-D-PHE-ARG-TRP (KFRW) | 138 |
| 7.2.9 | HIS-D-PHE-LYS-TRP (HFKW) | 140 |
| 7.2.10 | HIS-D-PHE-ARG-TYR (HFRY) | 142 |
| 7.2.11 | PAL-D-PHE-ARG-TRP (PAL-FRW) | 144 |
| 7.2.12 | THA-D-PHE-ARG-TRP (THA-FRW) | 146 |
| 7.2.13 | HIS-D-PHE-CIT-TRP (HF-CIT-W) | 148 |
| 7.2.14 | HIS-D-PHE-TRP (HFW) | 150 |
| 7.2.15 | HIS-D-PHE-ARG-IGL (HFR-IGL) | 152 |
| 7.2.16 | HIS-D-PHE-ARG-ALA(BTH) (HFR-ALA(BTH)) | 154 |
| 7.3 | IN SILICO-STUDIEN | 156 |
| 7.3.1 | AGONISTEN AM MC1R, DIE FÜR DIE BERECHNUNG DER PHARMAKOPHORE VERWENDET WURDEN | 156 |
| 7.3.2 | PHARMAKOPHORE DER CLUSTER 2 BIS 9 | 165 |
| 7.3.3 | ANTAGONISTEN AM MC1R UND DEREN PHARMAKOPHOR | 169 |
| 7.3.4 | ALIGNMENTS DER CLUSTER 2 BIS 9 MIT HFRW | 170 |
| 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 175 |
| 9 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 177 |
| 10 | TABELLENVERZEICHNIS | 181 |
| 11 | REFERENZEN | 183 |

Zusammenfassung

Der körpereigene Schutz gegen schädliche UV-Strahlung, die Hautbräunung, ist an einen Mechanismus gebunden, der erst nach initialer Schädigung aktiviert wird und für zukünftige Expositionen Vorsorge generiert. Eine der gefährlichsten Folgen von UV-Strahlung ist das Entstehen von Karzinomen auf der Haut, wobei vor allem das metastasierende Melanom die gravierendsten Konsequenzen verursacht und aufgrund noch unzureichender Therapien eine der geringsten Überlebensraten aller Krebsarten aufweist.

Daher ist es von großem Interesse eine Prophylaxe für diese Krankheitsbilder zu finden, sodass deren Entstehung vermieden werden kann. Ein Schlüsselhormon in der Hautbräunung ist das α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH), welches durch Bindung an den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) den Signalweg zur Bildung von Eumelanin, dem braunen Hautfarbstoff, aktiviert.

Die vorliegende Arbeit ist als Einstieg in ein neues Arbeitsgebiet gedacht, wobei folgende Arbeitsfelder definiert wurden:

- Synthese simplifizierter Peptide, ausgehend von der Struktur des α -MSH, unter Einbindung von Methoden des Molecular Modelling
- Aufbau eines Systems zur biologischen Testung der synthetisierten Peptide
- Testung der Hautpermeation der synthetisierten Peptide

Ausgehend vom Tetrapeptid His-Phe-Arg-Trp wurden 15 verschiedene Peptide synthetisiert, die in biologischen Testreihen auf ihre Aktivität am MC1R geprüft wurden. Die potentiellen Modifikationsstellen an den einzelnen Aminosäuren wurden durch Pharmakophormodelle ermittelt, indem Muster von chemischen Eigenschaften, die für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich sind, analysiert und quantifiziert wurden. Nach Etablierung eines Testsystems, bei dem die Menge an cAMP gemessen wird, das durch die Bindung eines Liganden an den MC1R von der Zelle produziert wird, konnte das Tetrapeptid His-D-Phe-Arg-Trp als Agonist identifiziert werden. Um eine mögliche Anwendung an der Haut zu untersuchen, wurden Tape Stripping- und Franz-Zell-Versuche mit wässrigen Lösungen des Peptids durchgeführt. Die Tape Stripping-Versuche zeigten eine durchschnittliche Eindringtiefe des Peptids in das Stratum corneum von 61,3 %. In Franz-Zell-Experimenten mit porziner Abdominalhaut konnten nach acht Stunden Inkubationszeit durchschnittlich 78,8 % des Peptids durch die Epidermis permeieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Peptide wie His-D-Phe-Arg-Trp unter geeigneten Bedingungen durchaus zur Hautpermeation befähigt sind und dadurch auch topisch appliziert werden

können. Dies könnte in Zukunft neue Wege zur Prävention von Hautkrebs durch Aktivierung der körpereigenen Hautbräunung eröffnen. Die Optimierung der Liganden wird Thema zukünftiger Arbeiten sein.

Abstract

The human body has its own mechanism to cope with the harmful effects of UV-irradiation, the tanning of the skin, yet this shield is only activated after an initial exposition and therefore can only prevent further damage. Skin carcinomas are the most dangerous effects of UV-irradiation, including the malignant melanoma which has one of the lowest survival rates in cancer due to limited therapy options.

Therefore, it is of great interest to search for prevention strategies for these diseases in order to avert their genesis. A key player in skin tanning is α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), which, by binding to the melanocortin-1-receptor (MC1R), activates the cellular pathway for the formation of eumelanin, the brown skin pigment.

This thesis was designed to present a starting point in a new field of research, defining the following areas:

- Synthesis of simplified peptides, beginning at the known sequence of α -MSH, with an implication of methods of molecular modelling
- Establishment of a biological test system to evaluate the activity of the synthesized peptides
- Testing of the skin permeation of the synthesized peptides

Beginning with a tetrapeptide (His-Phe-Arg-Trp) 15 different peptides have been successfully synthesized and subsequently biologically tested for their activity at the MC1R. The potential modifications of the amino acids have been determined via pharmacophore modelling, by analysis and quantification of the pattern of chemical properties. A biological test system for the quantification of cyclic AMP, generated by the activation of the MC1R, was established and used for the evaluation of the newly synthesized peptides. The tetrapeptide His-D-Phe-Arg-Trp was identified as an agonist at the MC1R and thus subjected to further testing. Tape stripping and Franz type diffusion cell experiments have been performed with an aqueous solution of the peptide in order to investigate a potential topical application. The tape stripping assays revealed a mean penetration depth of 61,3 % of the stratum corneum. In the Franz type diffusion cell experiments with porcine abdominal skin a mean permeation through the epidermis of 78,8 % was measured.

In summary peptides like His-D-Phe-Arg-Trp might be capable of skin permeation, given the appropriate conditions and could therefore be eligible for topical application. This could show new ways of prevention strategies for skin cancer in the future via the activation of the endogenous protection, skin tanning. Optimisation of ligands for the MC1R will be topic for future investigations.

1 Einleitung

1.1 Die Haut allgemein – Aufbau und Funktionen

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und erfüllt eine Reihe von wichtigen Aufgaben. Sie ist die erste Barriere, die den Körper vor Schädigungen schützt, seien es chemische oder mechanische, und das Eindringen von Mikroorganismen verhindert. Zusätzlich ist sie ein wichtiger Bestandteil in der Thermoregulation, erfüllt endokrine Funktionen und spielt als Sinnesorgan eine große Rolle in der Perzeption der Umwelt. Doch nicht nur physiologische Faktoren machen die Haut zu einem essentiellen Bestandteil des menschlichen Körpers, sie gibt auch jedem Menschen sein eigenes Aussehen und bestimmt so die optische Wahrnehmung durch andere Personen. Aus diesen Gründen ist die Haut nicht nur für die medizinische Forschung, sondern auch für die kosmetische Industrie von großem Interesse und bietet ein enormes Entwicklungspotential für neue Wirkstoffe.^{3,4}

1.1.1 Aufbau der Haut

Grundsätzlich besteht die menschliche Haut aus drei Schichten, der Epidermis, der Dermis und der Hypodermis. Je nach der Lokalisation an verschiedenen Körperstellen sind die Schichten unterschiedlich weit spezialisiert, da sie – zum Beispiel in Bezug auf die Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen – ungleiche Anforderungen erfüllen müssen. Die Epidermis oder Oberhaut hat als äußerste Schicht die wichtige Aufgabe, den Körper vor schädlichen Einflüssen zu schützen. Als mittlere Schicht stellt die Dermis (Lederhaut) den größten Teil der mechanischen Festigkeit dar und ist dadurch der Grund für die hohe Elastizität der Haut. In der Hypodermis oder Subcutis (Unterhaut) als innerster Schicht finden sich große Taschen von Fettgewebe, welche als Isolation für die Thermoregulation zuständig sind.⁵ In Abbildung 1 wird eine schematische Darstellung der einzelnen Hautschichten gezeigt, die Dicke der Schichten ist in μm angegeben und variiert sowohl zwischen einzelnen Individuen als auch an verschiedenen Stellen des Körpers.

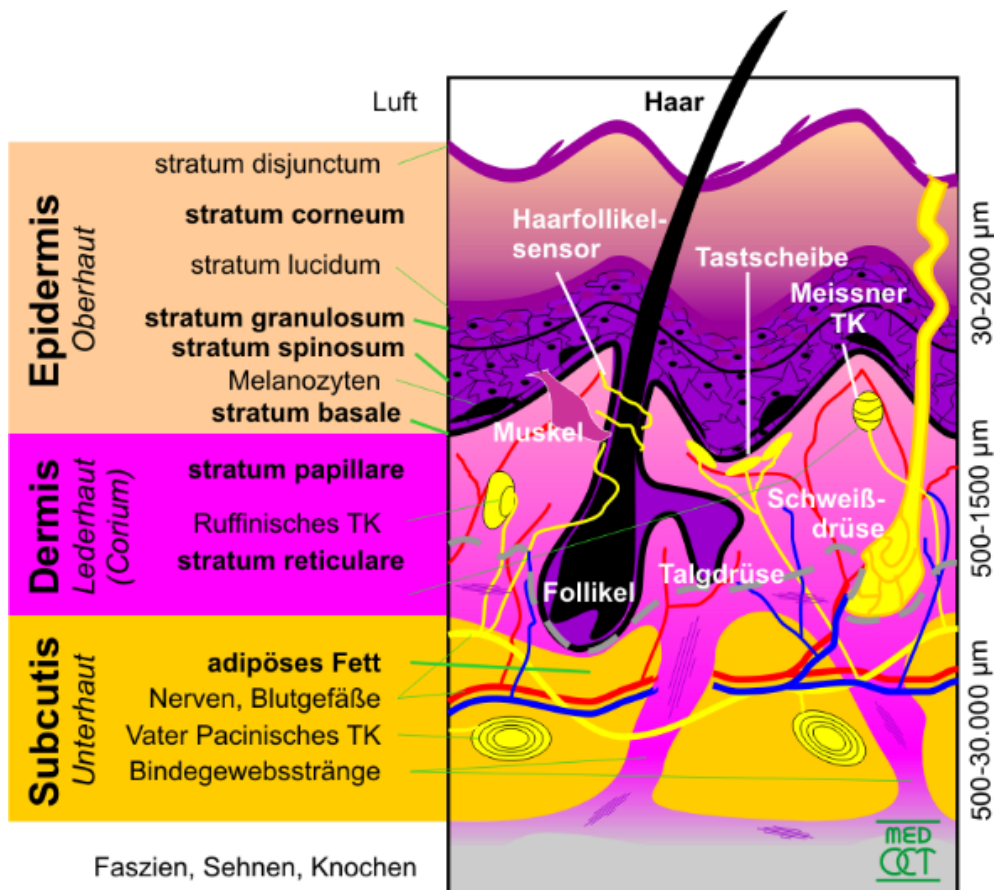


Abb. 1 Aufbau der menschlichen Haut und ihrer drei Schichten

Die menschliche Haut wird grob in drei Ebenen eingeteilt, die Oberhaut (Epidermis), die Lederhaut (Dermis oder Corium) und die Unterhaut (Subcutis oder Hypodermis). Jede der Schichten beinhaltet spezifische Elemente, die verschiedenste Funktionen erfüllen und gemeinsam eine Barriere gegenüber der Außenwelt bilden.

Bild unverändert übernommen von <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:HautAufbau.png&filetimestamp=20050828141444>, medOCT-group im Zentrum für Medizinische Physik und Biomedizinische Technik, Medizinische Universität Wien, lizenziert durch CreativeCommons-Lizenz by-sa-2.0.

1.1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist die erste Barriere zwischen der Umwelt und dem menschlichen Körper, daher ist ihre größte Aufgabe auch der Schutz vor äußeren Einflüssen. Sie wird unterteilt in vier Schichten, das Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum, wobei diese Aufzählung den Aufbau von innen nach außen beschreibt. Der Großteil der Epidermis besteht aus Keratinozyten (ca. 95%), welche keine vaskuläre Versorgung haben und nach außen hin kontinuierlich abgeschilfert werden.³ Die Keratinozyten durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien und Differenzierungen in den einzelnen Schichten und produzieren zusätzlich Strukturproteine und Lipide, die den Zusammenhalt gewährleisten. Vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum sind sie lebende, kernhaltige Zellen, die durch Tight junctions und Desmosome miteinander verbunden sind.

Der Übergang zum Stratum corneum ist jedoch geprägt von einer starken strukturellen Änderung, in der Keratinozyten zu flachen, kernlosen und schuppigen Zellen werden, die durch Keratinfilamente verbunden und von Hüllproteinen und Lipiden umgeben sind.⁶

Die innerste Schicht, das Stratum basale, besteht aus einer einzelnen Schicht von epidermalen Stammzellen, aus denen ständig neue Zellen vermehrt werden. Diese Stammzellen sind die einzigen in der Epidermis, die mitosefähig sind, in den äußeren Schichten findet später nur mehr eine Differenzierung statt.⁷ Im Stratum basale sind die Keratinozyten hexagonal geformt, wodurch die Zellen sehr effizient nebeneinander angeordnet sind.⁵

Auf ihrem Weg nach außen verändern die Keratinozyten ihre Form und bekommen im Stratum spinosum ein polyhedrisches Aussehen.⁶ In dieser Schicht können in den Zellen lipidreiche lamelläre Granula (Odland bodies) gefunden werden, die in weiterer Folge für die Lipidsynthese verantwortlich sind.

Im Stratum granulosum werden die Keratinozyten flacher und länger und produzieren nun größere Mengen an Keratin. Zusätzlich dazu werden in den Odland bodies auch vermehrt Lipide gebildet, die beim Übergang zum Stratum corneum ausgeschüttet werden. Der Übergang zwischen diesen beiden Schichten ist besonders interessant, da es hier zu einer Reihe von Prozessen kommt, die alle gemeinsam der Verhornung der obersten Hautschicht dienen. Dabei gehen unter anderem der Zellkern, die Organellen und die Plasmamembran der Keratinozyten verloren, es wird eine Hornschicht um die Zellen gebildet und die Odland bodies schütten die gespeicherten Lipide aus.

Das Stratum corneum besteht nun großteils aus den enddifferenzierten Keratinozyten, die von da an als Korneozyten bezeichnet werden, und dem Inhalt der Odland bodies, welcher als Füllstoff zwischen den Zellen dient. So entsteht eine Art Ziegel-Mörtel-Struktur, die in mehreren Schichten einen dichten Schutz vor äußeren Einflüssen bildet.³ Die Korneozyten werden in den inneren Schichten von Korneodesmosomen zusammengehalten, welche am Weg an die Oberfläche schließlich graduell abgebaut werden, um eine Abschilferung der äußersten Zellen zu ermöglichen.⁸

Zusätzlich zu den Keratinozyten finden sich in der Epidermis noch weitere wichtige Zelltypen. Langerhanszellen sind immunkompetente Zellen, die einen wichtigen Teil der Immunbarriere der Haut darstellen und vorrangig bei Kontaktdermatitis agieren.⁶ Das sensorische Nervensystem der Haut wird geprägt durch Merkelzellen, die als berührungsempfindliche Zellen die ersten Signale an das Gehirn senden, wenn es zum Hautkontakt kommt.⁹ Im Stratum basale befinden sich zusätzlich noch Melanozyten, die für die Hautbräunung und damit den Schutz vor UV-Strahlung verantwortlich sind. Sie produzieren sogenannte Melanosome, die als Pigmentspeicher für Melanin dienen. Die

Melanosome werden wiederum zu den Keratinozyten transportiert, wo das gespeicherte Melanin eine Art Schild um den Zellkern aufbaut, um ihn vor UV-Strahlung zu schützen.⁶

1.1.1.2 Dermis

Über die dermalepidermale Verbindung sind die Epidermis und die Dermis miteinander verknüpft. Die kutane Basalmembranzzone bildet eine klare Abtrennung zwischen den beiden Schichten, jedoch ist sie über dermale Papillen und epidermale Ausbuchtungen von beiden Seiten gut verankert und garantiert dadurch einen ständigen Austausch von Nähr- und Signalstoffen zwischen den beiden Ebenen.^{10,11}

Die Dermis selbst kann wiederum in zwei Schichten eingeteilt werden, das Stratum papillare (äußere Schicht) und das Stratum reticulare (innere Schicht). Das Stratum papillare grenzt direkt an die kutane Basalmembran und besteht aus Bindegewebszellen, Kollagenen, elastischen Fasern und Blutkapillaren. Die Kapillaren sind ein essentieller Teil dieser Struktur, da sie auf der einen Seite die Keratinozyten der Epidermis versorgen und auf der anderen Seite die Körpertemperatur regulieren. Zusätzlich dazu befinden sich Mechanorezeptoren in dieser Schicht, die auf leichte Deformationen in der Epidermis reagieren (Meissner Korpuskel).

Im Stratum reticulare befindet sich großteils eine Mischung aus straffem Bindegewebe und groben elastischen Fasern. Auch hier treten Mechanorezeptoren auf, die einerseits auf Druck reagieren und pacinische Korpuskel genannt werden, andererseits Rezeptoren, die eine Dehnung der Haut registrieren und als Ruffini-Korpuskel bezeichnet werden. Weitere wichtige Elemente des Stratum reticulare sind die Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen, welche in dieser Ebene verankert sind.¹²

1.1.1.3 Subcutis

Die innerste Hautschicht wird Subcutis oder Hypodermis genannt und besteht zu einem großen Teil aus losem Fettgewebe, das die wichtige Aufgabe hat, als Wärmedämmung für den Körper zu agieren. Der Übergang von Dermis zu Subcutis ist nicht so klar getrennt wie zwischen Dermis und Epidermis, da es keine Basalmembran dazwischen gibt und die beiden Bindegewebearten fließend ineinander übergehen.¹² Der dominierend vorkommende Zelltyp in der Subcutis sind Adipozyten, zusätzlich dazu sind Fibroblasten und Makrophagen vorhanden. An verschiedenen Körperstellen finden sich unterschiedlich dicke Schichten an Adipozyten, welche untereinander in Lappen organisiert sind.⁵

Als unterste Hautschicht ist die Subcutis nur lose mit den anschließenden Faszien, Sehnenplatten oder Knochenhäuten verbunden und ermöglicht so ein Gleiten der Haut über die darunterliegenden Strukturen und eine gewisse Elastizität. Ein weiteres wesentliches Merkmal der Subcutis ist das ausgeprägte Kapillarsystem, welches eine rasche Aufnahme von subkutan applizierten Medikamenten wie Impfungen oder Insulin ermöglicht.¹²

1.1.2 Funktionen der Haut

Da die speziellen Funktionen der einzelnen Hautschichten bereits im vorigen Abschnitt beschrieben wurden, soll hier nochmals ein Überblick über die allgemeinen Funktionen der Haut gegeben werden. Die vermutlich wichtigste Aufgabe der Haut ist die physikalische Barriere zur Außenwelt, die den menschlichen Körper buchstäblich zusammenhält und ein Eindringen von schädlichen Einflüssen aller Art verhindert. Umgekehrt schützt die Haut den Körper davor, ungewollt Flüssigkeit zu verlieren, da das Stratum corneum wasserundurchlässig ist. Die Thermoregulation des gesamten Organismus ist ebenso eine Kernfunktion der Haut. Durch Vasokonstriktion und Vasodilatation kann die Wärmeabgabe gesteuert werden, zusätzlich erfüllt der Schweiß eine Kühlfunktion für den Körper, das subkutane Fettgewebe hingegen isoliert gegen Wärmeverlust. Wie bereits erwähnt, ist die Haut als Sinnesorgan auch ein Teil des menschlichen Wahrnehmungssystems. Freie Nervenenden und Korpuskel, die auf Druck und Zug reagieren, geben so Informationen über die Umwelt weiter. Auch die Produktion von Vitamin D als wichtigem Beitrag in der Knochenhomöostase und Melanin als Schutz vor UV-Schädigungen ist für die Haut eine essentielle Aufgabe.¹¹

Auf die Hautanhangsgebilde soll hier nur kurz eingegangen werden, es sind dies Haare und Nägel, welche unterschiedlich stark keratinisierte, epitheliale Strukturen darstellen.¹¹ Haare erfüllen beim Menschen verschiedene Zwecke, sie dienen als Schutz vor mechanischen Verletzungen, helfen dem Tastsinn die Umgebung wahrzunehmen und sind beteiligt an der Thermoregulation.¹³ Die Nägel stellen ein Analogon zu Klauen oder Hufen anderer Wirbeltiere dar und haben beim Menschen hauptsächlich die Aufgabe, Extremitäten, wie z.B. die Fingerspitzen, zu schützen und die höher entwickelte Fingerfertigkeit in der Feinmotorik zu unterstützen.¹⁴

1.2 Erkrankungen der Haut

Die Klassifizierung von Krankheiten der Haut und Unterhaut stellt ein eigenes Kapitel in der „Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO) dar (Kapitel 12).¹⁵ Hierbei wird in die folgenden acht großen Gruppen unterteilt:

- Infektionen der Haut und der Unterhaut
- Bullöse Dermatosen
- Dermatitis und Ekzem
- Papulosquamöse Hautkrankheiten
- Urtikaria und Erythem
- Krankheiten der Haut und der Unterhaut durch Strahleneinwirkung
- Krankheiten der Hautanhangsgebilde
- Sonstige Krankheiten der Haut und der Unterhaut

Zusätzlich werden in anderen Kapiteln folgende Hautkrankheiten definiert:

- Parasitenbefall der Haut
- Melanom und sonstige bösartige Neubildungen der Haut
- Melanozytennaevi an verschiedenen Stellen
- Sonstige gutartige Neubildungen der Haut

Von diesen genannten Erkrankungen wird aufgrund des Themas der Arbeit nur auf die Krankheiten durch Strahleneinwirkung, Melanozytennaevi und bösartige Neubildungen der Haut eingegangen.

1.2.1 Krankheiten der Haut und der Unterhaut durch Strahleneinwirkung

Die größte Gefahr bezüglich Strahleneinwirkung von außen ist die UV-Strahlung, die von der Sonne ausgeht. Jeder Mensch ist dieser im Laufe seines Lebens ausgesetzt, Variationen ergeben sich beispielsweise durch die geographische Position und die Höhenlage. Generell ist die Stärke der UV-Strahlung am Äquator am höchsten und nimmt zu den Polen hin stetig ab. Zusätzlich nimmt sie auch in der Höhe kontinuierlich zu, da hier weniger Atmosphäre durchdrungen werden muss.

UV-Strahlung wird aufgrund ihrer Wellenlänge in drei Gruppen eingeteilt: UVA, UVB und UVC. UVA-Strahlung weist die größte Wellenlänge auf (315-400 nm), gefolgt von UVB (290-315 nm) und

UVC (100-290 nm). Der größte Teil des sichtbaren Lichts besteht aus UVA-Strahlung, UVB macht ca. 5-10 % aus und UVC wird größtenteils von der Ozonschicht abgefangen und gelangt nicht bis zur Erdoberfläche.¹⁶

Obwohl UVB-Strahlung den weitaus kleineren Teil der auf der Erdoberfläche ankommenden UV-Strahlung ausmacht, ist sie wesentlich an Schädigungen der Haut beteiligt. Die kürzeren Wellenlängen werden großteils von Epidermiszellen absorbiert, während UVA-Strahlung in tiefere Hautschichten vordringt. Schädigungen durch UVB-Strahlung entstehen durch das Fördern von oxidativem Stress, Defekte an Proteinen sowie Zellmembranen und strukturelle Modifikationen der DNA-Basen.¹⁷ UVA-Strahlung verursacht einen indirekten Schaden an der DNA durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wodurch DNA-Strangbrüche und DNA-Protein-Verbindungen entstehen können.¹⁸

Der menschliche Körper ist zwar von Schädigungen durch UV-Strahlen betroffen, er kann sich aber selbst vor weiteren Verletzungen durch diese Strahlen schützen. Der wichtigste Mechanismus dabei ist die Hautbräunung durch Melanin. Dies geschieht allerdings erst nach Kontakt mit UV-Strahlung und kann daher nur vor nachfolgenden Expositionen schützen. Vereinfacht dargestellt, wird durch die Bindung von α -Melanozyten-stimulierendem Hormon an den Melanocortin-1-Rezeptor eine Signalkaskade ausgelöst, die zur vermehrten Produktion von Melanin durch die Melanozyten führt. Das so entstandene Melanin wird anschließend in die Keratinozyten eingelagert und führt zur optischen Bräunung der Haut. Der zusätzliche Farbstoff in der Haut wirkt nun photoprotektiv vor weiterer UV-Strahlung.¹⁶ Eine genaue Darstellung des Signalwegs der Hautbräunung findet sich im nachfolgenden Kapitel 1.3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die negativen Effekte der Einwirkung von UV-Strahlung Lichtschäden, Hautrötungen, Immunsuppression, Mutationen und als Folge Photocarcinogenese sind. Zu den positiven Effekten gehören die Synthese von Vitamin D und die Bräunung der Haut.¹⁸ Als Krankheitsbilder zeigen sich zum Beispiel Dermatitis solaris (Sonnenbrand), phototoxische und photoallergische Reaktionen auf Arzneimittel, polymorphe Lichtdermatose und aktinische Keratose. Langzeitfolgen sind bösartige Neubildungen der Haut, die in einem eigenen Kapitel noch besprochen werden.¹⁵

1.2.2 Melanozytennaevi

Melanozytennaevi sind gutartige Tumore von Melanozyten, die am ganzen Körper auftreten können. Sie selbst stellen keine Gefahr für den Körper dar, allerdings können sie Vorläufer von malignen

Melanomen sein, weshalb eine frühzeitige Identifizierung von Naevi bzw. die Abgrenzung zu Melanomen von großer Bedeutung ist. Hierbei wird die klinische Krankengeschichte berücksichtigt, die Morphologie des Naevus und gegebenenfalls die histologischen Merkmale nach einer Exzision. Um die Exzisionsrate möglichst gering zu halten, wird häufig zusätzlich zur Beurteilung mit freiem Auge, die Dermatoskopie eingesetzt.¹⁹ Dies ist eine Art der in vivo Oberflächenmikroskopie, wodurch die Merkmale eines Naevus beträchtlich genauer untersucht und beurteilt werden können.²⁰

Melanozytennaevi können in sehr unterschiedlichen Formen auftreten, weshalb eine universelle Einteilung schwierig ist. Für bestimmte Gruppen von Naevi sind gewisse Merkmale, wie Größe und Farbe passend, während sie bei anderen den Verdacht der Entartung hervorrufen. Nachfolgend ein Beispiel der Klassifikation:

- Gewöhnlicher, erworbener Naevus
- Dysplastischer Naevus
- Naevus an einer bestimmten Stelle des Körpers
- Wiederkehrender Naevus (Pseudomelanom)
- Spitz Naevus
- Angeborener Naevus
- Blauer Naevus
- Kombiniertes Naevus

Viele dieser Gruppen haben zusätzlich einige Untervariationen, wodurch ersichtlich wird, dass die klinische Differenzierung untereinander und gegenüber Melanomen bis heute eine Herausforderung für Dermatologinnen und Dermatologen ist.²¹

1.2.3 Bösartige Neubildungen der Haut

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 angedeutet, ist ein großer Risikofaktor für die Entstehung von Hautkrebs eine vermehrte UV-Exposition. Diese gemeinsam mit dem generellen Hauttyp und einer eventuell vorhandenen Immunsuppression sind die Hauptfaktoren für bösartige Neubildungen der Haut.²²

Hautkrebs ist die am häufigsten vorkommende Form von bösartigen Neubildungen bei Menschen, wobei vor allem Personen mit heller Haut betroffen sind. Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit mit dem Alter eine Form von Hautkrebs zu bekommen, da der Körper bereits lange Zeit UV-Strahlung ausgesetzt ist.²³ Generell werden diese Neubildungen der Haut in Melanom und nicht-melanozytärer

Hautkrebs (non-melanoma skin cancer, NMSC) eingeteilt, wobei letzterer hauptsächlich Basalzellenkarzinome und Plattenepithelkarzinome umfasst.²⁴

1.2.3.1 Nicht-melanozytärer Hautkrebs

Der überwiegende Anteil an bösartigen Neubildungen der Haut (über 95 %) sind nicht-melanozytäre Hautkrebsarten. Wie bereits zuvor erwähnt, sind die beiden häufigsten Formen das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom, wobei das Basalzellkarzinom ca. 80 – 85 % der Fälle umfasst.²³

Das Basalzellkarzinom hat seinen Ursprung in den Basalzellen, der innersten Schicht der Epidermis. Am häufigsten betroffen sind Stellen am Kopf und Hals, die zuerst als Knötchen auftreten und über Monate und Jahre hinweg kontinuierlich wachsen können. Plattenepithelkarzinome entstehen aus entarteten Keratinozyten, die in die Dermis eindringen und in sehr unterschiedlichen Formen auftreten können. Da das Vorkommen dieser Karzinome mit einer häufigen Exposition gegenüber UV-Strahlung in starkem Zusammenhang steht, treten diese auch besonders an sonnenexponierten Stellen auf.²⁴ Ein Vorstadium von Plattenepithelkarzinomen ist die aktinische Keratose. Hierbei kommt es zu einer Schädigung der DNA durch UV-Strahlung, wodurch atypische Keratinozyten und auf der Haut sichtbare Läsionen entstehen. Nicht jeder Fall von aktinischer Keratose muss jedoch zu einem Karzinom werden, der kritische Punkt ist der Übertritt von entarteten Keratinozyten in die Dermis. Erst dann wird von einem Plattenepithelkarzinom gesprochen.²²

Trotz ihrer großen Häufigkeit ist die Mortalitätsrate bei diesen Krebsarten sehr gering, weil sie selten metastasieren und meist gut begrenzt auftreten, sodass die Therapien sehr einfach sind. Der Goldstandard ist eine gründliche Exzision der betroffenen Stelle, sollte dies nicht möglich sein, stehen Radiotherapie, Vereisen mit flüssigem Stickstoff und topische Applikation von 5-Fluorouracil bzw. Imiquimod zur Verfügung.²³

1.2.3.2 Malignes Melanom

Wie bereits erwähnt, macht das maligne Melanom nur einen geringen Anteil an Hautkrebs aus (ca. 5 %), es ist jedoch für 65 % aller Todesfälle aufgrund von Hautkrebs verantwortlich. Es bildet sich aus epidermalen Melanozyten und kann am ganzen Körper vorkommen.²⁴ Zu Beginn proliferieren die Melanozyten an der dermalepidermalen Verbindung und dringen anschließend in die Dermis ein. Auch bei Melanomen ist der größte Risikofaktor UV-Strahlung, besonders wenn es zu einer

diskontinuierlichen, übermäßigen Exposition kommt. Zusätzlich sind auch genetische Faktoren involviert, die eine erhöhte familiäre Wahrscheinlichkeit bewirken können.²²

Solange Melanome frühzeitig entdeckt werden, können sie, analog zu NMSCs durch Exzision behandelt werden, wobei nicht nur das betroffene Gewebe, sondern auch ein gewisser Sicherheitsradius um das beeinträchtigte Areal entfernt wird. Allerdings metastasieren diese Neoplasmen häufig schnell, wodurch die Überlebensrate in fortgeschrittenen Stadien drastisch sinkt. Sollte das Melanom bereits Metastasen gebildet haben, kann mit konventioneller Chemotherapie (Dacarbazin, Temozolomid bzw. Carboplatin/Paclitaxel) behandelt werden. Zusätzlich sind auch schon Antikörper für diese Indikation verfügbar, jedoch ist die Heilungsrate, ähnlich wie bei anderen metastasierten Tumoren, entsprechend gering.²³ Daher ist es von besonderer Bedeutung, mehr Augenmerk auf die Prävention von Melanomen zu legen und so die Inzidenzrate zu senken.

1.3 Melanocortin-System und Hautbräunung

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, ist die UV-Strahlung, der der Mensch beinahe täglich ausgesetzt ist, ein großer Risikofaktor bei der Entstehung von Hautkrankheiten. Die einzige Möglichkeit des Körpers sich davor zu schützen, ist die Pigmentierung der Haut durch Melanin. Allerdings tritt diese erst nach einer initialen UV-Exposition auf, weshalb es oft bereits vorher zu Schädigungen kommt und der körpereigene Schutz nur vor weiteren Beeinträchtigungen bewahren kann.¹⁸

Der Mechanismus, der die Hautbräunung auslöst, folgt einem parakrinen/autokrinen Weg. Wichtige Akteure dabei sind die Hormone α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH) und adrenocorticotropes Hormon (ACTH).²⁵ Beide stammen, gemeinsam mit β - und γ -MSH von Proopiomelanocortin (POMC) ab und werden zur Gruppe der Melanocortine zusammengefasst.²⁶ Diese sind zwischen 12 und 39 Aminosäuren lange Peptidhormone, welche unterschiedliche Aufgaben im Körper erfüllen, je nachdem, an welchem Rezeptor sie agieren. Sie alle sind ausnahmslos Agonisten an den zugehörigen Rezeptoren.²⁷

Ihre Targets sind die fünf Melanocortin-Rezeptoren (MCR), die an verschiedenen Orten im Körper exprimiert werden.²⁶ Alle fünf Rezeptoren haben sieben transmembranäre Fragmente, sind G_s -Protein-gekoppelt und aktivieren die cAMP-Signalkaskade.²⁸ MC1R befindet sich in der Haut und ist für die Hautbräunung und Immunabwehrfunktionen zuständig, MC2R in der Nebennierenrinde vermittelt die Steroidogenese und MC3R, welcher im Hypothalamus und Thalamus zu finden ist, sorgt für das aufrechte Natriumgleichgewicht und eine ausgewogene Energieverteilung. MC4R ist ebenfalls

im zentralen Nervensystem (Hypothalamus, Hirnstamm und Rückenmark) lokalisiert und reguliert die Nahrungsaufnahme bzw. den Energiehaushalt und MC5R kann in exokrinen Drüsen gefunden werden, wo er die Talgdrüsensekretion kontrolliert. α -, β - und γ -MSH binden mit unterschiedlichen Affinitäten an die Rezeptoren MC1R, MC3R, MC4R und MC5R, jedoch nicht an MC2R, welcher nur von ACTH aktiviert wird.²⁶

Die beiden im menschlichen Körper natürlich vorkommenden Antagonisten des Melanocortinsystems sind das Agouti-signalling protein (ASP) und das Agouti-related protein (ARP). Bei Mäusen bestimmt das ASP die Farbe des Fells durch die Regulierung der Menge an Farbpigmenten in den Haaren. Eine Überexpression von ASP zeigt sich jedoch nicht nur an der Fellfarbe, sondern auch an einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und dadurch einem erhöhten Körpergewicht. ASP ist ein Antagonist an allen fünf Melanocortinrezeptoren, ARP wirkt nur an MC3R, MC4R und MC5R antagonistisch und hat keinen Effekt auf die beiden anderen Rezeptoren.²⁹

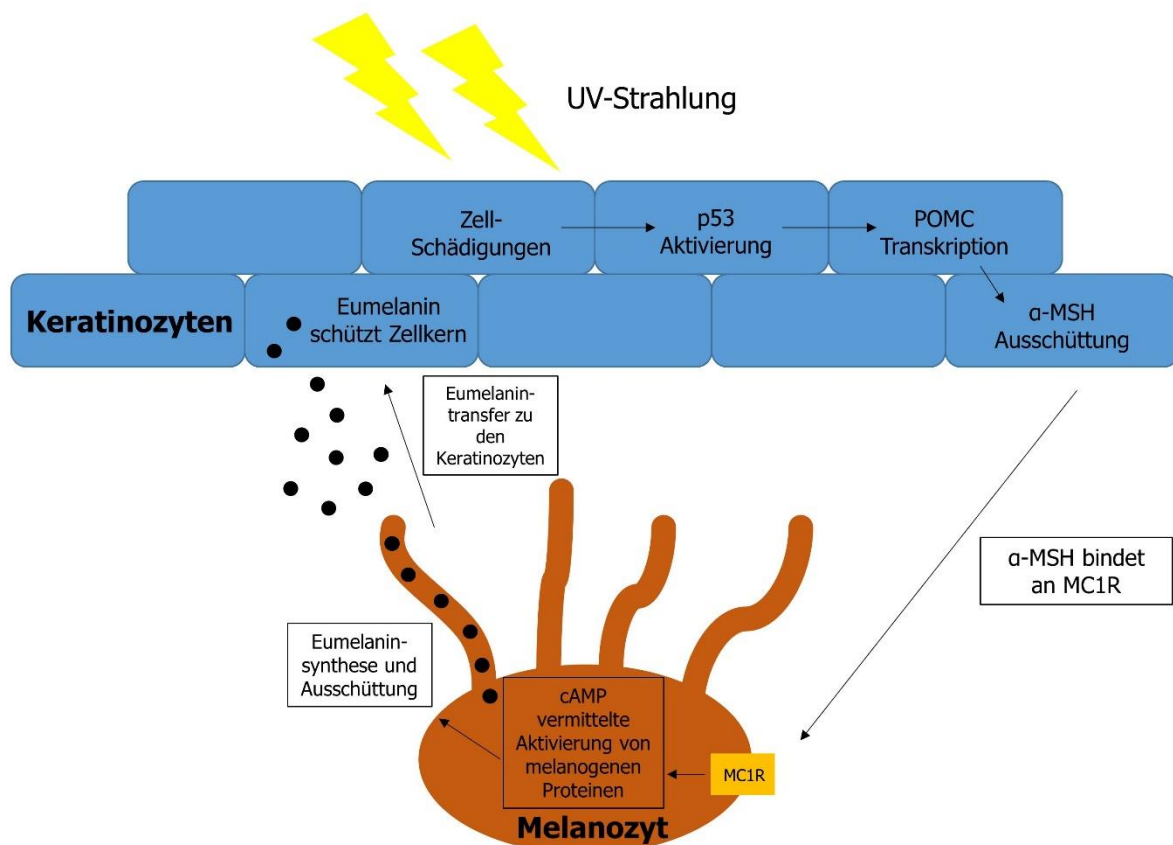


Abb. 2 Schematische Darstellung der Mechanismen, die zur Hautbräunung führen.
Modifiziert nach D'Orazio et al.²

Abbildung 2 zeigt den Mechanismus, der zur Hautbräunung führt, beginnend mit der Einwirkung von UV-Strahlung auf die Haut. Durch die UV-Exposition kommt es zu Schädigungen der Keratinozyten, welche zur Aktivierung von p53, einem allgemeinen Tumorsuppressor, der als Transkriptionsfaktor den Zellzyklus reguliert, führt. In diesem Fall kommt es außerdem zu einer Hochregulierung der POMC-

Transkription, wodurch die Produktion und Ausschüttung von α -MSH angekurbelt wird. Das Hormon wird nun von den Keratinozyten ausgeschüttet und bindet an den MC1R an der Oberfläche von Melanozyten.²

Der G-Protein-gekoppelte MC1R aktiviert daraufhin eine Signalkaskade, die mit der Aktivierung der stimulatorischen G-Protein Untereinheit $G_{s\alpha}$ beginnt und die Umwandlung von ATP in cAMP durch die Adenylatcyclase katalysiert. Anschließend erfolgt die Aktivierung der Proteinkinase A, des cAMP responsive binding element (CREB) und von Microphthalmia Transkriptionsfaktoren. Dies führt zu einer Ausschüttung von melanogenen Proteinen und erhöht dadurch die Melaninproduktion. Die Farbpigmente werden nun von den Melanozyten ausgeschüttet und zu den Keratinozyten transportiert, wo sie den Zellkern vor weiterer Schädigung durch UV-Strahlung schützen.²

Melanin kann in zwei verschiedenen Formen auftreten, Eumelanin und Phäomelanin. Eumelanin ist das braune Hautpigment und kommt verstärkt bei Personen mit dunklen Haaren vor, Phäomelanin hingegen besitzt eine gelb-rote Farbe und ist in weiterer Folge für rote Haare und Sommersprossen verantwortlich. Die beiden Melanine unterscheiden sich sowohl in ihrer Synthese als auch in ihrer Struktur, werden jedoch beide von Melanozyten produziert. Je nach Hauttyp wird entweder mehr Eumelanin oder mehr Phäomelanin gebildet, wodurch die unterschiedlichen Hautfarben entstehen.³⁰

Es wird dadurch ersichtlich, dass sich der menschliche Körper gegen UV-Strahlung schützen kann, jedoch nur nach einem initialen Reiz durch die Exposition gegenüber ebendieser Strahlung. Essentiell dabei sind die beiden Akteure α -MSH und MC1R, deren Zusammenspiel gut abgestimmt sein muss, da zum Beispiel kleine Polymorphismen am MC1R Gen bereits zu einer veränderten Hautbräunung führen.³¹ Daher ist es ein wichtiges Bestreben nach Agonisten am MC1R zu suchen, die diesen aktivieren können und so eine Bräunung der Haut ohne schädliche Einflüsse ermöglichen.

1.4 Aktive Liganden am MC1R

Die Suche nach selektiven Agonisten am MC1R sollte für die Prophylaxe von Krankheiten wie Hautkrebs von großem Interesse sein, jedoch gibt es bis jetzt nur wenige Moleküle, die auch in klinischen Studien am Menschen getestet wurden.³² Die Entwicklung neuer Wirkstoffe orientiert sich meist an den natürlichen Liganden. Wie bereits beschrieben, binden alle vier körpereigenen Melanotropine an den MC1R, α -MSH mit der höchsten Affinität, β - und γ -MSH mit einer geringeren und schließlich ACTH mit der niedrigsten Affinität.²⁶ Die Melanotropine binden jedoch auch an andere Melanocortinrezeptoren und sind für keinen der Rezeptoren selektiv. Das grundlegende Pharmakophormuster, welches auch in α - und γ -MSH vorkommt und für die Bindung an MC1R, MC3R,

MC4R und MC5R essentiell ist, stellt das Tetrapeptid His-Phe-Arg-Trp-NH₂ dar. Die natürlich vorkommenden Melanotropine können, in unveränderter Form, nicht für den Einsatz als Therapeutika herangezogen werden, da sie biologisch instabil sind und leicht durch Proteasen im Körper inaktiviert werden. Neue Arzneimittelkandidaten sollten daher stabil gegenüber Abbaumechanismen im menschlichen Körper sein, eine für einen Rezeptor selektive, agonistische oder antagonistische Wirkung zeigen und, je nach Anwendungsgebiet, die Blut-Hirn-Schranke überwinden können oder nicht.³³

In der nachfolgenden Tabelle 1 wird ein Überblick zum aktuellen Stand der Peptide, die – nicht ausschließlich, aber auch – am Melanocortin-1-Rezeptor agonistisch wirken und bereits in klinischen Studien getestet wurden, gegeben.

| Substanz | Peptidsequenz | Selektivität | Indikation |
|---------------|---|--------------|--|
| α-MSH | Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu- His-Phe-Arg-Trp -Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ | nein | Keine klinische Anwendung |
| Afamelanotid | Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu- His-D-Phe-Arg-Trp -Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ | nein | erythro-poetische Protoporphyrinurie ³⁴ |
| Bremelanotid | Ac-Nle-c[Asp- His-D-Phe-Arg-Trp -Lys]-NH ₂ | nein | Sexuelle Dysfunktion ³⁵ |
| Modimelanotid | Ac-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu- His-Phe-Arg-Trp -Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ | nein | Sepsis-induzierte akute Nierenschädigung ³⁶ |

Tab. 1 Übersicht über agonistisch am MC1R wirkende Substanzen, die bereits zugelassen sind bzw. klinische Studien durchlaufen haben

Als Vergleich ist die Aminosäuresequenz von α-MSH dargestellt, sodass die Variationen in den Strukturen der Arzneimittelkandidaten deutlich sichtbar werden.

Derzeit ist Afamelanotid unter dem Markennamen Scenesse® als einzige Substanz, bei der die Wirkung am MC1R auch im Vordergrund steht, am europäischen Markt zugelassen. Das Präparat ist ein Implantat, das durch einen Facharzt unter die Haut injiziert wird und dort für zwei Monate liegen bleibt.³⁴ Afamelanotid, auch bekannt unter dem Namen Melanotan I oder NDP-MSH, ist ein Oligopeptid und besteht aus 13 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist gegenüber α-MSH nur an zwei Positionen verändert, die vierte Aminosäure ist Norleucin statt Methionin. Als siebte Aminosäure fungiert D- anstatt L-Phenylalanin.³³ Die Indikation dieses Präparats ist die Behandlung von erythro-poetischer Protoporphyrinurie, bei welcher PatientInnen an einer Lichtintoleranz leiden.³⁴ In der ChEMBL Bioaktivitätsdatenbank sind außerdem zwei Agonisten am MC1R gelistet, die in ihrer

Entwicklung bereits so weit fortgeschritten sind, dass sie klinische Studien durchlaufen haben.³⁷ Es sind dies Bremelanotid bzw. Melanotan II, ein cyclisches Heptapeptid³³ und Modimelanotid, ein Oligopeptid mit der Grundstruktur des α -MSH, welches am N-Terminus sechs zusätzliche Lysinreste besitzt.³⁶ Bremelanotid wird für den Einsatz bei sexueller Dysfunktion getestet, wobei hauptsächlich seine agonistische Wirkung auf den MC4R genutzt wird.³⁵ In den Studien zur Wirkung von Modimelanotid wird das antiinflammatorische Potential von Melanotropinen genutzt und die Anwendung bei Sepsis-induzierter akuter Nierenschädigung getestet.³⁶

Alle weiteren Substanzen, die als MC1R-Agonisten publiziert wurden, sind nach derzeitigem Stand noch nicht in klinischen Studien am Menschen getestet worden. Eine Suche nach MC1R-Agonisten in der ChEMBL Bioaktivitätsdatenbank ergab insgesamt 858 verschiedene Einträge. Jeder dieser Einträge repräsentiert ein Molekül, das eine Aktivität am humanen MC1R aufweist, wobei noch nicht ausgefiltert wurde, ob es sich um eine agonistische oder antagonistische Wirkung handelt.³⁷ Für die Entwicklung neuer Liganden wurde meist von der Struktur eines Melanotropins als natürlichem Liganden ausgegangen und anschließend eine Modifikation an der Aminosäuresequenz durchgeführt.^{33,38,39} Dies wurde durch das Implementieren von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren bzw. anderen Bausteinen, die Aminosäuren strukturell ersetzen sollen, verwirklicht.^{38,40,41}

1.5 Grundlagen der topischen/transdermalen Applikation von Arzneistoffen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung der topischen Applikation von α -MSH-Analoga, da diese Art der Anwendung sehr patientenfreundlich ist und dadurch die Compliance erhöht werden kann. Das folgende Kapitel soll daher einen Überblick zu den bekannten Erfordernissen bzw. Voraussetzungen für eine erfolgreiche topische Anwendung von Wirkstoffen geben.

Da die Haut das größte Organ des Menschen darstellt, ist eine Wirkstoffgabe über diesen Weg ein praktischer und niederschwelliger Zugang. Zuerst nur für lokale Krankheiten verwendet, werden zunehmend auch systemisch wirkende Arzneistoffe über die Haut verabreicht. Vorteile von topischer Arzneimittelgabe sind eine einfache Anwendung, die Umgehung des Magen-Darm-Traktes und beispielsweise bei der Applikation von Pflastern eine kontinuierliche Wirkstoffabgabe ohne Spitzen in der Konzentration. Auf der anderen Seite gibt es einige Hindernisse für diese Art der Applikation, weshalb nicht jeder Arzneistoff für eine topische Anwendung geeignet ist. Eine Substanz, die über die Haut in den Körper eindringen soll, muss sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzen,

sie sollte ein Molekulargewicht von weniger als 500 Dalton aufweisen und die Dosis sollte geringer als 10 mg pro Tag sein.⁴²

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben, besteht die Haut aus mehreren Schichten mit unterschiedlichen Strukturen. Je nach Wirkstoff können diese einzelnen Schichten das gewünschte Ziel der Applikation sein. Die Hautoberfläche direkt ist zum Beispiel das Ziel von Antiseptika oder Sonnenschutzmittel; Corticosteroide, Antihistaminika oder Anästhetika sollen lokal an bestimmten Stellen wirken und nicht tiefer als bis zur Grenze zwischen Dermis und Epidermis eindringen. Enthaarungsmittel und Antimikrobiotika zielen auf Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel ab. Hormone, Antiemetika oder Opiode haben meist eine systemische Wirkung, weshalb sie die dermalen Kapillaren erreichen sollen, um anschließend im gesamten Körper verteilt zu werden.^{43,44}

Generell werden drei verschiedene Möglichkeiten des Wirkstofftransportes durch die Haut beschrieben: interzellulär, transzellulär und intrazellulär. Substanzen, die durch die Lipidschicht der Epidermis permeieren, gehen den interzellulären Weg. Der Pfad durch die Korneozyten selbst wird intrazellulär genannt. Wenn ein Arzneistoff durch die Haarfollikel und/oder die Talg- bzw. Schweißdrüsen transportiert wird, so geschieht dies auf der transzellulären Route.⁴⁴

Aus pharmazeutisch-technologischer Sicht gibt es zwei verschiedene Methoden, Wirkstoffe transdermal zu applizieren: passiv und aktiv. Zu den passiven Methoden werden eher konventionelle Applikationen wie halbfeste Zubereitungen und Pflaster gezählt, die alleine auf der thermodynamischen Aktivität des Arzneistoffes beruhen. Rezente Studien versuchen diese Aktivität zu erhöhen, indem chemische Permeationsverbesserer, Prodrugs, Liposome und weitere Vesikel verwendet werden. Dennoch ist die applizierbare Wirkstoffmenge begrenzt, da die Barrierefunktionen der Haut weiterhin erhalten bleiben. Die Anwendung von aktiven Methoden wurde nicht zuletzt wegen der Vielzahl an neuen Peptid- und Proteinwirkstoffen, die ein hohes Molekulargewicht und hydrophile, polare Eigenschaften aufweisen, vorangetrieben. Diese Wirkstoffe haben selten eine gute orale Verfügbarkeit, weshalb alternative Applikationswege gesucht werden. Zu diesen Methoden zählen Iontophorese und Elektroporation (elektrische Methoden), Mikronadeln, Abrasion, nadellose Injektion und Dehnung (mechanische Methoden) sowie Ultraschall, Magnetophorese, Radiowellen, Laser und photomechanische Wellen und Temperaturänderungen (diverse Methoden).⁴³

Die Zukunftsperspektiven für diese Art der Arzneistoffgabe sind durchaus positiv, da an einer Vielzahl verschiedener Möglichkeiten zur Verbesserung der topischen Verfügbarkeit gearbeitet wird. Obwohl manche Methoden aufgrund ihrer Beschaffenheit (z.B. Iontophorese oder Elektroporation, welche geeignete Geräte und geschultes Personal erfordern) nur für ein limitiertes Anwendungsgebiet zur Verfügung stehen, sind die Chancen auf eine transdermale Gabe deutlich erhöht worden. Der große Vorteil dieser Applikationsart, den Wirkstoffvorrat immer außerhalb des Körpers zu behalten und

dadurch die Freisetzung permanent steuern zu können, wird in Zukunft sicher an Bedeutung gewinnen und in weiteren Wirkstoffklassen eingesetzt werden.⁴⁵

2 Zielsetzung

Durch die natürliche Variation an Hauttypen und ihre unterschiedlichen Fähigkeiten zur Hautbräunung ist es für manche Personen nicht oder nur sehr schwer möglich, einen körpereigenen Schutz gegen UV-Strahlung aufzubauen.⁴⁶ Wie bereits zu Beginn der Einleitung erwähnt, ist jeder Mensch in unterschiedlichem Ausmaß dieser Strahlung ausgesetzt, die einen Risikofaktor für mehrere Krankheitsbilder darstellt.¹⁸ Besonders hervorzuheben sind dabei bösartige Neubildungen der Haut, vor allem maligne Melanome, die für den Großteil der Todesfälle in Folge von Hautkrebs verantwortlich sind.²⁴ Da die Therapie von malignen Melanomen sehr schwierig ist und es meist auch ein wenig Glück erfordert, den Tumor rechtzeitig zu erkennen, ist es besonders wichtig, Präventionsstrategien zu entwickeln.²³

Mit dem natürlichen Schutzmechanismus vor UV-Strahlung, der Hautbräunung, als Vorbild, sollte daher nach neuen Wirkstoffen für die Prävention vor Hautkrebs gesucht werden. Abbildung 3 zeigt die Struktur von α -MSH, welches durch seine Bindung am MC1R die Bildung von Melanin anregt. Es ist aufgrund seiner Größe und seiner raschen Biodegradation durch Enzyme nicht geeignet als Arzneistoff verwendet zu werden. Allerdings ist bereits bekannt, dass die „Minimalsequenz“ die Aminosäuren 4-10 von α -MSH (His-Phe-Arg-Trp) umfasst und die weiteren C- und N-terminalen Aminosäuren nicht essentiell für die Aktivierung der Melanocortinrezeptoren sind.³²

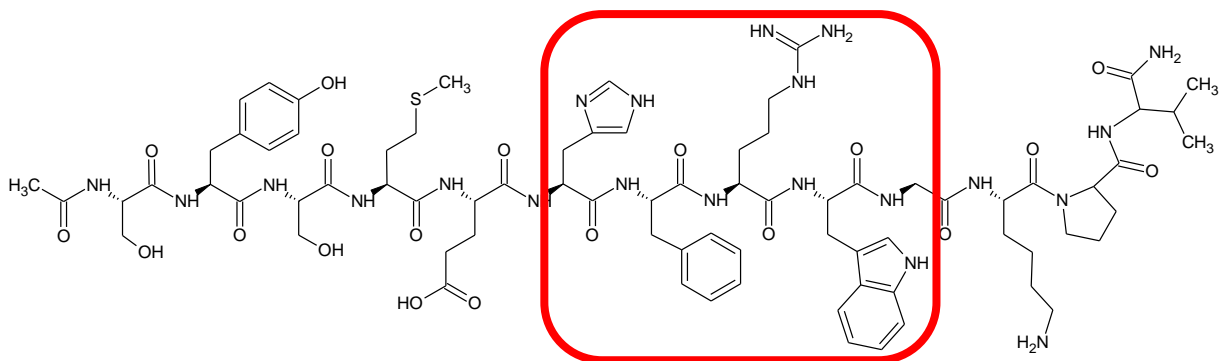


Abb. 3 Chemische Struktur von α -MSH

Aminosäuresequenz: Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂, rot eingezeichnet ist die minimale Bindungssequenz für Melanocortinrezeptoren.

Ausgehend von diesem Tetrapeptid sollten Analoga synthetisiert werden, die eine agonistische Wirkung am MC1R aufweisen, welche im Idealfall auch selektiv für diesen Rezeptor sein soll. Als erste Strategie wurde die Generierung einer Aminosäurenbibliothek gewählt, welche als Bausteine für Peptide dienen sollte. Da sowohl die Reduktion der Aminosäurenanzahl und damit einhergehend des Molekulargewichts ein Ziel war, sollten modifizierte Aminosäuren bzw. Aminosäureanaloga die ursprünglichen Bausteine ersetzen. Weiters sollten auch Peptide mit natürlichen Aminosäuren synthetisiert werden, um eine vergleichende Aussage zur Wirkung treffen zu können.

Um eine gezieltere Modifikation der einzelnen Aminosäurebausteine zu erzielen, sollten in silico-Methoden zu Hilfe genommen werden. Nachdem zum aktuellen Stand noch keine Kristallstruktur des MC1R publiziert wurde, musste ein ligandenbasierter Ansatz gewählt werden. Mithilfe von Pharmakophorsimulationen und Alignmentberechnungen sollten die essentiellen chemischen Eigenschaften des Tetrapeptids His-Phe-Arg-Trp herausgefiltert und so die bevorzugten Ansatzpunkte für Modifikationen an den Aminosäuren bestimmt werden.

Da die Arbeit eine ganzheitliche Sicht auf das beschriebene Problemfeld bieten sollte, war ein weiteres Ziel, ein passendes Testsystem für die biologische Aktivität der synthetisierten Substanzen zu finden. Ausgehend von Melanomzelllinien aus verschiedenen Stadien des Tumors sollte eine Zelllinie gewählt werden, die eine stabile Expression der Melanocortinrezeptoren aufweist. Anschließend sollte ein Protokoll entwickelt werden, das die Testung der synthetisierten Substanzen auf biologische Aktivität an Melanocortinrezeptoren erlaubt. Da für potentielle Arzneistoffkandidaten auch die Frage der Toxizität eine große Rolle spielt, wurde ebenfalls eingeplant, an allen getesteten Substanzen einen Zytotoxizitätsassay durchzuführen.

Nachdem die Zielstruktur eines MC1R-Agonisten in der Haut liegt, jedoch nach aktuellem Stand noch keine Studien zur Hautpenetration von synthetisierten Liganden publiziert wurden, war geplant abschließend auch zu evaluieren, ob eine topische Applikation dieser Oligopeptide möglich wäre. Es sollte dafür ein Modellpeptid ausgewählt werden, welches mithilfe von etablierten Methoden (Tape Stripping und Franz-Diffusionszellen) auf seine Hautpermeation und –penetration untersucht wird.

3 Material

3.1 Organische Synthese und Peptidsynthese

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien zur organischen Synthese inklusive Lösungsmittel wurden von den Firmen Acros, VWR, Sigma-Aldrich, Fluka und Carl Roth in zumindest analytischem Reinheitsgrad, bei Lösungsmitteln für die Analytik zumindest HPLC grade bezogen. Aminosäuren für die Peptidsynthese wurden von den Firmen Iris Biotech, Bachem bzw. Novabiochem in analytischem Reinheitsgrad erworben.

3.1.2 Geräte

Peptidsynthesen wurden semiautomatisch mithilfe des Mikrowellensynthesizers Biotage® Initiator+ SP Wave (Biotage) durchgeführt. Die Harzbeladung der ersten Aminosäure wurde photometrisch mit einem Shimadzu UV-160A Spektrophotometer bestimmt.

3.2 Analytik

3.2.1 Dünnschichtchromatographie/Säulenchromatographie

DC-Fertigfolien (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄) und Kieselgel 60 wurden von der Firma Macherey-Nagel bezogen.

3.2.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Alle verwendeten HPLC-Systeme stammen von der Firma Shimadzu Corporation. Es wurden insgesamt vier Systeme für die unterschiedlichen Auftrennungen benutzt, in der untenstehenden Tabelle 2 sind die einzelnen Elemente der Anlagen beschrieben.

| Bezeichnung in der Arbeit | Gerätebezeichnung | Beschreibung | Verwendungszweck |
|---------------------------|-------------------|--|---|
| A1 | LC-2010HT | Kompaktsystem, bestehend aus: Entgasereinheit, Niederdruckgradienteneinheit, Pumpe, Mischelement, Autosampler, Säulenofen und UV-VIS-Detektor mit temperaturkontrollierter Durchflusszelle | Analytische Auftrennung |
| A/S1 | LC-20A | Pumpe | Analytische und semipräparative Auftrennung |
| | DGU-20A5 | Entgaser | |
| | SIL-20A | Autosampler | |
| | CTO-20AC | Säulenofen | |
| | SPD-M20A | Diodenarraydetektor | |
| | CMBM-20A | Kontrollelement | |
| | FRC-10A | Fraktionssammler | |
| A/S2 | 2x LC-20AD XR | Pumpen | Analytische und semipräparative Auftrennung |
| | 2x DGU-20A3R | Entgaser | |
| | SIL-20AC HT | Autosampler | |
| | CTO-20AC | Säulenofen | |
| | SPD-M20A | Diodenarraydetektor | |
| | RF-20A XS | Fluoreszenzdetektor | |
| | CBM-20A | Kommunikationsmodul | |
| | FRC-10A | Fraktionssammler | |
| P1 | 2x LC-8A | Pumpen | Präparative Auftrennung |
| | k.A. | Injektor für präparative Säulen | |
| | SPD-10A VP | UV-VIS Detektor | |
| | SCL-10A VP | Kontrollelement | |
| | FRC-10A | Fraktionssammler | |

Tab. 2 Auflistung der vier HPLC-Anlagen, die für analytische und präparative Zwecke eingesetzt wurden

Für analytische HPLC-Bestimmungen wurden die Säulen Superspher® RP-18, 4 µm ec, 250x4,6 mm (Merck), Nucleosil® 100-5 EC, C18, 250x4,6 mm (Macherey Nagel) oder Clarity® 5 µm Oligo-RP,

250x4,6 mm (Phenomenex) verwendet, für präparative Läufe die Säule Zorbax® 5 µm SB-C18, 21,2 mmx25 cm (Agilent Technologies).

3.2.3 Massenspektrometrie (MS)

Einfache Massenbestimmungen, u.a. zur Reaktionskontrolle wurden mittels des ESI-Massenspektrometers ThermoQuest Finnigan LCQ Deca XP (Thermo Fisher) durchgeführt. Für die Sequenzbestimmung von Peptiden durch MS-MS wurde zusätzlich das ultrahochauflösende Gerät maXis HD ESI-Qq-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics) verwendet.

3.2.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Zur exakten Bestimmung und Bestätigung der synthetisierten Substanzen wurden kernresonanzspektroskopische Methoden angewandt. Hierfür wurden zwei Geräte verwendet, die am Department für pharmazeutische Chemie zur Verfügung stehen, ein DPX200 Spektrometer (200 MHz) und ein Avance Ultrashield 500 Spektrometer (500 MHz) mit einem TCI Prodigy Kryo Probenkopf, 5 mm, Tripelresonanz-Invers-Detektion Probenkopf (beides Bruker BioSpin Corp.).

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zelllinien

Für Zellkulturversuche wurden Melanomzellen in verschiedenen Differenzierungsstadien verwendet. A375 Zellen wurden von Prof. Dr. Walter Berger (Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien), 518A2 Zellen von Prof. Dr. Christoph Hoeller (Department für Dermatologie, Medizinische Universität Wien) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien WM35, WM278 und WM793 stammen ursprünglich von Prof. Meenhard Herlyn (The Wistar Institute, USA) und werden derzeit vom Coriell Institute (New Jersey, USA) bereitgestellt.

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMEM high glucose), Ham's Nutrient Mixture F12, Fötale Kälberserum, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und Trypsin wurden von Sigma Life Science (Sigma-Aldrich) bezogen.

3.4 Biologische Testungen

3.4.1 Testkits

| Bezeichnung | Verwendungszweck | Hersteller |
|---|---------------------|--------------------------------------|
| RNeasy Mini Kit | mRNA Isolierung | Qiagen |
| RevertAid H Minus, First Strand cDNA Synthesis Kit | cDNA Synthese | Fermentas |
| peqGOLD taq-DNA-Polymerase all inclusive Kit | PCR | PeqLab (VWR) |
| EZ4U nonradioactive cell proliferation and cytotoxicity assay | Proliferationsassay | Biomedica Medizinprodukte GmbH&Co KG |

Tab. 3 Auflistung der verwendeten Testkits mit Angabe der Hersteller und des Verwendungszwecks

3.4.2 Primer

| mRNA | forward 5'-3' Primer | reverse 5'-3' Primer | Amplicon (Basenpaare) | Optimale Hybridisierungstemperatur (T _m) |
|--------------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|--|
| Housekeeping Gen⁴⁷ | | | | |
| RPS14 | GGCAGACCGAGATGAATCCTCA | CAGGTCCAGGGTCTTGGTCC | 143 | 58°C |
| Melanocortin Rezeptoren | | | | |
| MC1R | CTGGGCAGTTCCTTACCTCC | GGGAGTAGCTCTTGGCACAC | 378 | 60°C |
| MC2R | CACTCTCAAGCTCTCTGCTGT | AGGGACTCCTAACCCATGCT | 662 | 58°C |
| MC3R | TGATCATCAGTCGGGTCACTT | GAGCATGAAGACGTGGGTGT | 334 | 58°C |
| MC4R | TCCGTGTAGGGTACTGGTTG | CACGCAAAGTGTCCAATGCT | 235 | 58°C |
| MC5R | GCACTGTGTCATTCATCCCC | CCCTCTGTGGCATTCAAGTT | 208 | 58°C |

Tab. 4 DNA-Sequenzen der verwendeten Primer

RPS14 = Ribosomal Protein 14, MCXR = Melanocortin X Rezeptor

3.4.3 Verbrauchsmaterialien

Alle angegebenen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen Sigma-Aldrich bzw. Carl Roth.

3.4.4 Puffer-Rezepte

PBS (Phosphate-buffered saline)

- 8,00 g NaCl
- 1,44 g Na₂HPO₄ (wasserfrei)
- 0,20 g KCl
- 0,24 g KH₂PO₄
- In ca. 900 ml MilliQ-Wasser auflösen, mit 0,1 M Salzsäure bzw. 0,1 M Natronlauge auf pH=7,4 einstellen und mit MilliQ-Wasser auf 1000 ml auffüllen

Inkubationspuffer cAMP assay (Krebs-HEPES-Puffer, 20x stock)

- 47,66 g HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
- 140,26 g NaCl
- 4,47 g KCl
- 5,88 g CaCl₂·2H₂O
- 8,13 g MgCl₂·6H₂O
- In ca. 800 ml MilliQ-Wasser auflösen, mit 0,1 M Salzsäure bzw. 0,1 M Natronlauge auf pH=7,4 einstellen und mit MilliQ-Wasser auf 1000 ml auffüllen

Inkubationspuffer cAMP assay (frisch vor dem Experiment zubereitet, 1x)

- 1,98 g D-Glucose einwiegen
- In 25 ml 20x stock (siehe oben) auflösen
- Mit MilliQ-Wasser auf 500 ml auffüllen
- pH = 7,4, falls notwendig nochmals einstellen (s.o.)
- Mit 11,11 mg IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) zur Phosphodiesterasehemmung versetzen

Aufschlusspuffer

- 500 ml Perchlorsäure 2,5 %
- 16,46 mg cAMP

Imidazolpuffer (20x stock)

- 467,6 g NaCl
- 54,46 g Imidazol
- In ca. 1500 ml MilliQ-Wasser auflösen, mit 0,1 M Salzsäure bzw. 0,1 M Natronlauge auf pH=7,4 einstellen und mit MilliQ-Wasser auf 1000 ml auffüllen

Imidazolpuffer (vor Verwendung frisch zubereitet, 1x)

- 50 ml 20x stock (siehe oben)
- Mit MilliQ-Wasser auf 1000 ml auffüllen

Szintillationscocktail: Rotiszint® ecoplus LSC-Universalcocktail, $\rho=0,96$, Carl Roth

3.4.5 Geräte

| Gerätebezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------------|
| Eppendorfer Zentrifuge 5415R, Rotor: F45-24-11, Radius: 82,65 mm | Eppendorf |
| Multi-Function Bench Top Zentrifuge BR4i; Rotor: S40, Schwingrotor, Radius: 161 mm | Jourdan |
| Labnet Multigene Gradient PCR Thermal Cycler, 96 well block | Labnet Intl., Inc. |
| Nanophotometer | Implen |
| GelDoc 1000 | Bio-Rad Laboratories, Inc. |
| Victor 3 V Multilabel Reader | PerkinElmer, Inc. |
| Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR | PerkinElmer, Inc. |

Tab. 5 Auflistung der für biologische Testungen verwendeten Geräte inklusive Hersteller

3.5 Tape Stripping

Für die Tape Stripping-Experimente wurden Standard Klebestreifen Corneofix® der Firma Courage+Khazaka GmbH verwendet, die von exzidierten Schweineohren vom EU-Schlachthof Gantner GmbH, Hollabrunn abgezogen wurden. Die abgezogene Menge an Korneozyten wurde mittels Nahfeld-Infrarot-Densitometrie mit einem Squame Scan® 850 A Gerät der Firma Heiland Elektronik GmbH quantifiziert. Die Analytik des eluierten Peptids erfolgte mittels HPLC (siehe Kapitel 4.2.1), Lösungsmittel stammten von den Firmen VWR und Fluka.

3.6 Franz-Diffusionszell-Versuche

Die beschriebenen Franz-Zell-Versuche wurden mit Diffusionszellen der Firma PermeGear GmbH durchgeführt, in die porcine Abdominal- bzw. Ohrhaut mit einer Dicke von 700 µm als Modellmembran eingespannt wurde. Das Akzeptormedium bestand aus einem natriumchloridhaltigen Phosphatpuffer mit pH 7,4, die Peptidlösung (1 %) als Donormedium wurde in destilliertem Wasser hergestellt.

Natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer (lt. EuAB)

- 0,19 g KH_2PO_4
- 2,38 g Na_2HPO_4
- 8 g NaCl
- Mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

Die Analytik des eluierten Peptids erfolgte ebenfalls mittels HPLC (siehe Kapitel 4.2 „Analytik“), Lösungsmittel stammten, wie bereits erwähnt, von den Firmen VWR und Fluka.

3.7 Datenanalyse

3.7.1 Massenspektrometrie

Die Spektren der hochauflösenden Masse wurden mittels Compass DataAnalysis 4.2 von Bruker Daltonics analysiert, Spektren des ESI-Massenspektrometers ThermoFinnigan wurden mittels Xcalibur 2.0 SR2 / TunePlus 2.0 aufgenommen und bearbeitet (beide Thermo Fisher).

3.7.2 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der Spektren des 200 MHz-Geräts erfolgte mit Topspin 3.5 (Bruker Corporation), das Programm MestReNova Version 8.1.2-11880 (Mestrelab Research S.L.) wurde verwendet, um diese auszuwerten. Die Spektren des 500 MHz-Geräts wurden mittels Topspin 3.2 aufgenommen und mit Topspin 2.1 (beides Bruker Corporation) ausgewertet.

3.7.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Sämtliche HPLC-Chromatogramme wurden mit dem Programm LabSolutions Version 5.73 (Shimadzu Corporation) bearbeitet und analysiert, die Peakflächen wurden gegebenenfalls mit MS Excel 2013 (Microsoft Corporation) weiter verarbeitet.

3.7.4 Biologische Testungen

3.7.4.1 PCR

Die Intensitäten der Banden der einzelnen Rezeptoren wurden mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ (Open Source) ausgewertet und in Vergleich zu der Intensität der Banden des housekeeping genes gesetzt. Anschließend wurden die Mittelwerte ($n=3$) mit ANOVA analysiert und die signifikanten Unterschiede durch einen Post-hoc-Test (Tukey's Test) errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte durch GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

3.7.4.2 cAMP assays

Die Rohdaten der Experimente in counts per minute (CPM) wurden mit MS Excel 2013 (Microsoft Corporation) verarbeitet, um die Werte als Verhältnis zu einem Basiswert (Forskolin) darstellen zu können. Die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt, wobei analog zu den Ergebnissen der PCR eine ANOVA durchgeführt und Signifikanzen durch einen Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet wurden ($n=3-6$).

Dosis-Wirkungskurven wurden ebenfalls mit GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) berechnet, wobei die Konzentrationen in logarithmischer Form dargestellt und anschließend eine nicht-lineare (sigmoidale) Regression mittels der folgenden Gleichung durchgeführt wurde: $Y = \text{Tiefpunkt} + (\text{Höhepunkt} - \text{Tiefpunkt}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X)))}$, Tiefpunkt und Höhepunkt sind die beiden Plateaus, die die Kurve erreicht, EC50 beschreibt die Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt zeigt.

3.7.4.3 Proliferationsassay

Um die unterschiedliche Anzahl an Zellen in den zu untersuchenden Gefäßen zu messen, wird die Absorption bei 450 nm photometrisch bestimmt. Nach Abzug des Blank-Werts wurden die Absorptionen als Prozentwerte der Kontrolle angegeben (n=4). Diese Berechnungen wurden in MS Excel 2013 (Microsoft Corporation) durchgeführt, die anschließende graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

3.7.5 In silico Studien

Die Suche nach Melanocortinrezeptoragonisten wurde mithilfe der KNIME Analytics Platform Version 3.1.2 (KNIME GmbH) durchgeführt, Pharmakophore und Alignments wurden mit LigandScout Version 4.1 (Inte:Ligand GmbH) berechnet.

3.7.6 Hautstudien

Alle HPLC-Chromatogramme wurden mit LabSolutions Version 5.73 (Shimadzu Corporation) bearbeitet und analysiert, die weitere Berechnung in MS Excel 2013 (Microsoft Corporation) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Mittels einer zuvor erstellten Kalibrationsgerade wurden die detektierten Peakflächen in Menge an Peptid ($\mu\text{g}/\text{ml}$) umgerechnet.

3.7.6.1 Tape Stripping

Die Pseudoabsorption der abgezogenen Klebestreifen wurde durch Einbeziehen eines Proportionalitätsfaktors⁴⁸ in die Menge Protein bzw. Korneozyten (μg) pro Klebestreifen umgewandelt. Die so erhaltene Korneozytenmasse konnte anschließend unter Berücksichtigung der mittleren Proteindichte in diesem Gewebe (ρ_{sc}) von 1 g/cm^3 in die entsprechende Dicke des Stratum corneum in μm umgerechnet werden. Um nun die Eindringtiefe des Peptids zu ermitteln, wurde an einer Stelle das gesamte Stratum corneum abgezogen und seine Dicke berechnet. Anhand der HPLC-Chromatogramme konnte festgestellt werden, bis zu welcher Anzahl an Strips noch Peptid detektierbar war. Die Korneozytenmasse aller Strips, auf denen Peptid nachgewiesen werden konnte, wurde addiert und analog zur Beschreibung oben in die Dicke an abgezogenem Stratum corneum umgewandelt. Da die Gesamtdicke des Stratum corneum bereits bestimmt wurde, konnte nun der prozentuelle Wert an Eindringtiefe des Peptids in das Stratum corneum dargestellt werden ($n=11$).

3.7.6.2 Franz-Zell-Experimente

Die aus den Franz-Zellen entnommenen Proben wurden mittels HPLC analysiert und die Peakflächen mithilfe der bereits erwähnten Kalibrationsgerade in Konzentrationen des Peptids umgerechnet. Anhand der bekannten Gesamtmenge an Peptid, die im Donormedium jeder Zelle zur Verfügung gestellt wurde, konnte der prozentuelle Anteil an Peptid im Akzeptormedium zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet werden ($n=10$).

4 Methoden

4.1 Peptidsynthese

4.1.1 Generelles Arbeiten am Festphasenpeptidsynthesizer

Die Mehrheit der in dieser Arbeit beschriebenen Peptide wurde mithilfe eines semiautomatischen Peptidsynthesizers der Firma Biotage synthetisiert. Die Zugabe der Aminosäuren und etwaiger zusätzlicher Reagenzien wurde händisch durchgeführt, das Erhitzen und Durchmischen der Synthese und die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte automatisch durch das Gerät. Es wurden zu Beginn jeder Synthese je 100 ml Dichlormethan, Dimethylformamid (DMF) und 25 % Piperidin in Dimethylformamid (Abspatlösung) in den dafür vorgesehenen Flaschen bereitgestellt und gegebenenfalls nachgefüllt. Zusätzlich wurden 2000 ml Dichlormethan in die System Solvent Bottle gefüllt, womit die Waschvorgänge des Geräts durchgeführt wurden. Die Reaktionen der Synthese wurden in einer Spritze mit 2, 5 oder 10 ml Volumen durchgeführt, welche mit einer Filterplatte ausgestattet ist. Dadurch konnte im Durchflussprinzip gearbeitet werden, da das Harz immer in der Spritze verblieb, von oben die Reagenzien und Lösungsmittel zugeführt wurden und mittels Anlegen eines Vakuums an die Düse die Lösungsmittelreste wieder entfernt wurden. Ein Erhitzen des Reaktionsgemisches erfolgte durch Mikrowellenstrahlung (20-60 W), wodurch ein schnelles und exaktes Heizen möglich war. Die notwendige Vermischung des Harzes mit den Reagenzien wurde durch eine Vortexeinheit gewährleistet. Die genauen Temperaturen und Umdrehungen werden bei den einzelnen Schritten erwähnt.

4.1.2 Ankopplung der ersten Aminosäure an das Harz

Es wurde bei allen Peptiden nach der Fmoc-Strategie vorgegangen. Die Fmoc-Schutzgruppe (Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe) wird zum Schützen der Aminofunktion einer Aminosäure verwendet, sodass diese erst nach Abspaltung der Gruppe mit der Carboxylgruppe der zu koppelnden, nächsten Aminosäure reagieren kann.⁴⁹

Nach einer einstündigen Quellung des Harzes in Dichlormethan wurde die erste Aminosäure angekoppelt. Hierbei wurden fünf Äquivalente (bezogen auf die Einwaage und die Beladungskapazität des Harzes) Fmoc-geschützter Aminosäure gemeinsam mit fünf Äquivalenten

1-Hydroxybenzotriazol.H₂O (HOBt) in DMF gelöst und zum Harz pipettiert. Der Zusatz von HOBt verhindert eine Racemisierung während der Kopplung. Zusätzlich wurden 0,5 Äquivalente 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator und fünf Äquivalente Diisopropylcarbodiimid (DIC) zur Aktivierung der Aminosäure hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 10 Minuten auf 70°C erhitzt und kontinuierlich durch einen Vortex gerührt. Um eine möglichst vollständige Harzbeladung zu erzielen, wurde die Kopplung entweder mit der doppelten Zugabe von Reagenzien durchgeführt (erste Zugabe der Reagenzien, 10 Minuten Erhitzen auf 70 °C, zweite Zugabe der Reagenzien, abermals 10 Minuten Erhitzen auf 70 °C) oder die Reaktionszeit auf 12-14 Stunden verlängert, wobei hier nur bei Raumtemperatur gearbeitet wurde. Als letzter Schritt wurde ein Waschprogramm mit DMF (1-4 ml für 30 Sekunden bei 1200 rpm, vier Mal wiederholt) bei Raumtemperatur eingesetzt, um die überschüssigen Reagenzien zu entfernen.

4.1.3 Abschätzung der Harzbeladung

Die Spritze wurde gründlich mit Dichlormethan (1-4 ml für 30 Sekunden bei 1200 rpm, fünf Wiederholungen) gewaschen, anschließend wurden ca. 15 mg des Harzes entnommen. Dieses wurde eine halbe Stunde im Hochvakuum getrocknet und etwa 5 mg daraus wurden in eine Glasphiole genau eingewogen. Das Harz wurde mit der entsprechenden Menge Abspalllösung (25 % Piperidin in DMF, 1,00 g Abspalllösung/mg Harz) versetzt und zehn Minuten unter gelegentlichem Umrühren stehen lassen. Es wurden 200 µl des Überstandes entnommen und in eine Küvette überführt. Zusätzlich wurden weitere 2,0 ml Abspalllösung hinzupipettiert und gut durchgemischt. Die Probe wurde bei 301 nm gegen die reine Abspalllösung als Blank vermessen. Bei dieser Wellenlänge kann die Extinktion von Dibenzofulven bestimmt werden, welches durch die Abspaltung des Fmoc-Rests von der Aminosäure entsteht. Die Harzbeladung wurde anhand einer Kalibrationsgerade bestimmt (Abb. 4). Ergab die Beladung weniger als 70 % musste die Kopplung wiederholt werden.

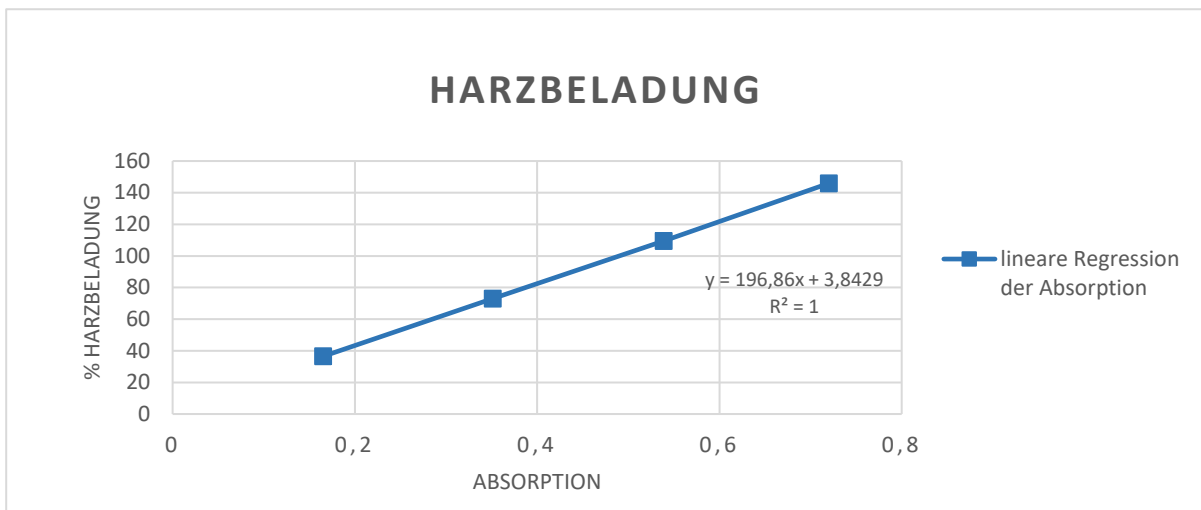


Abb. 4 Kalibrationsgerade für die Bestimmung der Harzbeladung anhand der Absorption einer Probe bei 301 nm

Für die Bestimmung der Harzbeladung wurden vier Referenzlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Fmoc-geschützten Aminosäure, gelöst in der Abspaltlösung, hergestellt. Diese wurden analog zur Durchführungsweise der Abschätzung der Harzbeladung 1:10 mit Abspaltlösung verdünnt und bei 301 nm photometrisch vermessen. Die steigende Absorption zeigt ein steigendes Vorhandensein von Dibenzofulven, welches durch die Abspaltung des Fmoc-Restes entsteht. Durch die Kenntnis über die genaue Einwaage der Aminosäure kann berechnet werden, wie viel mmol Fmoc abgespalten wurde. Dies wurde in Relation gesetzt zur Menge an Fmoc, die maximal von einer definierten Menge an Harz abgespalten werden kann, wodurch eine prozentuelle Angabe der Harzbeladung dargestellt werden kann.

4.1.4 Endcapping

Wenn die Harzbeladung einen zufriedenstellenden Wert (>70 %) erreicht hatte, wurden die restlichen freien Bindungsstellen am Harz blockiert, um keine sequenzverkürzten Peptide zu erhalten. Dies erfolgte mit fünf Äquivalenten eines Carbonsäureanhydrids, in diesem Fall wurde Benzoessäureanhydrid verwendet und 2-3 Tropfen Pyridin als Katalysator. Wie auch bei der Ankopplung einer Aminosäure wurde für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt.

4.1.5 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Dieser Schritt wurde vollständig automatisiert durchgeführt, der Synthesizer fügte die gewünschte Menge (1-4 ml) an Abspaltlösung zur Spritze hinzu, erhitzte auf 70 °C und wusch anschließend mit DMF (1-4 ml für 30 Sekunden bei 1200 rpm, drei Wiederholungen). Üblicherweise wurde pro Abspaltung zweimal Abspaltlösung hinzugefügt und für je drei Minuten auf 70 °C erhitzt.

4.1.6 Kopplung weiterer Aminosäuren

Für die Sequenzverlängerung wurden je drei Äquivalente der gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäure verwendet, drei Äquivalente HOBt, 2,9 Äquivalente O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) und sechs Äquivalente N-Ethyl-N,N-diisopropylamin (DIPEA). TBTU übernahm hier die Aufgabe die Aminosäure zu aktivieren. Zur Kopplung der meisten Aminosäuren wurden standardmäßig zehn Minuten bei 70°C benötigt. Ausnahmen sind Arginin, welches erst nach einer doppelten Zugabe von Reagenzien eine zufriedenstellende Kopplung zeigte und Histidin, welches nur auf maximal 40°C erhitzt werden durfte, um eine Racemisierung zu verhindern.

4.1.7 Kaiser-Test

Um die erfolgreiche Kopplung der letzten Aminosäure zu überprüfen, wurde der Kaisertest durchgeführt.⁴⁹ Dieser beruht auf der Reaktion von Ninhydrin mit freien Aminogruppen im alkalischen Milieu. Wenige Harzkörner wurden aus der Spritze entnommen und gründlich mit Ethanol gewaschen (5 Mal 10 ml). Die Harzkörner wurden in eine Phiole überführt, mit je drei Tropfen der Lösungen I-III versetzt (5 % (m/V) Ninhydrin in Ethanol = Kaiser-Reagenslösung I, 80 % (m/V) Phenol in Ethanol = Kaiser-Reagenslösung II, 2 ml 0,001 M KCN in 98 ml Pyridin = Kaiser-Reagenslösung III) und gründlich durchmischt. Die Phiole wurde für 4-6 Minuten auf 120 °C erhitzt. Blaue Harzkörner bzw. ein blauer Überstand zeigten ein positives Ergebnis an, was auf freie Aminogruppen hindeutet, bei einem negativen Testergebnis blieb die Lösung gelb gefärbt und die Harzkörner erschienen farblos. War das Ergebnis positiv, musste die Kopplung wiederholt werden, ansonsten konnte mit der Abspaltung der Fmoc-Gruppe fortgefahren werden.

4.1.8 Abspaltung vom Harz

Nach der erfolgreichen Kopplung der letzten Aminosäure wurde das Peptid vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz gründlich mit Dichlormethan gewaschen (1-4 ml für 30 Sekunden bei 1200 rpm, fünf Wiederholungen) und anschließend mit einem geeigneten Cleavage Cocktail versetzt. Dieser bestand bei allen Synthesen zu einem hohen Prozentsatz aus Trifluoressigsäure, zu welcher – je nach verwendeten Schutzgruppen – noch Scavenger hinzugefügt wurden, um die Reste der Schutzgruppen

abzufangen. Die jeweils verwendete Zusammensetzung wird im experimentellen Teil bei den einzelnen Peptiden beschrieben. Das Harz wurde zwei Stunden lang mit dem Cleavage Cocktail behandelt und das Filtrat in einen Kolben überführt. Anschließend wurde eiskalter Diethylether im Verhältnis 1:10 (v/v) hinzugefügt, um das Peptid auszufällen. Der Kolben wurde über Nacht bei 4 °C aufbewahrt, der Niederschlag abzentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten) und der Überstand abdekantiert. Das Peptid wurde in möglichst wenig Essigsäure (5 %) gelöst, bei -80 °C für eine Stunde eingefroren und anschließend lyophilisiert.

4.2 Analytik

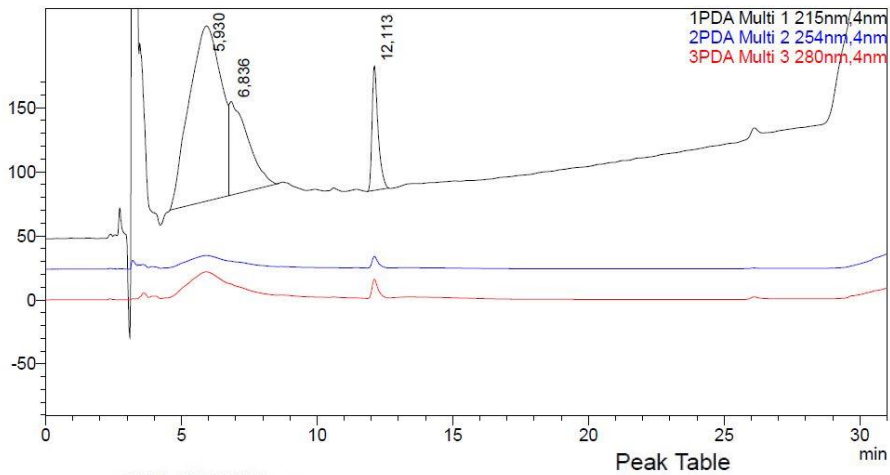
4.2.1 HPLC-Methoden

4.2.1.1 Analytische Methoden

Um die Reinheit der synthetisierten Peptide festzustellen, wurde eine Reihe von HPLC-Methoden entwickelt. Als Lösungsmittel wurden Acetonitril und entmineralisiertes Wasser in verschiedenen Verhältnissen verwendet. Zu beiden Lösungsmitteln wurde 0,1 % Trifluoressigsäure hinzugefügt, was die Peakauflösung wesentlich verbessert hat. In Abbildung 5 und 6 ist der Unterschied in der Auflösung deutlich zu sehen. Abbildung 5 zeigt die Analyse eines synthetisierten Tetrapeptids (HfRW) vor der Aufreinigung, wobei kein Trifluoressigsäurezusatz in den Laufmitteln verwendet wurde.

<Chromatogram>

mAU



| PDA Ch1 215nm | | | | |
|---------------|-----------|----------|--------|---------|
| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area% |
| 1 | 5,930 | 11226923 | 136695 | 68,983 |
| 2 | 6,836 | 3552199 | 73150 | 21,826 |
| 3 | 12,113 | 1495862 | 97116 | 9,191 |
| Total | | 16274983 | 306961 | 100,000 |

Abb. 5 Chromatogramm der Analyse von einem Tetrapeptid (HfRW) **ohne** Trifluoressigsäurezusatz in den Laufmitteln

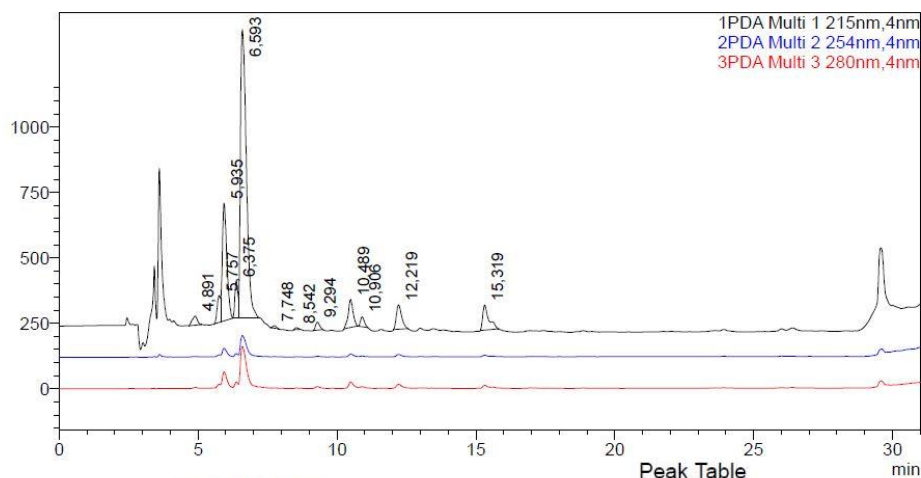
Der verwendete Gradient beginnt bei 80 % entmineralisiertem Wasser und 20 % Acetonitril und endet nach 25 Minuten bei 65 % Wasser/35 % Acetonitril. Anschließend wurde die Säule mit 90 % Acetonitril gewaschen. Die schwarze Linie zeigt das Chromatogramm bei 215 nm, die blaue bei 254 nm und die rote bei 280 nm.

Im Doppelpeak bei 5,930 und 6,836 Minuten befindet sich das Tetrapeptid HfRW, die Peaks sind jedoch nicht aufgetrennt, wodurch eine Differenzierung zwischen Peptid und Verunreinigung nicht möglich ist. Der Peak bei 12,113 Minuten stellt eine weitere Verunreinigung dar.

In Abbildung 6 ist dieselbe Analyse zu sehen, jedoch mit 0,1 % Trifluoressigsäure sowohl im entmineralisierten Wasser als auch im Acetonitril. Die Probe, das Gradientenprofil, die Säule und die verwendete HPLC-Anlage sind in beiden Fällen völlig ident. Wie deutlich zu sehen ist, kann durch den Zusatz von Trifluoressigsäure sowohl eine stabile Basislinie als auch eine weitaus bessere Peakauflösung erzielt werden.

<Chromatogram>

mAU



| PDA Ch1 215nm | | | | |
|---------------|-----------|----------|---------|---------|
| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area% |
| 1 | 4,891 | 434737 | 34556 | 1,514 |
| 2 | 5,757 | 852381 | 102602 | 2,968 |
| 3 | 5,935 | 5121771 | 448284 | 17,832 |
| 4 | 6,375 | 1051231 | 141424 | 3,660 |
| 5 | 6,593 | 16428656 | 1099400 | 57,199 |
| 6 | 7,748 | 81900 | 9715 | 0,285 |
| 7 | 8,542 | 60014 | 7877 | 0,209 |
| 8 | 9,294 | 317566 | 30882 | 1,106 |
| 9 | 10,489 | 1312661 | 107087 | 4,570 |
| 10 | 10,906 | 368944 | 37500 | 1,285 |
| 11 | 12,219 | 1230565 | 92864 | 4,284 |
| 12 | 15,319 | 1461597 | 95504 | 5,089 |
| Total | | 28722022 | 2207696 | 100,000 |

Abb. 6 Chromatogramm der Analyse von einem Tetrapeptid (HfRW) mit Trifluoressigsäurezusatz in den Laufmitteln

Beschreibung der Bedingungen siehe Abbildung 5

Der Hauptpeak des Chromatogramms bei 6,593 Minuten ist der des Tetrapeptids HfRW. Die Peakauflösung ist deutlich besser als in Abbildung 5, wodurch die restlichen Peaks, die Verunreinigungen darstellen, sichtbar werden. Durch hohe Peakauflösung ist eine klare Abgrenzung zwischen den Peaks erkennbar, welche nachfolgend in der präparativen Analyse ein exaktes Fraktionssammeln ermöglicht.

Um die optimalen Verhältnisse der Lösungsmittel zu finden, wurde das folgende Gradientenprotokoll verwendet: Beginn mit 100 % Wasser, Gradientenprofil 0-90 % Acetonitril über 90 Minuten. Um Lösungsmittel zu sparen, wurde anschließend auf den Bereich mit dem größten Peak fokussiert und die Laufzeit gekürzt. Am Ende jedes Laufs wurde über fünf Minuten mit 90 % Acetonitril gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen aus der Säule zu spülen. Die genauen Gradienten und Laufbedingungen der einzelnen Substanzen werden im experimentellen Teil detailliert beschrieben. Bei allen Analysen dieser Art wurden Umkehrphasensäulen benutzt, die Auflistung der Komponenten der HPLC-Systeme sind unter Punkt 3.2.2 nachzulesen, es wurden die Geräte A1, A/S1 und A/S2 verwendet.

4.2.1.2 Präparative Methoden

Basierend auf den Methoden der analytischen HPLC wurden die Methoden für die präparativen Läufe erstellt. Hierbei wurde ein möglichst geringer Gradient mit einer etwas verlängerten Zeit gewählt, der den Peptid-Peak gut darstellt und Fraktionen sammeln lässt. Ebenfalls wurde nach der Zeit für die Trennung die Acetonitril-Konzentration auf 90 % erhöht und anschließend wieder auf den Ausgangswert gesenkt.

4.2.2 NMR-Experimente

Alle synthetisierten Substanzen wurden mittels NMR-Spektroskopie analysiert und so auf ihre korrekte Darstellung kontrolliert. Die verwendeten Messmethoden inkludieren sowohl eindimensionale ^1H - und ^{13}C -Experimente als auch 2D-Methoden wie correlated spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) und heteronuclear single quantum coherence (HSQC). Als interner Standard wurde – wenn möglich – das Lösungsmittelsignal (z.B. bei CDCl_3) oder eine bekannte Verunreinigung durch einen Hilfsstoff (z.B. Essigsäure) verwendet. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben, für die Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quadruplett), dd (dublettisches Dublett), m (Multiplet)

4.2.3 Massenspektrometrie

Ebenfalls zur Kontrolle der Synthesen und der Endprodukte wurden massenspektroskopische Untersuchungen mittels Elektronenspray-Ionisation (ESI) durchgeführt. Die Proben wurden in Methanol (HPLC grade) gelöst und sofort vermessen. Zur einfachen Reaktionskontrolle wurden die Proben an einem ESI-Gerät mit Ionenfallen-Analysator gemessen, wodurch der Molpeak eines Moleküls meist als Addukt mit Wasserstoff, Natrium oder Kalium zu sehen war. Um eine genauere Bestimmung zu erhalten, wurden z.B. die aufgereinigten Peptide zusätzlich auf einem hochauflösenden Gerät mit ESI-Quelle und Time of flight (TOF)-Analysator untersucht, wobei hier sowohl einfache als auch Tandem-Messungen (MS-MS) zur Sequenzanalyse durchgeführt wurden.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultivierung der Zellen

Die beiden metastasierenden Melanomzelllinien (A375 und 518A2) wurden in DMEM high glucose Medium mit einem Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin und Streptomycin bei 37 °C unter einem konstanten 5 % CO₂ -Strom kultiviert. Alle drei WM-Zelllinien, die aus der frühen, radial wachsenden Phase eines Melanoms stammen, wurden in DMEM/Ham's F12 Medium unter Zusatz von 20 mM HEPES (pH 7,4), 2 % (v/v) fötalem Kälberserum, 20 mM L-Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin und Streptomycin, ebenfalls bei 37 °C und 5 % konstantem CO₂ -Strom gezüchtet. Üblicherweise wurden die Zellen in T-75 cm² Flaschen gezüchtet, bis sie 80 % Konfluenz erreichten und ca. alle drei bis vier Tage passagiert (Passagenummer zwischen 10-30). Von diesen Vorratsflaschen wurden die Zellen für Experimente in verschiedene Kulturgefäße abgezweigt und ausgesät.

4.3.2 Passagieren

Generell wurde zuerst das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde PBS ebenfalls entfernt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA versetzt. Nach 5-8 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C wurde frisches Medium hinzugefügt und die Zellen in ein Falcon tube überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 3-6x10⁵ Zellen gemeinsam mit 13 ml Medium in eine neue T-75 cm² Flasche eingesetzt.

4.3.3 Zellzahlbestimmung und Aussaat

Um die korrekte Zellzahl zu bestimmen und anschließend einsetzen zu können, wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt, durchmischt und 10 µl der Lösung in eine Bürker-Türk-Zählkammer pipettiert. Die Summe der in vier Quadranten gezählten, lebenden Zellen wurde halbiert, um die Verdünnung im ersten Schritt zu korrigieren. Das gemittelte Ergebnis von zwei Zählungen ergab die Zellzahl x10⁴ pro ml der ursprünglichen Zellsuspension. Schlussendlich wurde das Volumen, das die gewünschte Zellzahl für die Aussaat beinhaltet, berechnet und mit frischem Medium auf das gewünschte Gesamtvolumen ergänzt.

4.3.4 Einfrieren und Auftauen von Vorratsaliquoten

Da sich die beschriebenen Zelllinien am Institut für Pharmakologie in ständiger Kultur befanden, wurden Zellen für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente direkt von einer bereits vorhandenen Vorratsflasche aliquotiert. Der Vollständigkeit halber soll hier aber auch das generelle Protokoll zum Einfrieren und Auftauen von Zellen beschrieben werden. Um einen Vorrat anzulegen, wurde die Zellsuspension fünf Minuten lang bei Raumtemperatur und 900 rpm (Multi-Function Bench Top Zentrifuge BR4i, Jourdan) zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 90 % fötalem Kälberserum und 10 % DMSO resuspendiert und in spezielle Cryo-Vials überführt. Die Vials wurden langsam auf -80 °C gekühlt und bei dieser Temperatur gelagert. Für die Wiederaufnahme dieser Vorratsaliquote wurde das Vial im Wasserbad bei 37 °C vollständig aufgetaut und mit 10 ml des entsprechenden Mediums versetzt. Anschließend wurde fünf Minuten lang bei 1200 rpm (Multi-Function Bench Top Zentrifuge BR4i, Jourdan) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in neuem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach in eine T-75 cm² Flasche überführt und mit 13 ml Medium ergänzt.

4.4 Biologische Testungen

4.4.1 mRNA Isolierung

Für die Durchführung von PCR-Experimenten wurde jeweils die mRNA aus den Zelllinien isoliert. Dabei wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet und die Isolation laut den Herstellerangaben durchgeführt. Da durch die Lyse der Zellen auch DNA mitextrahiert wird, muss diese im Zuge der Isolation durch Hydrolyse abgetrennt werden. Die erhaltene mRNA wurde photometrisch bei 260 nm vermessen und die Reinheit durch das Verhältnis A260/A280 und A260/A230 bestimmt. Infolgedessen wurden nur Proben weiterverwendet, die mindestens einen Wert von 1,8 – 2 aufwiesen.

4.4.2 Umschreiben der mRNA in cDNA

Die isolierte mRNA muss anschließend in komplementäre (complementary) DNA (cDNA) umgewandelt werden, welche später für die PCR verwendet werden kann. Durch das Enzym reverse Transkriptase und mithilfe eines „degenerierten“ Primermixes wird aus Nukleotidbausteinen die komplementäre

DNA zur mRNA synthetisiert. Dies erfolgt bei 42 °C über 60 Minuten, wobei die Reaktionsmischung anschließend zum Beenden für fünf Minuten auf 70 °C erhitzt wird. Die Konzentration der entstandenen cDNA wurde nun ebenfalls photometrisch vermessen und kontrolliert.

4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR selbst wurde durchgeführt, um das Vorhandensein der fünf Melanocortin-Rezeptor Isoformen in den gegebenen Zelllinien zu überprüfen. Dabei wird die cDNA als „Kopiervorlage“ verwendet. Spezifische Primer, die für die Isoformen der Rezeptoren selektiv sind, hybridisieren mit der cDNA und werden mittels der taq-Polymerase amplifiziert. Damit vermehrt sich der gewünschte Abschnitt der DNA und kann in einem Agarose-Gel visualisiert werden. Das Grundschema der PCR besteht aus dem initialen Aufschmelzen der cDNA-Stränge zu Beginn (5 Minuten bei 95 °C), gefolgt von 35-40 Zyklen, die ebenfalls mit je 30 Sekunden bei 95 °C beginnen, anschließend 30 Sekunden bei 45 – 68 °C, die die Hybridisierung der Primer an die cDNA erlauben und zum Schluss der Elongation der DNA Stränge für 20 Sekunden bei 72 °C. Abschließend erfolgt eine finale Elongation für 5 Minuten bei 72 °C. Nach dem Ende der PCR werden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gehalten.

4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die bei der PCR amplifizierten Abschnitte der DNA nun sichtbar machen zu können, wurden die Proben auf ein Agarose-Gel (2 %) geladen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Als Anhaltspunkt für die Größe der Fragmente wurde ein passender Marker aufgetragen, der im gewünschten Bereich zwischen 100 und 1000 Basenpaaren jeweils im Abstand von 100 Basenpaaren Längen des PCR-Amplicons abschätzbar macht. Unter UV-Licht wurde die mit Bromphenolblau markierte DNA visualisiert, eingescannt und als tif-file abgespeichert.

4.4.5 cAMP assays

Die Melanocortinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche nach der Aktivierung durch einen Liganden die Adenylylcyclase aktivieren und dadurch die Umwandlung von

ATP zu cAMP katalysieren. Mithilfe dieses Botenstoffs kann eine Aktivierung des Rezeptors und so die Bindung eines Liganden nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der cAMP Synthese wurden in der vorliegenden Arbeit Melanomzellen mit radioaktiv markiertem [³H] Adenin beladen. In weiterer Folge wird das markierte Adenin in ATP, ADP und cAMP eingebaut. Die Zellen wurden in Sechs-Well-Platten ausgesät, sodass zum Zeitpunkt des Experiments 1×10^6 Zellen pro Well vorhanden waren. Anschließend wurden 5 µCi Radioaktivität pro ml Zellmedium eingesetzt und 16 Stunden inkubiert. Vor Beginn des Experiments wurde das Medium entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die einzelnen Wells mit je einem ml Inkubationspuffer und den zu untersuchenden Substanzen versetzt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Substanz und Konzentration wurden je drei Bestimmungen durchgeführt, um Triplikate zu erhalten. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde das Inkubationsmedium entfernt und 1 ml eiskalter Aufschlusspuffer hinzugefügt. Die Platten wurden auf Eis eine weitere halbe Stunde inkubiert und anschließend 900 µl des klaren Überstandes in ein Teströhrchen überführt. Dazu wurden je 90 µl KOH (4,2 M) pipettiert und der pH-Wert auf 7 korrigiert. Nun wurde der flüssige Teil der Proben säulenchromatographisch aufgetrennt, um selektiv cAMP nachweisen zu können und die anderen Purine abzutrennen. Dies geschah durch sequentielle Chromatographie zuerst mit Dowex 50 und anschließend mit neutralen Aluminiumoxid-Säulen (Herstellung der Säulen siehe unten). Die Dowex-Säulen wurden dreimal mit je 1 ml MilliQ-Wasser gewaschen, der Durchfluss und die drei Waschschrte wurden in einem Szintillationsröhrchen aufgefangen und separat analysiert. Durch die Waschschrte wurde der Großteil der restlichen Purine entfernt und cAMP wurde nun durch zweimal 2 ml MilliQ-Wasser auf die Aluminiumoxid-Säulen eluiert. Diese binden ATP irreversibel, wodurch die Hintergrundstrahlung auf ein Minimum reduziert wird. Mit zwei Mal 3 ml Imidazolpuffer wird cAMP schließlich von den Säulen gewaschen und ebenfalls in Szintillationsgefäßen aufgefangen. Nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit wurden die Proben für je 2,5 Minuten am Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen.

4.4.5.1 Herstellung der Säulen

Um ein Austreten des Säulenmaterials zu verhindern, wurde zuerst in jeder Säule mit Glaswolle eine Art Filter erzeugt. Anschließend wurden die Säulenmaterialien nach den untenstehenden Vorschriften präpariert und in die vorbereiteten Säulen überführt.

Dowex AG 50W-X4:

- Suspension von 50 g Harz und 500 ml MilliQ-Wasser herstellen, Überstand verwerfen
- 500 ml 1 N HCl hinzufügen, 10 Minuten unter gelegentlichem Umschütteln stehen lassen, Überstand verwerfen
- Vorigen Punkt mit je 1000 ml MilliQ-Wasser, 500 ml 1 N NaOH und wieder 1000 ml MilliQ-Wasser wiederholen
- Dowex in MilliQ-Wasser 1:1 resuspendieren
- 2 ml Suspension pro Säule auftragen, anschließend mit 3 ml 1 N HCl waschen

Aluminiumoxid:

- 0,75 g neutrales Aluminiumoxid in eine Phiole wägen
- 3 ml einer 100 mM Imidazolösung pH 7,5 hinzufügen, durchmischen und 12-16 Stunden equilibrieren lassen
- Suspension durchmischen und in die Säulen pipettieren

4.4.5.1 Regeneration der Säulen

Dowex Säulen werden zuerst mit 3 ml 1 N HCl, anschließend mit 3x5 ml MilliQ-Wasser regeneriert, Aluminiumoxid-Säulen mit 4x5 ml Imidazolpuffer und 2x5 ml MilliQ-Wasser.

4.4.6 Proliferationsassays

Um alle neu synthetisierten Substanzen auf ihre eventuell wachstumsbeeinflussende Wirkung zu testen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Der verwendete Test-Kit EZ4U der Firma Biomedica enthält eine gelbgefärbte Tetrazolium-Verbindung, die durch lebende Zellen in ein ziegelrotes Formazan-Derivat umgewandelt wird. Die Zellen wurden zu Beginn des Assays in entsprechende Multiwell-Platten ausgesät und für 24 Stunden zum Anwachsen unbehandelt kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt, durch ein frisches ersetzt und die zu untersuchenden Substanzen wurden ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das Substrat des Test-Kits hinzugefügt und die Platten drei Stunden bei 37 °C im Inkubator belassen. Die Messung der

Farbintensität erfolgte mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 620 nm als Referenzwellenlänge zur Korrektur etwaiger Absorptionen durch Zellbruchstücke oder ähnlichem.

4.5 Tape Stripping

Da es ein Ziel dieser Arbeit war, die mögliche topische Anwendung der synthetisierten Melanocortin-Derivate zu untersuchen, wurden Tape Stripping-Versuche an exzidierten Schweineohren durchgeführt. Diese Methode erlaubt es nach Applikation einer Formulierung durch kontinuierliches Auftragen und Abziehen von Klebestreifen einzelne Zellschichten des Stratum corneum abzutragen und anschließend den darin befindlichen Gehalt an Wirkstoff zu analysieren. Die abgezogenen Korneozyten variieren in ihrer Menge, weshalb nicht direkt von der Anzahl der Klebestreifen auf die Penetrationstiefe geschlossen werden kann. Um dies exakt zu bestimmen, wurde auf den Streifen die Abnahme der Lichtintensität eines Lasers bei 850 nm (Pseudoabsorption) mittels Nahfeld-Infrarot-Densitometrie vermessen. Diese Pseudoabsorption wird mithilfe eines Proportionalitätsfaktors in die Menge Stratum corneum Protein in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ umgewandelt. Von diesem Wert ausgehend wird – unter Berücksichtigung der mittleren Proteindichte – auf die Penetrationstiefe geschlossen.

Das Protokoll für eine solche Bestimmung beginnt mit dem vorsichtigen Auftauen der tiefgefrorenen Ohren, die anschließend ab gespült und abgetrocknet wurden. Anschließend wurde der große Knorpel zur besseren Bearbeitung entfernt, drei repräsentative Stellen zu je 4 cm^2 ausgesucht und die vorhandenen Haare gekürzt. Pro Stelle wurde nun eine definierte Menge von $5\ \mu\text{l}$ pro cm^2 an Formulierung aufgetragen und eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Klebestreifen gleichmäßig abgezogen. Auf jedem Streifen wurde die Pseudoabsorption vermessen, danach wurde jeder Streifen mit 2 ml Methanol in einem Eppendorfgefäß versetzt und der Wirkstoff 12 Minuten mithilfe eines Ultraschallbades vom Streifen eluiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 12000 rpm wurde 1 ml des Überstandes in ein HPLC-Vial überführt und analysiert. Die Analytik wurde analog zur Aufreinigung des verwendeten Peptids durchgeführt, die verwendeten HPLC-Geräte sind unter Punkt 3.2.2 nachzulesen, wobei die beiden Systeme zur analytischen und semipräparativen Trennung (A/S1 und A/S2) benutzt wurden. Als Säule wurde für alle Bestimmungen Clarity® $5\ \mu\text{m}$ Oligo-RP, $250 \times 4,6\ \text{mm}$ (Phenomenex) herangezogen. Das Gradientenprotokoll startete mit 20 % Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure und 80 % Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure und wurde innerhalb von 10 Minuten auf 27 % Acetonitril gesteigert. Abschließend wurde die Säule mit 90 % Acetonitril für 5 Minuten gewaschen.

4.6 Franz-Zell-Versuche

Die Franz-Diffusionszelle ist ein Zwei-Kompartimentsystem, mit dem topische Formulierungen auf ihre Permeationsfähigkeit analysiert werden können. Die Donor- und Akzeptorkammer sind durch eine Modellmembran getrennt, die in diesem Fall aus porziner Abdominal- bzw. Ohrhaut bestand. Durch Zuschneiden mit einem Dermatome wurde die fixierte Dicke von 700 μm erreicht, der Aufbau der Franz-Zellen selbst ergab eine definierte Permeationsfläche von 0,95 cm^2 .

Die Durchführung einer Versuchsanordnung begann mit dem Zurechtschneiden der Modellmembran, welche anschließend in die Franz-Zelle eingespannt wurde. In das untere Kompartiment wurden anschließend 2 ml Phosphatpuffer eingebracht, in den Glaszylinder des Oberteils 500 mg Peptidlösung. Das Akzeptormedium wurde ständig mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten und nach jeweils 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden komplett entnommen und durch frischen Phosphatpuffer ersetzt. Die so gewonnenen Proben wurden sechs Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert und 1 ml des Überstandes in ein HPLC-Vial überführt. Die HPLC-Analytik wurde analog zu den Proben der Tape Stripping Versuche durchgeführt.

4.7 In silico Studien

4.7.1 Filtern der Liganden, Extraktion von Liganden

Um die bereits publizierten Liganden am Melanocortin-1-Rezeptor zu evaluieren und in silico Modelle erstellen zu können, wurde die ChEMBL Datenbank verwendet und durchsucht. Diese Datenbank bietet eine umfassende Sammlung von aktiven Molekülen mit arzneimittelähnlichen Eigenschaften, welche nach verschiedenen Kriterien wie Verbindung, Zielprotein oder Art des Experiments sortiert und durchsucht werden kann. Als Hilfsmittel, um die gewonnenen Daten besser organisieren und verarbeiten zu können, wurde KNIME Analytics Platform (Version 3.1.2) benutzt. Zusätzlich zu den Standardknoten wurde von der LigandScout-Erweiterung der Knoten „ChEMBL-DB Extractor“ verwendet, welcher die Moleküle eines gewünschten Targets aus der Datenbank extrahiert. Anschließend wurden die gefundenen Liganden durch einen Filter begrenzt, wodurch nur Moleküle unter 1000 g/mol Molekulargewicht, welche einen geringeren Aktivitätswert als 50 nM aufwiesen und am menschlichen Organismus getestet wurden, weiter verwendet wurden.

4.7.2 Clustern von Liganden

Nach dem Ausschluss von Dubletten wurden die Einträge nach chemischen Eigenschaften mithilfe des „Pharmacophore/Molecule Clustering“ Knotens geclustert und in ein SD-File umgewandelt. Die Clusterbildung wurde mittels Extended Connectivity Fingerprints (ECFP4) als Molekül-Repräsentation und Tanimoto Ähnlichkeits-Scores durchgeführt. Hierbei wird für jedes Molekül ein Fingerprint im Binärcode generiert, welcher anschließend mit allen anderen auf seine Ähnlichkeit verglichen wird. So ergeben sich Gruppen bzw. Cluster, die ähnliche Strukturen und Funktionalitäten aufweisen.

4.7.3 Erstellung von Pharmakophoren

Die Pharmakophorgenerierung wurde mithilfe des Programms LigandScout (Version 4.1.4, Inte:Ligand) durchgeführt. Die selektierten und geclusterten Liganden wurden als Test-Set verwendet und aus den einzelnen Clustern ligandenbasierte Pharmakophore berechnet. Diese Pharmakophore wurden anschließend miteinander und mit dem natürlichen Liganden des MC1R verglichen und in der Alignment-Ansicht gegeneinander ausgerichtet.

5 Hauptteil

5.1 Synthese von modifizierten Aminosäurebausteinen

Als Ausgangspunkt für die Synthese von simplifizierten Analoga des α -MSH (Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂) diente das in Abbildung 7 dargestellte, in der Literatur bereits beschriebene Tripeptid, bestehend aus einer Histidin-, einer Tyrosin- und einer Phenylpiperidinketoneinheit¹. Dieses hat in biologischen Testungen Aktivität am Melanocortin-1-Rezeptor gezeigt und weist eine kleinere Molmasse (559,70 g/mol) als viele bisher publizierte Liganden auf.

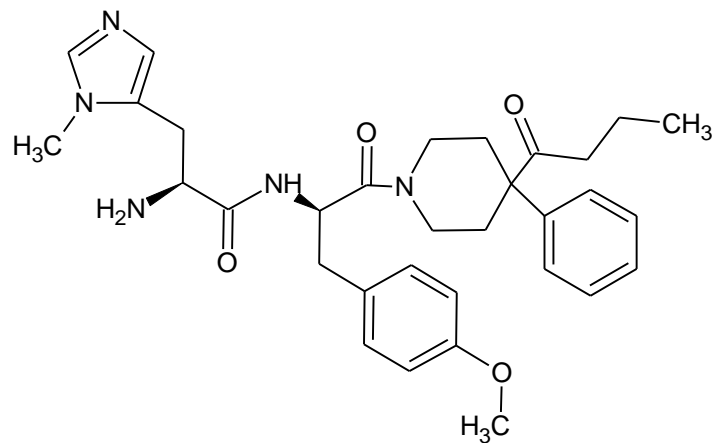


Abb. 7 Tripeptidvorlage nach Herpin et al. 2002

Die Vorlage besteht aus einem methylierten Histidin-, einem methylierten Tyrosin- und einem Phenylpiperidinketonbaustein.

Die drei Aminosäureanaloga, die für die Synthese des in Abbildung 7 dargestellten Tripeptids benötigt wurden, sind ein π -N-methyliertes Histidin, ein O-methyliertes D-Tyrosin und ein Phenylpiperidincarbonsäure-Derivat. Es war geplant, jeden dieser drei Bausteine separat zu modifizieren, um in weiterer Folge kombinatorisch eine Bibliothek von Tripeptiden zu erhalten.

5.1.1 Modifikation von Histidin

Die Untersuchungen und Syntheseveruche zur Modifikation von Histidin wurden in der Arbeitsgruppe von zwei Kollegen (Mag. Philipp Wagner, Mag. Sebastian Schober, Institut für pharmazeutische Chemie, Althanstraße 14, 1090 Wien) durchgeführt, der Vollständigkeit halber soll hier aber auch eine kurze Zusammenfassung der Erkenntnisse präsentiert werden.

Die Einführung einer Methylgruppe am proximalen Stickstoff des Histidin-Ringes erhöht die Rezeptorselektivität MC1R/MC4R signifikant.¹ Der Konformation im Bereich des Imidazolringes ist daher besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

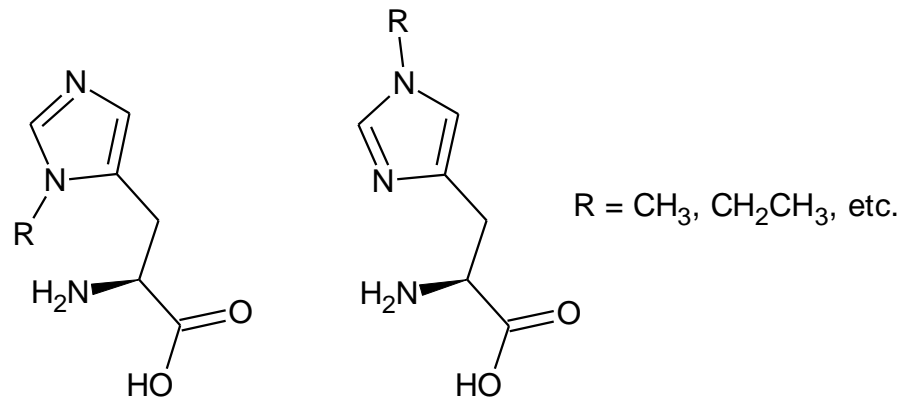


Abb. 8 Mögliche Alkylierungsstellen am Histidin

Die linke Struktur zeigt eine Alkylierung am π - (N1), die rechte am τ -Stickstoff (N3). Vorangegangene Studien zeigten, dass eine Substitution am proximalen Stickstoff die Rezeptorselektivität zugunsten des MC1R verschiebt.¹

Das genannte N_{π} -Methyl-histidin ist zwar kommerziell erhältlich, aber extrem teuer, sodass in parallel laufenden Diplomarbeiten nicht nur versucht wurde dieses Histidin-Derivat selbst herzustellen sondern auch Histidin-Analoga zugänglich zu machen, die sich durch unterschiedliche Substitutionsmuster im angesprochenen Molekülbereich auszeichnen (Abb. 8). Zusätzlich war auch geplant, heterocyclische Aminosäuren (mit einem bzw. zwei Ring-Stickstoffen) zu untersuchen, deren Stickstoff-Atom bzw. -Atome höhere Basizität besitzen, sodass die Rezeptoraffinität durch elektrostatische Wechselwirkungen unterstützt werden kann.

Hierbei erwies sich Histidin durch seine hohe Polarität und gute Wasserlöslichkeit als anspruchsvolles Edukt, welches erst durch den Einsatz großer, lipophiler Schutzgruppen vernünftig handzuhaben ist.

Die selektive Alkylierung eines Ring-Stickstoffatoms ist nur möglich, wenn jeweils das andere Stickstoffatom durch eine Schutzgruppe zwischenzeitlich blockiert wird.

S. Schober hat im Rahmen seiner Diplomarbeit⁵⁰ diese Reaktionen näher untersucht und einem kritischen Vergleich unterzogen. Die selektive Methylierung am τ -Stickstoff gestaltet sich hier einfacher, da eine selektive Schützung des π -Stickstoffs über eine Brückenbildung zur α -Aminogruppe möglich ist, beispielsweise durch Bildung eines Harnstoff-Derivats mit Carbonyldiimidazol⁵¹. Im Anschluss lässt sich der terminale Stickstoff methylieren. Die Alkylierung ist auch mit anderen Alkylhalogeniden durchführbar und konnte ohne größere Probleme nachvollzogen werden.

Die selektive Methylierung am π -Stickstoff ist hingegen schwieriger durchzuführen. Hier bietet sich die Benzoylierung des τ -Stickstoffs an. Nach Beyerman et al. wurde das N_{α} , N_{τ} -Dibenzoylderivat

erhalten.⁵² Jedoch erwies sich die Benzoylgruppe als Schutzgruppe nicht stabil genug - sie verringert überdies die Nucleophilie des zu alkylierenden Stickstoffs, was die Reaktion erschwert. Ohne Zusatz von Base fand keine Reaktion mit Methyljodid statt, bei Basenzusatz führen selbst schwache Basen zur Abspaltung der Benzoylgruppe, sodass letztlich doppelt methylierte Histidinderivate erhalten wurden.

Besonderes Interesse könnte das N_{α} , N_{π} -überbrückte Histidin-Derivat als Ausgangsverbindung für die Synthese rigidisierter N_{π} -Methyl-Analoga beanspruchen. Diese ist Gegenstand von aktuell laufenden Diplomarbeiten, Zielverbindungen stehen aber gegenwärtig noch nicht zur Verfügung.

5.1.2 Alkylierung von Tyrosin

Im oben erwähnten Tripeptid befindet sich an Position 2 Tyrosin, das an der Hydroxygruppe methyliert ist. Um hier auf Struktur-Wirkungsbeziehungen schließen zu können, wurde geplant, in dieser Position die natürlichen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin sowie die abgewandelten Derivate des Tyrosins, O-Methyl- und O-Ethyltyrosin einzusetzen und zu vergleichen.

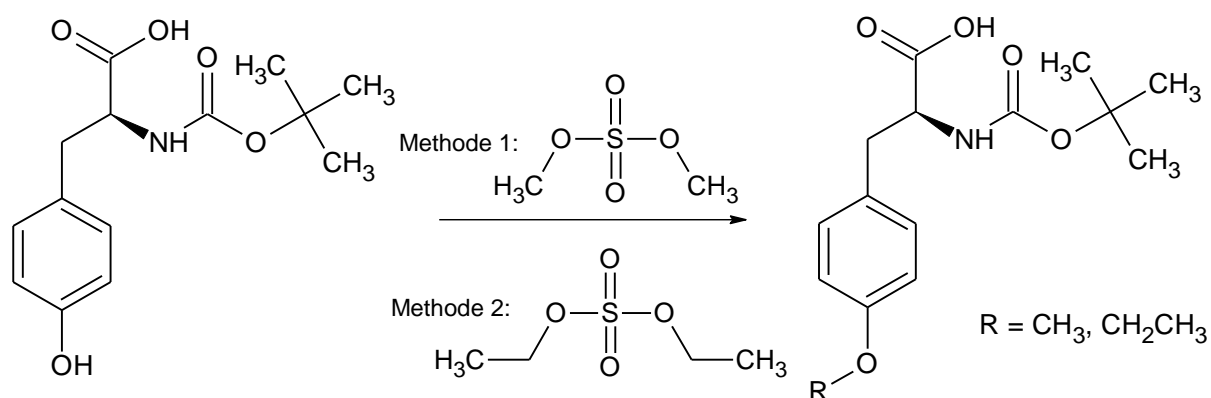


Abb. 9 Syntheschema für die Generierung von O-Methyl- bzw. O-Ethyl-Boc-L-Tyrosin

Methode 1: Dimethylsulfat, NaOH 4 M, Raumtemperatur, 2 h

Methode 2: Diethylsulfat, NaOH 4 M, Raumtemperatur, 2 h

Als Startpunkt wurde Boc-L-Tyrosin (Abb. 9) verwendet, wobei die Schutzgruppe in Hinblick auf eine mögliche Anwendbarkeit in der Peptidsynthese gewählt wurde. Boc-L-Tyrosin konnte mit Dimethylsulfat problemlos in hoher Ausbeute zu O-Methyltyrosin umgesetzt werden (siehe experimenteller Teil, Kapitel 7.1.6). Als zweite Variation wurde O-Ethyltyrosin gewählt, wobei die Arbeitsvorschrift ident blieb, jedoch Diethylsulfat anstelle von Dimethylsulfat verwendet wurde. Die Ethylierung war trotz der gleichen Bedingungen nicht erfolgreich, auch nach zusätzlicher Aufreinigung, die bei der Methylierung nicht notwendig war, konnte kein Produkt gewonnen werden. Zusätzlich kam

es durch das Ausschütteln mit sauren Reagenzien auch zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe, was im Falle der Methylierung nicht oder nur in geringem Ausmaß beobachtet wurde. Bei der Auswertung der Massenspektren des Rohprodukts der Ethylierung konnte für $[M+H]^+ = 310$ (m/z) kein passendes Signal detektiert werden, jedoch bei $m/z = 210,08$. Dieses Signal entspricht dem $[M+H]^+$ Peak des ungeschützten ethylierten Tyrosinderivats, ohne den Boc-Rest.

Auf eine weitere Verlängerung oder Modifikation der Seitenkette (Propyl-, Butyl- bzw. Phenylrest) wurde verzichtet, da auch die Simplifizierung der Strukturen ein Ziel war. Durch das Einbringen anderer Gruppen wäre das Molekül wieder sperriger geworden und das Molekulargewicht hätte sich erhöht, wodurch keine Simplifizierung erreicht worden wäre.

5.1.3 Variationen an der Phenylpiperidincarbonsäure

Die Phenylpiperidincarbonsäure ist ein zentrales Element in der Strukturvorlage des Tripeptids (siehe Kapitel 5.1), welches die beiden ersten Aminosäuren der ursprünglichen Sequenz **His-Phe**-Arg-Trp ersetzen soll. Durch die verschiedenen Gruppen innerhalb des Moleküls lässt es Modifikationen an unterschiedlichsten Stellen zu und kann daher als vielseitiger Baustein verwendet werden.

In Abbildung 10 wird das Schema gezeigt, das den ersten geplanten Syntheseweg zum Phenylpiperidincarbonsäurederivat darstellt. Dabei wurde versucht, den Piperidinring mittels Bis-(2-chlorethyl)-amin.HCl aufzubauen. Als erster Schritt sollte die Aminogruppe mit einem Benzyloxycarbonylrest geschützt werden, danach durch Zugabe von Phenylacetonitril mittels Bisalkylierung der Piperidinring geschlossen und anschließend das Nitril durch eine Grignard-Reaktion in ein Keton umgewandelt werden. Die Schutzgruppe wurde dahingehend ausgewählt, möglichst stabil bei weiteren Reaktionen zu sein, damit hier auf keine Einschränkungen bezüglich Säure- oder Basenlabilität Rücksicht genommen werden musste.

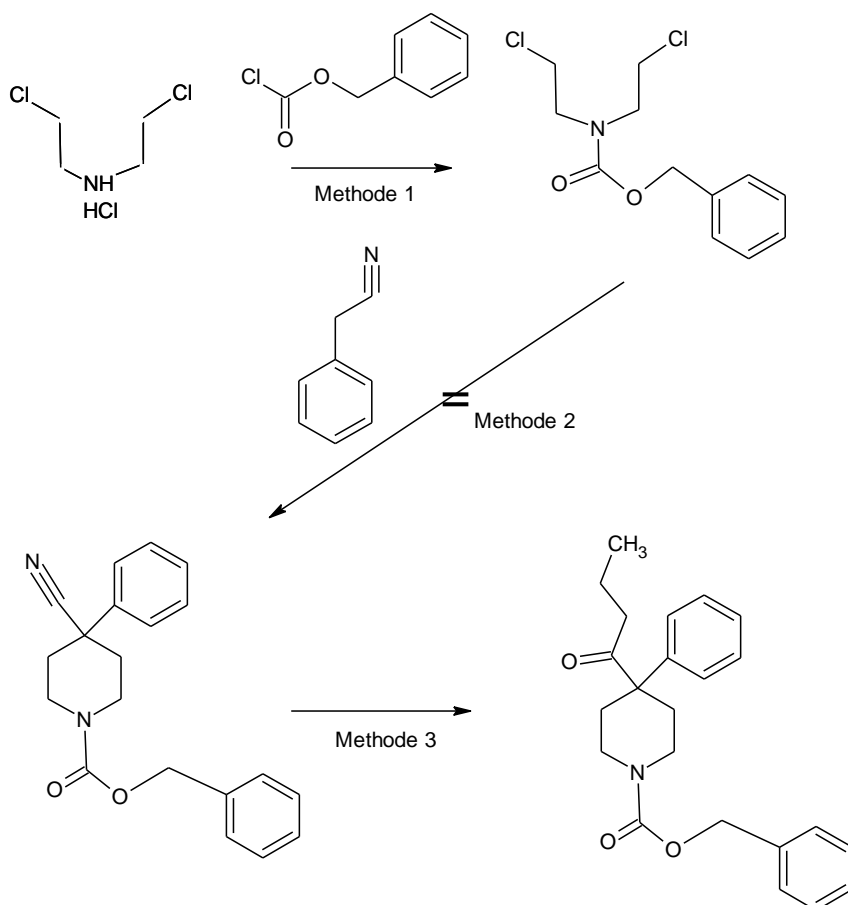


Abb. 10 Geplanter Syntheseweg vom Bis-(2-chlorethyl)-amin zum geschützten Phenylpiperidinketonderivat
 Methode 1: Diisopropylethylamin, Dichlormethan, 0 °C, 2 h
 Methode 2: Natriumhydrid, Tetrahydrofuran, 65 °C, 18 h
 Methode 3: Grignard-Reaktion zum entsprechenden Imin, anschließend Hydrolyse zum Keton

Das Anbringen der Schutzgruppe am Stickstoff war in kurzer Reaktionszeit (1 h) und mit guter Ausbeute (94 %) möglich, die anschließende Bisalkylierung mit Phenylacetoneitril war jedoch nicht erfolgreich. Die Reaktion wurde mit Natriumhydrid in wasserfreiem Tetrahydrofuran durchgeführt, wobei die Reaktionsmischung zuerst 24 Stunden bei 65 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die Dünnschichtchromatographie zeigte ein Stoffgemisch, welches säulenchromatographisch getrennt und mittels NMR analysiert wurde. Leider konnte in keiner der erhaltenen Fraktionen das gewünschte Produkt gefunden werden.

Daraufhin wurde ein neuer, einfacherer Ansatz gewählt. Hierbei wurde Phenylpiperidincarbonsäure Tosylat als Edukt verwendet, wieder mit einem Benzyloxycarbonylrest am Stickstoff geschützt und danach sollte die Carbonsäure in ein Weinrebamid umgewandelt werden. Das Amid sollte dann problemlos mithilfe eines Grignard-Reagens zu einem Keton umgewandelt werden. Abbildung 11 zeigt das alternative Syntheschema um zum Ketonderivat zu gelangen.

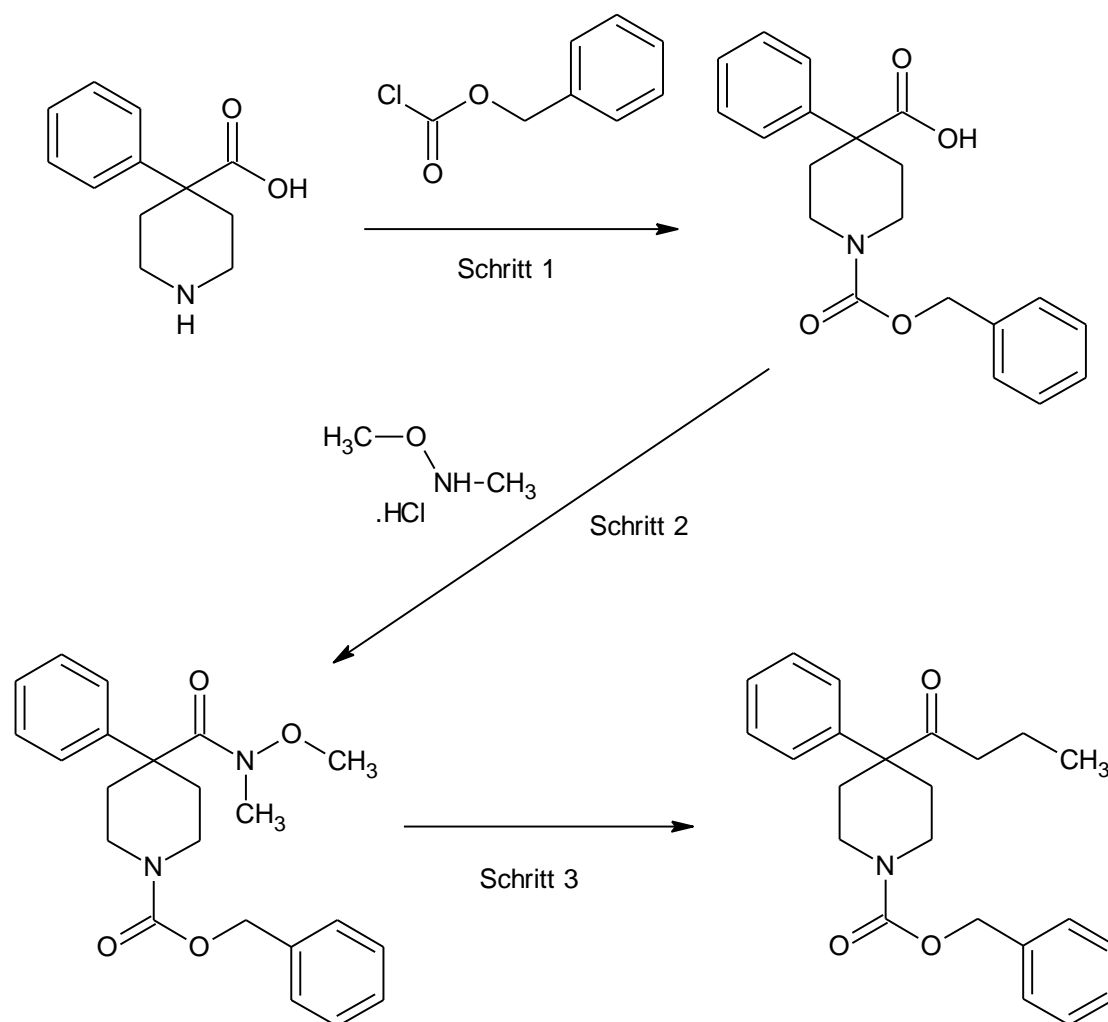


Abb. 11 Alternativer Syntheseweg von Phenylpiperidincarbonsäure zum geschützten Phenylpiperidinketonderivat

Schritt 1: K_2CO_3 , KOH, Methanol, von 0°C auf Raumtemperatur in 1 h, danach 48 h bei Raumtemperatur

Schritt 2: Die versuchten Methoden werden nachfolgend in den Kapiteln 5.1.2.1 bis 5.1.2.3 beschrieben.

Schritt 3: Grignard-Reaktion zum entsprechenden Keton

Das Einbringen der Schutzgruppe konnte problemlos in methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung durchgeführt werden, Chlorameisensäurebenzylester wurde dabei unter Eiskühlung hinzugefügt und bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt (Protokoll siehe experimenteller Teil Kapitel 7.1.1). Die Reinheit nach einer einfachen Aufreinigung war nach der Kontrolle mittels NMR bereits zufriedenstellend, eine anschließende Umkristallisation in Methanol ergab ein optimales Ergebnis. Zusätzlich war die Ausbeute von 96 % äußerst zufriedenstellend.

Der nachfolgende Schritt der Weinrebamid-Synthese erwies sich jedoch als deutlich schwieriger, obwohl die Umsetzung von Carbonsäuren zu diesen Amiden oft als einfach und effizient beschrieben wird.⁵³⁻⁵⁵ Nachfolgend werden die unterschiedlichen Ansätze, eingeteilt nach der Anzahl an benötigten Stufen, vorgestellt.

5.1.2.1 One-pot-Syntheseversuche

Die ersten Versuche für die Synthese des Weinrebamids wurden mit dem Anspruch einen möglichst einfachen Zugang in einem Schritt zu bieten, gesucht. Abbildung 12 zeigt einen Überblick über die Syntheseversuche, die in einem Schritt ohne zwischenzeitliche Aufreinigung durchgeführt wurden.

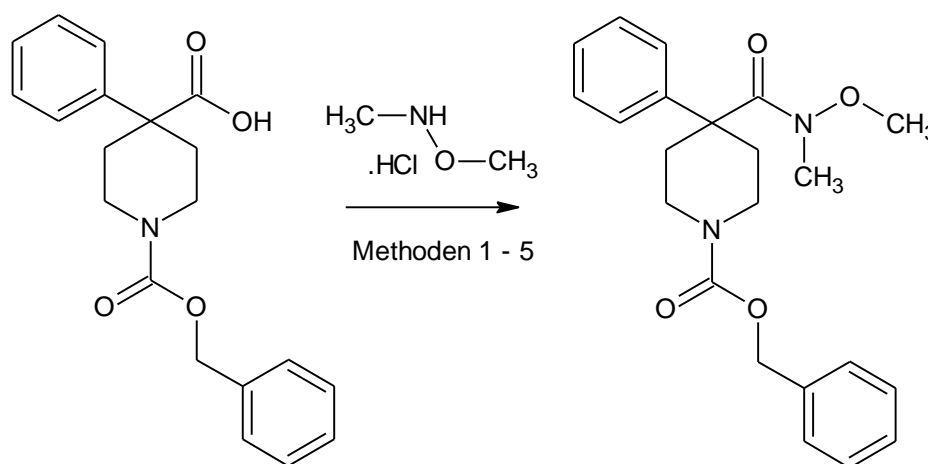


Abb. 12 Übersicht über die one-pot-Syntheseversuche

Methode 1: DCC, Triethylamin, Dichlormethan, Raumtemperatur, 18 h, unter Argon-Atmosphäre

Methode 2: CDI, K₂CO₃, Dichlormethan, Raumtemperatur, 18 h, unter Argon-Atmosphäre

Methode 3: 2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin, N-Methylmorpholin, Tetrahydrofuran, Raumtemperatur, 8 h, unter Argon-Atmosphäre

Methode 4: Triphenylphosphin, Trichloracetonitril, Triethylamin, Dichlormethan, Raumtemperatur, 2 h, unter Argon-Atmosphäre

Methode 5: Phosphortrichlorid, Triethylamin, Toluol, Zugabe der Reagenzien unter Eiskühlung, 15 min bei 0 °C, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt, danach 30 min bei 60 °C, unter Argon-Atmosphäre

Als vielversprechendes Reagens wurde N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ausgewählt, das gut mit Carboxylgruppen reagiert und einen Aktivester bildet, welcher mit Aminen zu Amiden umgesetzt wird. Das durch die Reaktion aus DCC entstehende Harnstoffderivat ist zusätzlich unlöslich in organischen Lösungsmitteln, fällt daher während der Reaktion aus und kann im Anschluss leicht abgetrennt werden.⁵⁶ Als Amin wurde bei sämtlichen Reaktionen N,O-Dimethylhydroxylamin.HCl (Weinrebamin) verwendet. Beim Versuch, die Reaktion mit der Phenylpiperidincarbonsäure durchzuführen, ließ sich

jedoch kein Niederschlag beobachten, welcher auf eine erfolgreiche Reaktion hindeuten würde, und es konnte nach der Aufarbeitung kein Produkt isoliert werden.

Ein ähnlicher Ansatz für die Synthese war die Aktivierung der Carbonsäure mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI). Hier kommt ein ähnliches Prinzip zum Tragen, die Carbonsäure wird durch CDI in ein Acylimidazol überführt, welches im Anschluss mit dem Weinrebamin zum Amid reagieren soll.⁵⁷ Diese Reaktion wurde mit unterschiedlichsten Hilfsbasen (K_2CO_3 , Triethylamin, Pyridin) und in verschiedenen Lösungsmitteln (Dimethylformamid, Tetrahydrofuran, Dichlormethan) versucht, es konnte jedoch in keinem Fall eine Umsetzung zum Weinrebamid festgestellt werden.

Da die Reaktion unter den oben genannten, mehrmals dokumentierten Bedingungen^{56,57} nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde die Suche auf weniger bekannte Reagenzien ausgedehnt. Allen nachfolgenden Reaktionen ist gemeinsam, dass jeweils zuerst ein Aktivester der Carbonsäure gebildet und anschließend die Umsetzung mit dem Weinrebamin durchgeführt wird. Zusätzlich wurde auch darauf geachtet eine kostengünstige Synthese zu wählen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden 2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin mit N-Methylmorpholin⁵⁸, Triphenylphosphin in Kombination mit Trichloracetonitril⁵⁴ bzw. Phosphortrichlorid zusammen mit Triethylamin⁵⁹ als Aktivierungsreagenzien bzw. Hilfsbasen verwendet. Trotz der teilweise in der Literatur beschriebenen kurzen Reaktionszeiten und guten Ausbeuten konnte mit keiner der oben genannten Methoden ein Weinrebamid synthetisiert werden. Entweder kam es zu einer Vielzahl an Produkten, die nur schlecht trennbar waren oder es fand überhaupt keine Reaktion statt. Als Referenz für den Erfolg der Synthese wurden die 1H - und ^{13}C -NMR-Signale der beiden CH_3 -Gruppen des Amids herangezogen, die durch die Reaktionen in das Molekül eingeführt werden sollten. Diese müssen z.B. als zwei Singulets im 1H -NMR im Spektrum des Edukts nicht, im Produkt jedoch sehr deutlich sichtbar sein. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der fünf beschriebenen Methoden; wie bereits beschrieben, konnte bei keiner der versuchten Synthesen das gewünschte Produkt detektiert werden. Als Vergleich wurden gängige Verschiebungen in 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren dieser funktionellen Gruppen herangezogen^{60,61} und simulierte Signale des Moleküls, welche mithilfe von zwei Prediction tools (nmrdb.org) berechnet wurden⁶².

| Bezeichnung | Chemische Verschiebung $^1\text{H-NMR}$ | | Chemische Verschiebung $^{13}\text{C-NMR}$ | |
|---|---|-----------------|--|-----------------|
| | NCH_3 | NOCH_3 | NCH_3 | NOCH_3 |
| Phenylpiperidin-carbonsäure (Edukt) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Erwarteter Signalbereich | 3,3 – 2,7 ppm | 3,5 – 3,0 ppm | 46 – 30 ppm | 75 – 60 ppm |
| Simulierte Signale | 3,21 ppm | 3,69 ppm | 32,8 ppm | 61,4 ppm |
| <i>Methode 1</i> (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| <i>Methode 2</i> (1,1'-Carbonyldiimidazol) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| <i>Methode 3</i> (2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| <i>Methode 4</i> (Triphenylphosphin, Trichloracetonitril) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| <i>Methode 5</i> (Phosphortrichlorid) | ---- | ---- | ---- | ---- |

Tab. 6 Übersicht zu den gemessenen NMR-Signalen nach den einzelnen Syntheseversuchen

Signalbereichabschätzung anhand von gängigen Verschiebungen ähnlicher funktioneller Gruppen in $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren^{60,61}, Simulation der Signale mittels Spektrenvorhersage nmrdp.org⁶², nicht gefundene Signale: ----

5.1.2.2 Zweistufige Syntheseversuche

Nachdem in den meisten bereits erwähnten Syntheseversuchen keine Reaktion beobachtet werden konnte, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass der Aktivester nicht gebildet werden konnte, da die Edukte nicht umgesetzt wurden. Daher wurde die Strategie dahingehend geändert, dass versucht wurde, zuerst ein Säurechlorid zu bilden, welches im Anschluss mit dem Weinrebamin zum Amid reagieren sollte, da Säurechloride generell eine höhere Reaktivität aufweisen. Abbildung 13 zeigt die Reaktionschemata der beiden zweistufigen Ansätze.

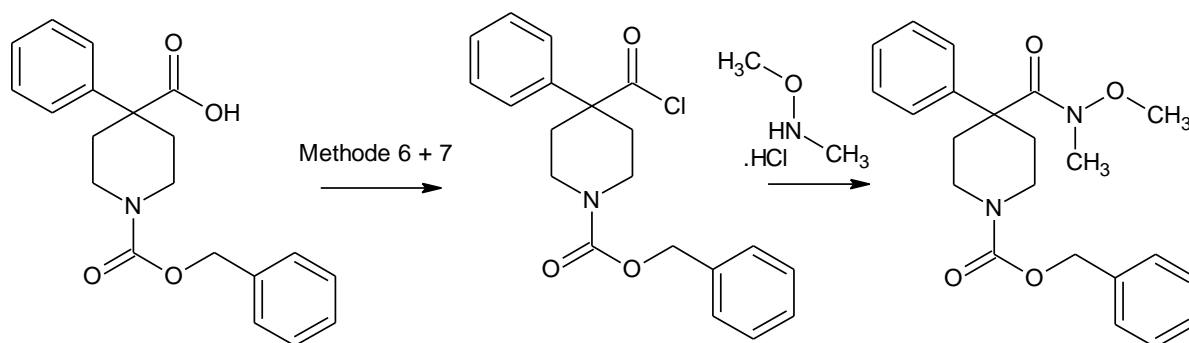


Abb. 13 Übersicht zu den zweistufigen Syntheseversuchen

Methode 6: Oxalylchlorid, Dichlormethan, Eiskühlung, 24 h, unter Argon-Atmosphäre, anschließende Evaporation des Lösungsmittels

Methode 7: Thionylchlorid, Dichlormethan, Eiskühlung, 24 h, unter Argon-Atmosphäre, anschließende Evaporation des Lösungsmittels

Nachfolgend bei beiden Methoden: *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid, Triethylamin, Dichlormethan, Raumtemperatur, 24 h

Der erste Versuch dazu wurde mit Oxalylchlorid durchgeführt, angelehnt an eine Vorschrift in der Literatur.⁶³ Im ersten Schritt konnte die – zumindest teilweise – Bildung des Säurechlorids dünnschichtchromatografisch nachgewiesen werden. Im zweiten Schritt, beim Hinzufügen des Amins, kam es jedoch zu einer unerwünschten Nebenreaktion, die vermutlich durch Reste des Oxalylchlorids in der Mischung hervorgerufen wurde. Dies hatte zur Folge, dass das Aufreinigen des Reaktionsgemischs unmöglich und der Ansatz verworfen wurde. Da die Säurechloridsynthese jedoch anscheinend funktioniert hatte, wurde der Versuchsaufbau mit Thionylchlorid wiederholt, welches eine höhere Reaktivität besitzt, weshalb auf eine bessere Umsetzung bei der Säurechloridbildung gehofft wurde. Thionylchlorid wurde zusätzlich frisch destilliert, um etwaige Nebenprodukte zu eliminieren. Die Aufreinigung im ersten Schritt wurde darauf beschränkt, das Lösungsmittel unter Vakuum abzdampfen, um das Säurechlorid nach möglichst kurzer Zeit für den zweiten Schritt verwenden zu können. Nach Abschluss der Reaktion mit dem Amin wurde dünnschichtchromatografisch festgestellt, dass es zu einer Umsetzung gekommen war, jedoch konnten im ¹H-NMR die beiden typischen Singulett-Signale für die Methylgruppen am Weinrebamid nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 7) und auch die Signale des Edukts waren nur mehr teilweise zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass es ebenfalls zu unerwünschten Nebenreaktionen gekommen ist.

| Bezeichnung | Chemische Verschiebung $^1\text{H-NMR}$ | | Chemische Verschiebung $^{13}\text{C-NMR}$ | |
|--------------------------------------|---|-----------------|--|-----------------|
| | NCH_3 | NOCH_3 | NCH_3 | NOCH_3 |
| Phenylpiperidin-carbonsäure (Edukt) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Erwarteter Signalbereich | 3,3 – 2,7 ppm | 3,5 – 3,0 ppm | 46 – 30 ppm | 75 – 60 ppm |
| Simulierte Signale | 3,21 ppm | 3,69 ppm | 32,8 ppm | 61,4 ppm |
| <i>Methode 6</i> (Oxalychlorid) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| <i>Methode 7</i> (Thionylchlorid) | ---- | ---- | ---- | ---- |

Tab. 7 Übersicht zu den gemessenen NMR-Signalen nach den beiden zweistufigen Syntheseversuchen

Signalbereichabschätzung anhand von gängigen Verschiebungen ähnlicher funktioneller Gruppen in $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren^{60,61}, Simulation der Signale mittels Spektrenvorhersage nmrdb.org⁶², nicht gefundene Signale: ----

5.1.2.3 Dreistufige Synthesen

Da die zweistufigen Synthesen über das Säurechlorid nun offenbar ein zu großes Maß an Reaktivität in den einzelnen Schritten aufwiesen und dadurch viele Nebenprodukte entstanden, aber kein Hauptprodukt, wurde versucht, einen Zugang mit mildereren Reaktionsbedingungen zu finden, der aber im Gegensatz zu den One-Pot-Versuchen trotzdem zu einer Reaktion führen sollte. Beide nachfolgend erwähnten Methoden erforderten zuerst die Generierung eines Zwischenprodukts, welches anschließend zum Amid umgesetzt werden sollte.

Der erste Versuch, die Synthese mittels eines milden reaktiven Zwischenprodukts durchzuführen (Methode 8) sah vor, N-Methansulfonylbenzotriazol, welches zuvor aus Benzotriazol und Methansulfonsäurechlorid hergestellt wurde, mit der Carbonsäure zu einem N-Acylbenzotriazol reagieren zu lassen und dieses dann mit dem Weinrebamin zum Amid umzusetzen.⁶⁴ Abbildung 14 zeigt das Schema des Syntheseversuchs.

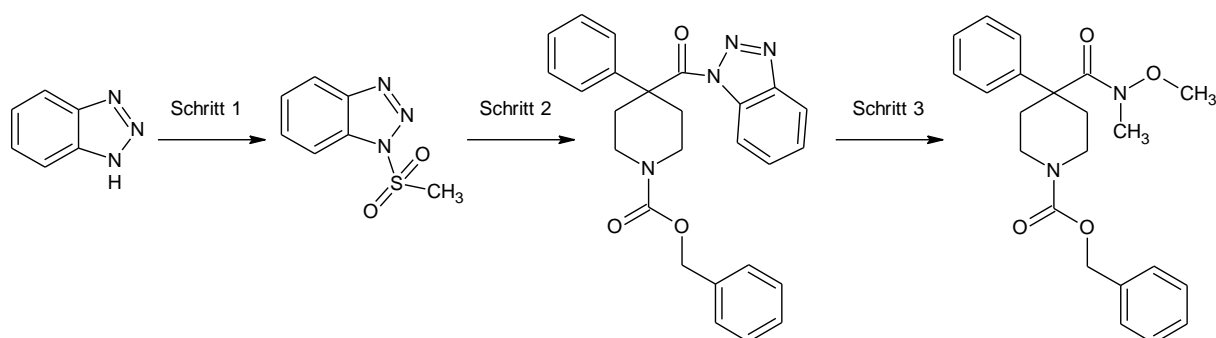


Abb. 14 Syntheschema von Methode 8

Schritt 1: Benzotriazol, Methansulfonsäurechlorid, Pyridin, Toluol, Reagenszugabe bei 0 °C, anschließend Raumtemperatur für 8 h, unter Argon-Atmosphäre

Schritt 2: Phenylpiperidincarbonsäure, Triethylamin, Tetrahydrofuran, Reagenszugabe bei Raumtemperatur, anschließend 6 h unter Reflux bei 70 °C

Schritt 3: N,O-Dimethylhydroxylamin.HCl, Triethylamin, Tetrahydrofuran, Raumtemperatur, 24 h

Die Generierung des N-Methansulfonylbenzotriazols konnte schnell und einfach bewerkstelligt werden, auch der zweite Schritt der Acylierung wurde anhand der Literatur problemlos durchgeführt. Die Umwandlung zum Amid war jedoch auch nach sehr langen Reaktionszeiten (bis zu fünf Tagen) nicht zu beobachten, weswegen der Reaktionsversuch abgebrochen wurde.

Da die Umwandlung des Amins zum Amid offenbar nur sehr träge vonstättenging, wurde nun auf eine Strategie gesetzt, bei der nicht die Carbonsäure, sondern das Amin aktiviert wurde (Methode 9). Hierbei wurde das Weinrebamin zuerst mit 1,1'-Carbonylimidazol zum Acylimidazol umgesetzt und anschließend mit Methyljodid zum Acylimidazolium-Salz aktiviert, welches eine wesentlich höhere Reaktivität besitzen sollte. Das Salz sollte in weiterer Folge ohne Aufreinigung direkt mit der Carbonsäure umgesetzt werden.⁶⁵ In Abbildung 15 ist das Schema der erfolgreichen Synthese aufgezeigt.

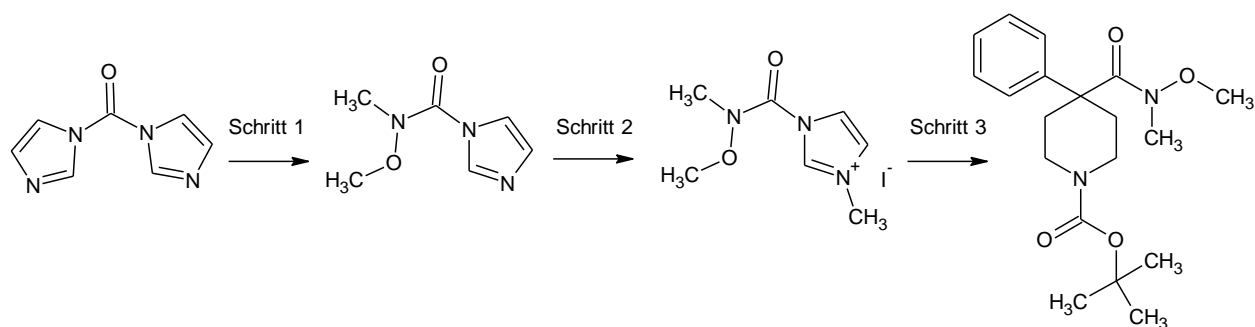


Abb. 15 Syntheschema von Methode 9

Schritt 1: N,O-Dimethylhydroxylamin.HCl, Triethylamin, Dichlormethan, Reagenszugabe bei 0 °C, anschließend Raumtemperatur für 24 h

Schritt 2: Methyljodid, Acetonitril, Raumtemperatur, 24 h

Schritt 3: geschützte Phenylpiperidincarbonsäure, Triethylamin, Acetonitril, Raumtemperatur, 3 d, unter Argon-Atmosphäre

Dadurch konnte nun endlich das gewünschte Weinrebamid synthetisiert werden. Im $^1\text{H-NMR}$ des Rohprodukts waren die zwei CH_3 -Signale bereits deutlich erkennbar, da aber ebenfalls ersichtlich war, dass viel Edukt nicht umgesetzt wurde, war eine Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie notwendig. Die Ausbeute war gering, wurde jedoch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit im letzten Schritt auf drei Tage von 11 auf 20 % erhöht, wodurch eine weitere Bearbeitung des Produkts möglich wurde. Es sei noch zusätzlich erwähnt, dass die Reaktion sowohl mit der ursprünglich verwendeten benzyloxycarbonylgeschützten Carbonsäure versucht wurde als auch mit einem tertiärbutyloxycarbonylgeschützten Derivat (Boc-Derivat). Die erfolgreiche Synthese des Weinrebamids konnte allerdings nur über das Boc-Derivat erreicht werden.

Tabelle 8 zeigt nun die gemessenen Signale im $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum, wiederum im Vergleich zum Edukt und zu simulierten Signalen des Produktmoleküls.

| Bezeichnung | Chemische Verschiebung $^1\text{H-NMR}$ | | Chemische Verschiebung $^{13}\text{C-NMR}$ | |
|---|---|-----------------|--|-----------------|
| | $N\text{CH}_3$ | NOCH_3 | $N\text{CH}_3$ | NOCH_3 |
| Phenylpiperidin-carbonsäure (Edukt) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Erwarteter Signalbereich | 3,3 – 2,7 ppm | 3,5 – 3,0 ppm | 46 – 30 ppm | 75 – 60 ppm |
| Simulierte Signale | 3,21 ppm | 3,69 ppm | 32,8 ppm | 61,4 ppm |
| <i>Methode 8</i> (Aktivierung der Carbonsäure mittels Benzotriazol) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| <i>Methode 9</i> (Aktivierung des Weinrebamins mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol) | 2,66 ppm | 3,11 ppm | 33,21 ppm | 59,19 ppm |

Tab. 8 Übersicht zu den gemessenen NMR-Signalen in den Produkten der dreistufigen Syntheserversuche

Signalbereichabschätzung anhand von gängigen Verschiebungen ähnlicher funktioneller Gruppen in $^1\text{H-NMR-}$ und $^{13}\text{C-NMR-Spektren}$ ^{60,61}, Simulation der Signale mittels Spektrenvorhersage nmrd.org⁶², nicht gefundene Signale: ----

Gegenüber den simulierten Signalen ist im $^1\text{H-Spektrum}$ eine Hochfeldverschiebung zu beobachten, die Werte der Kohlenstoffatome im $^{13}\text{C-Spektrum}$ sind jedoch sehr ähnlich. Diese Verschiebung kann durch die chemische Umgebung der gemessenen Kerne entstehen. Betrachtet man eine Reihe an Weinrebamiden mit unterschiedlichen Strukturen am Amin-Stickstoff, so unterscheiden sich die Verschiebungen der C- und H-Atome des Amins um bis zu 0,5 ppm, je nachdem, welches der dritte

Substituent ist.⁶⁶ Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Spektren des erfolgreich synthetisierten Weinrebamids; die Reaktionsbedingungen und analytischen Daten sind ausführlich im experimentellen Teil (Kapitel 7.1.5) beschrieben.

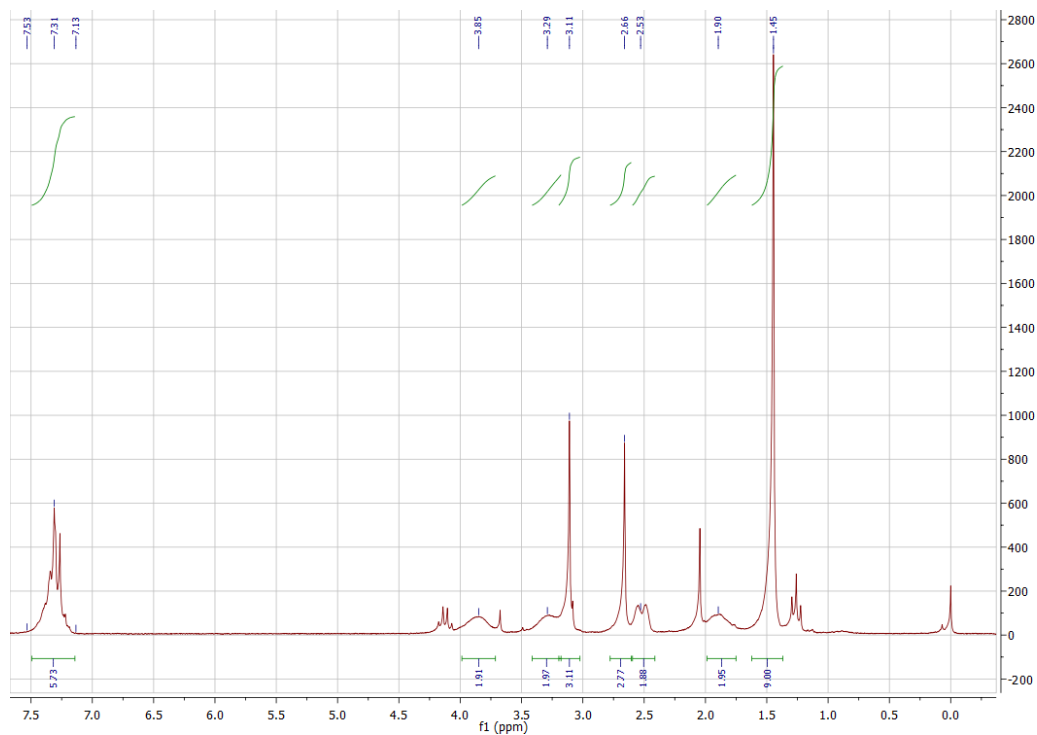


Abb. 16 ^1H -NMR-Spektrum von (Tert-butyl)-4-[Methoxy(Methyl)carbamoyl]-4-Phenyl-Piperidinsäureamid
Die chemischen Verschiebungen sind über den Signalen notiert, Angaben in ppm. Unter den Signalen ist die jeweils relative Anzahl an Protonen vermerkt, berechnet über die Integration der Signale.

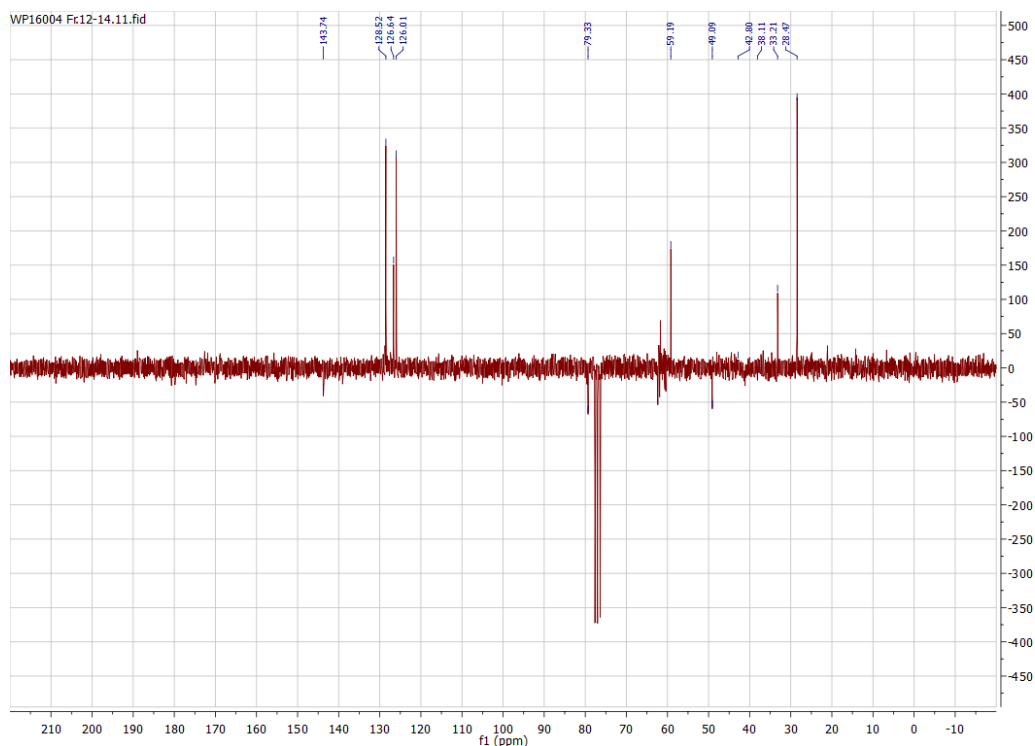


Abb. 17 ^{13}C -NMR-Spektrum von (Tert-butyl)-4-[Methoxy(Methyl)carbamoyl]-4-Phenyl-Piperidinsäureamid
Das Spektrum wurde im Attached Proton Test Verfahren aufgenommen, die positiven Signale zeigen quartäre C-Atome und CH_2 -Gruppen, die negativen Signale CH - und CH_3 -Gruppen an. Die chemischen Verschiebungen sind über den Signalen notiert, Angaben in ppm.

Da die Synthese dieses Bausteins auch unter verschiedensten Bedingungen zuerst nicht möglich war, wurde parallel zu den Syntheseversuchen eine weitere Strategie zur Simplifizierung von α -MSH mittels Peptidsynthese vorangetrieben, die im nächsten Kapitel beschrieben wird.

5.2 Peptidsynthese von mutmaßlichen Liganden

Da sich der ursprüngliche Weg zur Synthese von Melanocortin-1-Rezeptor-Liganden als nicht gangbar erwies, wurde eine alternative Strategie entwickelt. Nach ausgiebiger Literaturrecherche wurde eine aktuelle Publikation als Grundlage gewählt, die einen *in silico* Zugang wählte und über Homology Modeling eine Simulation des MC1R generierte.⁶⁷ Nachfolgend wurden bioaktive Peptide aus einer bestehenden Datenbank (PepBank, <http://pepbank.mgh.harvard.edu/>) mittels Docking und Scoring getestet und mit dem Tetrapeptid His-Phe-Arg-Trp (HFRW), der Bindungssequenz des natürlichen Liganden α -MSH, verglichen. Die Autoren gaben danach an, drei Peptide gefunden zu haben, die potente Liganden am MC1R sein können.⁶⁷

Diese drei Peptide [Glu-Glu-Lys-Glu (EEKE), Glu-Glu-Asp-Cys-Lys (EEDCK), Glu-Gly-Gly-Ser-Val-Glu-Ser (EGGSVES)], dargestellt in Abbildung 18, variieren in ihrer Sequenz nun sehr stark vom ursprünglichen Molekül und wurden nach aktuellem Stand noch nicht in Bezug auf ihre Aktivität am MC1R getestet. Daher wurden die Peptide als Startpunkt für weitere Untersuchungen synthetisiert, zusätzlich wurde auch HFRW (Abb. 18) hergestellt, um als Positivkontrolle bei biologischen Testungen zu fungieren.

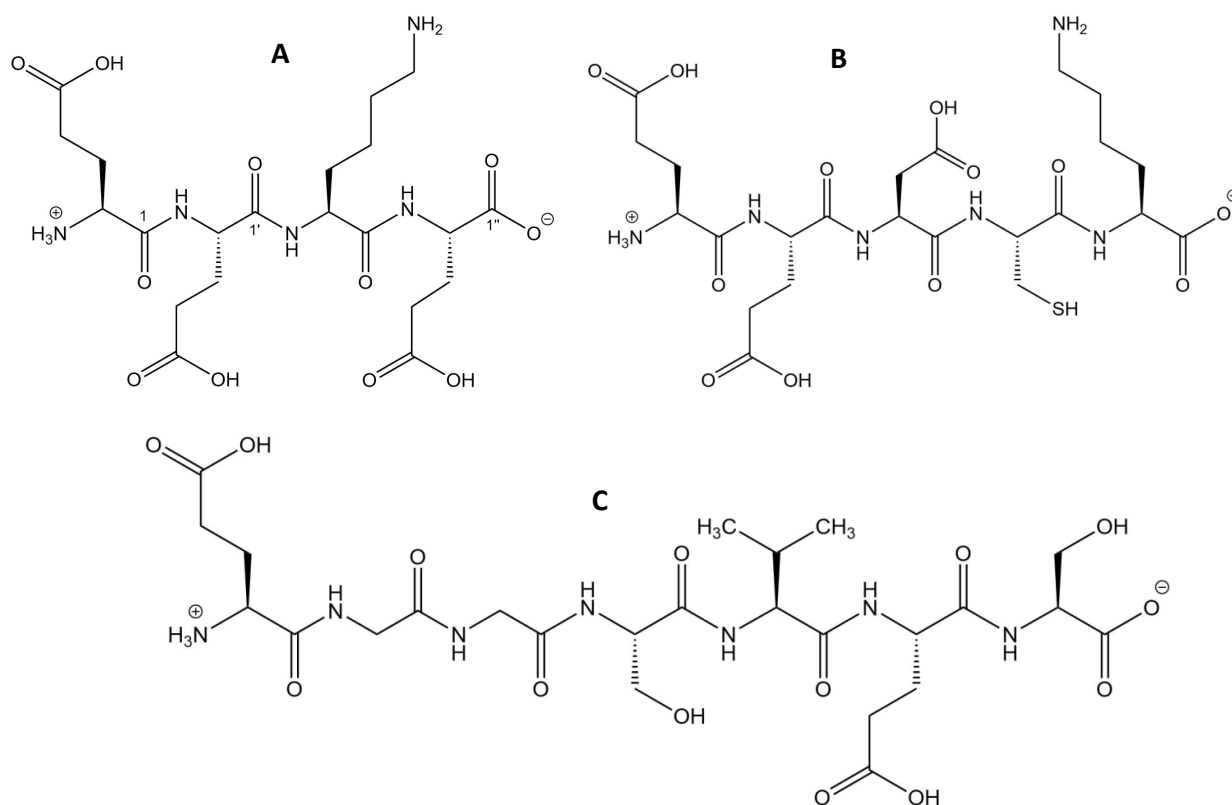


Abb. 18 Strukturen der als MC1R-Liganden publizierten Peptide

Abb. 18A: Glu-Glu-Lys-Glu (EEKE)

Abb. 18B: Glu-Glu-Asp-Cys-Lys (EEDCK)

Abb. 18C: Glu-Gly-Gly-Ser-Val-Glu-Ser (EGGSVES)

Alle nachfolgend beschriebenen Peptide wurden mithilfe eines semiautomatischen Peptidsynthesizers hergestellt. Die generelle Arbeitsweise der Peptidsynthese mittels Spritzentechnik ist im Kapitel 4.1 beschrieben. Durch die Möglichkeit Spritzen ab einem Volumen von 2 ml zu verwenden, konnten auch vergleichsweise kleine Ansätze von zumindest 100 mg Harz realisiert werden. Die erarbeitete Vorschrift konnte für diese und alle weiteren Synthesen übernommen werden und wurde als Standardprotokoll etabliert. Da die Peptide im Anschluss für biologische Testungen verwendet werden sollten, wurde auf eine Reinheit von mindestens 95 % geachtet, weshalb etwaige Reinigungsschritte gegebenenfalls wiederholt wurden.

Die Synthesen von EEKE (Abb. 18A) und EGGSVES (Abb. 18C) konnten problemlos verwirklicht werden, durch die semiautomatische Vorgangsweise wurden nur die Aminosäuren händisch hinzugefügt, die

restlichen Schritte wurden vom Gerät durchgeführt, wodurch immer die gleichen Bedingungen garantiert werden konnten. Die Vollständigkeit der Kopplungen der einzelnen Aminosäuren wurde stets durch einen Kaiser-Test kontrolliert, bei einem positiven Test wurden die Arbeitsschritte gegebenenfalls wiederholt. Die Abspaltung vom Harz war in zufriedenstellender Ausbeute (80 – 100 %) möglich. Auch die Aufreinigung konnte unproblematisch mittels präparativer HPLC durchgeführt werden, die verwendeten Gradientenprofile sind in Kapitel 7.2 ausführlich beschrieben. Im Fall von EEKE konnten 35,4 % Peptid mit einer Reinheit von 95,6 % als Endausbeute gewonnen werden, von EGGSVES wurden 13,9 % Peptid mit einer Reinheit von 95,3 % synthetisiert.

Beim Pentapeptid EEDCK (Abb. 18B) gab es anfänglich Schwierigkeiten mit der Schutzgruppe am Cystein, da eine Acetaminomethylgruppe (Acm-Gruppe) verwendet wurde. Der Vorteil dieser Gruppe ist eine hohe Stabilität gegenüber chemischen Einflüssen, wodurch die Handhabung bei der Synthese erleichtert wird, jedoch wirkt sich dies später in einen Nachteil aus, da die Abspaltung der Schutzgruppe harsche Bedingungen und zum Teil den Einsatz von Schwermetallen wie Silber oder Quecksilber erfordert.⁶⁸ Um zumindest die Verwendung von Schwermetallen zu verhindern, wurde versucht die Abspaltung mit mildereren Konditionen (2,2'-Dithiobis-(5-Nitropyridin), DTNP in Kombination mit Trifluoressigsäure und Thioanisol) durchzuführen.⁶⁹ Infolgedessen reduzierte sich die Ausbeute, da auch nach mehreren Inkubationen mit den angegebenen Reagenzien keine vollständige Abspaltung der Acm-Gruppe erzielt werden konnte. Ein Wechsel der Schutzgruppe auf einen Tritylrest führte zur Lösung dieses Problems. Die Tritylgruppe war stabil genug, um bei der Synthese des Peptids nicht abgespalten zu werden und konnte anschließend in einem Schritt bei der Abspaltung vom Harz entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls mittels präparativer HPLC, wobei eine Ausbeute von 23,6 % bei 95,0 % Reinheit gewonnen wurde (Gradientenprofil in Kapitel 7.2.2).

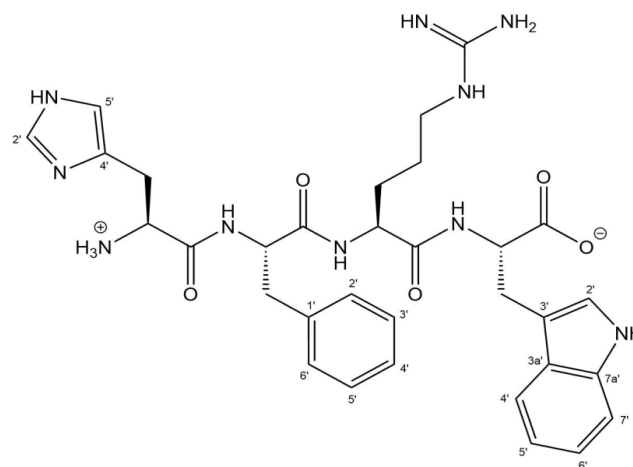


Abb. 19 Struktur des Tetrapeptids His-Phe-Arg-Trp (HFRW)

Dieses Peptid stellt die Bindungssequenz von α -MSH an die Melanocortinrezeptoren dar.

Die Synthese von HFRW (Abb. 19) konnte ebenfalls ohne Probleme durchgeführt werden, es wurde analog zu EEDCK ein Schutzgruppenwechsel, in diesem Fall bei der Schutzgruppe von Arginin, durchgeführt. Bei dieser Synthese wurde ebenfalls zuerst eine chemisch sehr stabile Schutzgruppe gewählt (4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl-Gruppe, Mtr-Gruppe), die zwar mit einem gängigen Cleavage Cocktail (Trifluoressigsäure/Phenol/Wasser/Triisopropylsilan, 88/5/5/2) abgespalten werden konnte, dafür aber zumindest vier Stunden inkubiert werden sollte. Diese Inkubationszeit könnte allerdings dem Indolring des Tryptophans schaden, weshalb eine maximale Einwirkzeit von zwei bis vier Stunden empfohlen wird.⁷⁰ Die Rohausbeute beim ersten Versuch dieser Synthese war mit 44,3 % gering im Vergleich zu den vorherigen Synthesen (80 – 100 %) und im Massenspektrum war ein Peak bei $m/z=459,33$ (entspricht dem Molpeak des Tripeptids HFR, ohne den Trp-Rest) mit ähnlicher Intensität wie der Molpeak $[M+H]^+$ von HFRW $m/z=645,33$ sichtbar. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Kopplung von Arginin an die Peptidkette, welche generell zumindest einer Wiederholung bedarf, um einen negativen Kaiser-Test zu erreichen, mit der Mtr-Schutzgruppe zumindest drei Mal durchgeführt werden musste. Diese Ergebnisse führten dazu, nach einer anderen Schutzgruppe zu suchen, die auch bei mildereren Bedingungen abgespalten werden konnte. Als adäquaten Ersatz konnte die 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-Gruppe (Pbf-Gruppe) eingesetzt werden, welche mit dem oben beschriebenen Cleavage Cocktail in zwei Stunden vollständig vom Peptid abgespalten wurde. Nach der Aufreinigung wurden 40,8 % Peptid mit 98,2 % Reinheit gewonnen (Gradientenprofil in Kapitel 7.2.4).

5.3 Aufbau eines Systems zur biologischen Testung der Peptide

Um die synthetisierten Peptide nun auf ihre Wirksamkeit auf Melanocortinrezeptoren zu testen, musste ein System entwickelt werden, das robust und zuverlässig ist und zugleich die Testung von mehreren Substanzen auf einmal zulässt. Dank der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hohenegger (Institut für Pharmakologie/Medizinische Universität Wien) standen fünf Melanomzelllinien für diese Aufgabe zur Verfügung. Drei dieser Zelllinien (WM35, WM278, WM793) stammen aus der frühen, radial wachsenden Phase eines Melanoms, die anderen beiden (A375, 518A2) aus dem fortgeschrittenen, metastasierenden Stadium.

5.3.1 PCR der fünf Melanocortinrezeptoren

Um festzustellen, ob und welche Melanocortinrezeptoren auf diesen Zellen vorhanden waren, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Als Vorbereitung wurde von allen Zelllinien die mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Für die PCR selbst wurden Primer für jeden der fünf Melanocortinrezeptoren (MCR) und Ribosomal Protein 14 (RPS14) als Housekeeping Gen erstellt. Die Protokolle zur Durchführung der Arbeitsschritte sind in den Kapiteln 4.4.1 bis 4.4.4 beschrieben.

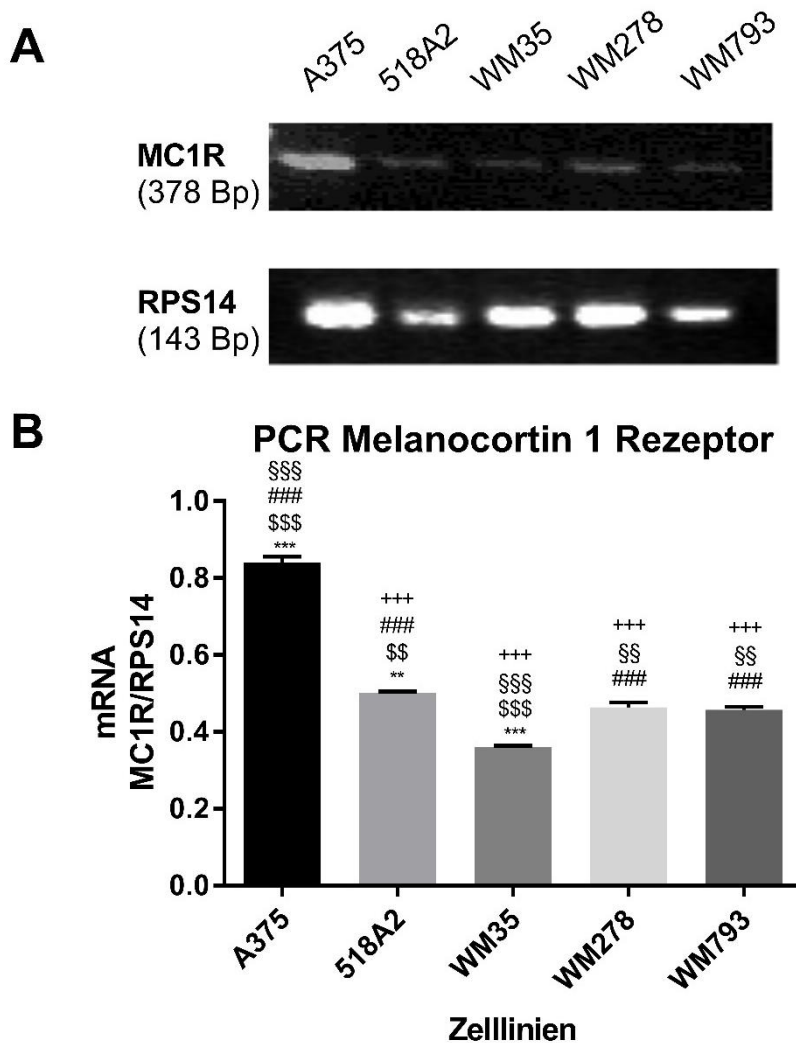


Abb. 20 Nachweis von MC1R mRNA in Melanomzellen

In A375, 518A2, WM35, WM278 und WM793 Zellen wurden spezifische PCR Produkte für MC1R und RPS14 in Agarose-Gelen (2 %) visualisiert (A). Die Größe der amplifizierten Produkte (378 bzw. 143 Basenpaare, Bp) ist angegeben, die Intensität der Banden wurde mit ImageJ ausgewertet, auf die Referenzintensität von RPS14 normalisiert und unter (B) graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (+ zu A375, \$ zu 518A2, # zu WM35, § zu WM278 und * zu WM793). Kein Symbol bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$), ein Symbol $p < 0,05$, zwei Symbole $p < 0,005$, drei Symbole $p < 0,0005$.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis der PCR zum Nachweis des MC1R in den Melanomzelllinien zu sehen. Der Rezeptor konnte in allen fünf Zelllinien nachgewiesen werden, die Position des Amplicons im Gel war übereinstimmend mit der erwarteten Länge (378 Basenpaare), die mittels Primer BLAST bestimmt wurde.⁷¹ In der statistischen Auswertung (Abb. 20B) ist erkennbar, dass das PCR Produkt des MC1R in der Zelllinie A375 im Vergleich zu den weiteren Zelllinien in signifikant höheren Konzentrationen vorkommt.

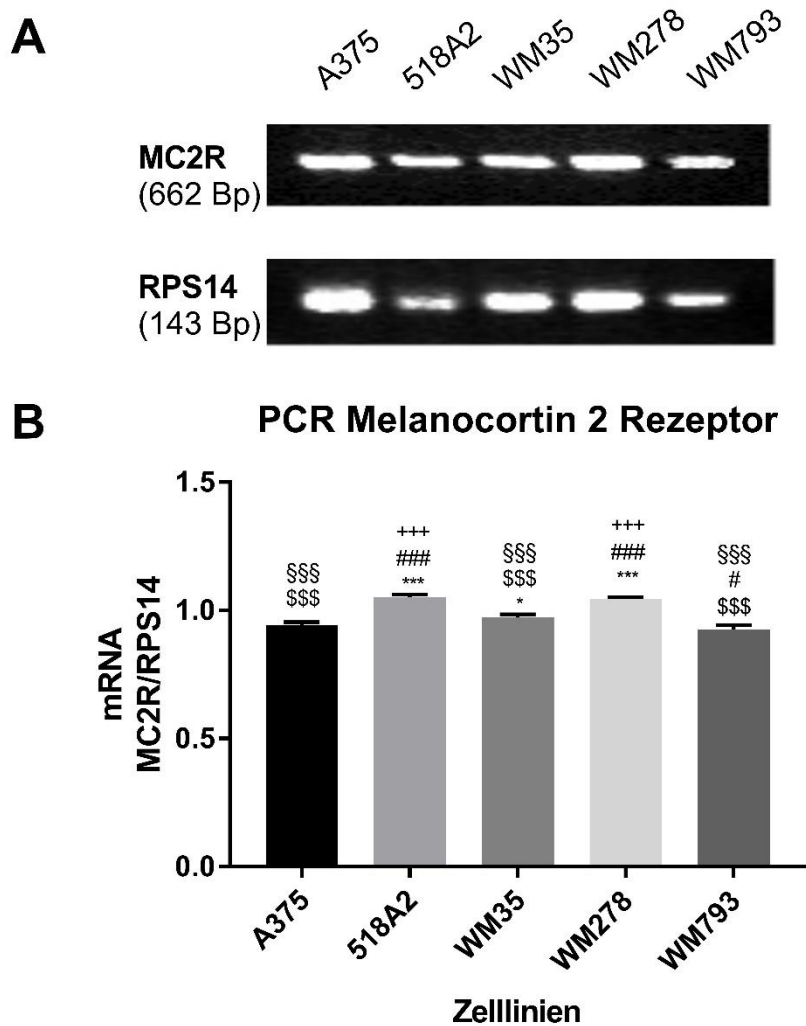


Abb. 21 Nachweis von MC2R mRNA in Melanomzellen

In A375, 518A2, WM35, WM278 und WM793 Zellen wurden spezifische PCR Produkte für MC2R und RPS14 in Agarose-Gelen (2 %) visualisiert (A). Die Größe der amplifizierten Produkte (662 bzw. 143 Basenpaare, Bp) ist angegeben, die Intensität der Banden wurde mit ImageJ ausgewertet, auf die Referenzintensität von RPS14 normalisiert und unter (B) graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3).

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den Angaben in Abbildung 20.

Die Visualisierung der Amplicons des MC2R und RPS14 sowie die statistische Auswertung dieser sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Länge des Amplicons konnte in diesem Fall nicht mittels Primer BLAST bestimmt werden, daher wurde ein in silico PCR Tool der University of California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>) verwendet.⁷² Dieses ergab eine vorhergesagte Länge von

662 Basenpaaren, was wiederum mit der beobachteten Position der PCR-Produkte im Gel übereinstimmte. Die statistische Auswertung (Abb. 21B) zeigt ein ähnliches Vorkommen der für den MC2R codierenden Sequenz in allen fünf Zelllinien.

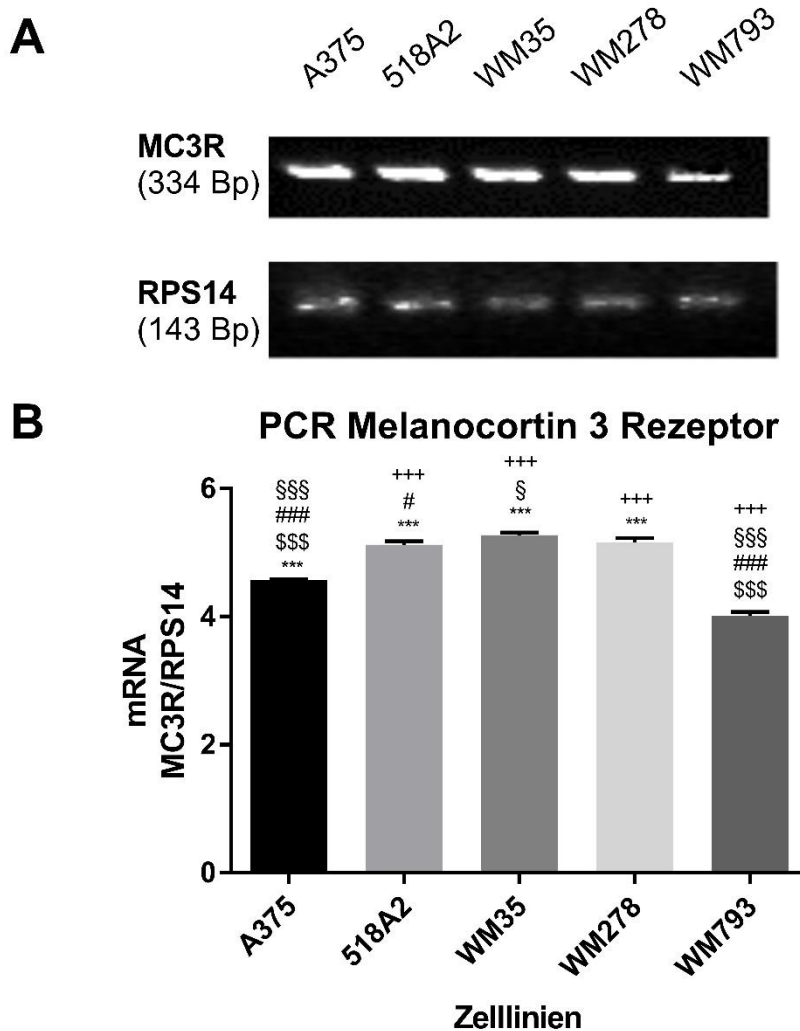


Abb. 22 Nachweis von MC3R mRNA in Melanomzellen

In A375, 518A2, WM35, WM278 und WM793 Zellen wurden spezifische PCR Produkte für MC3R und RPS14 in Agarose-Gelen (2 %) visualisiert (A). Die Größe der amplifizierten Produkte (334 bzw. 143 Basenpaare, Bp) ist angegeben, die Intensität der Banden wurde mit ImageJ ausgewertet, auf die Referenzintensität von RPS14 normalisiert und unter (B) graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3).

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den Angaben in Abbildung 20.

In Abbildung 22 ist das Ergebnis der PCR, mit deren Hilfe die Anwesenheit des MC3R in den Zelllinien evaluiert wurde, zu sehen. Die zu erwartende Länge des Amplicons wurde, wie im Falle des MC2R, durch ein in silico PCR Tool berechnet⁷² und ergab eine Größe von 334 Basenpaaren. Dies konnte durch die Banden im Agarosegel bestätigt werden. Analog zum Ergebnis der Auswertung der PCR für MC2R konnte auch in diesem Fall eine ähnliche Intensität der Banden in den meisten Zelllinien beobachtet

werden, was durch die statistische Berechnung (Abb. 22B) bestätigt wurde. Im Falle der A375 und WM793 Zellen wurde jedoch durch die Auswertung eine signifikant geringere Konzentration an mRNA aufgezeigt.

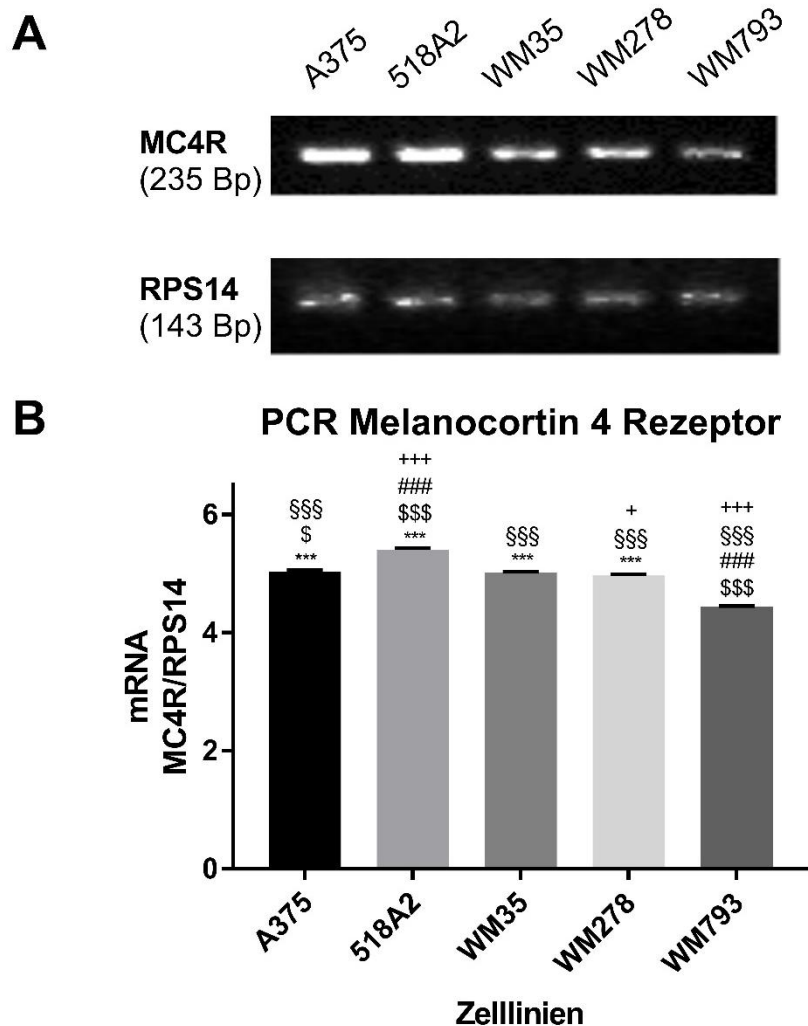


Abb. 23 Nachweis von MC4R mRNA in Melanomzellen

In A375, 518A2, WM35, WM278 und WM793 Zellen wurden spezifische PCR Produkte für MC4R und RPS14 in Agarose-Gelen (2 %) visualisiert (A). Die Größe der amplifizierten Produkte (235 bzw. 143 Basenpaare, Bp) ist angegeben, die Intensität der Banden wurde mit ImageJ ausgewertet, auf die Referenzintensität von RPS14 normalisiert und unter (B) graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3).

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den Angaben in Abbildung 20.

Die detektierten Banden der PCR des MC4R sind in Abbildung 23A dargestellt. Analog zur Vorgehensweise bei MC2R und MC3R wurde die Länge des Amplicons wieder mittels in silico PCR berechnet⁷², wobei eine erwartete Größe von 235 Basenpaaren angegeben wurde. Auch in diesem Fall stimmte die Berechnung mit der Position der PCR-Produkte im Gel überein. Die Intensität der Bande der WM793 Zellen war geringer als jene der übrigen vier Zelllinien, die einander ähnelten. In der statistischen Auswertung (Abb. 23B) ist dies auch dadurch ersichtlich, dass der Balken der WM793 Zellen höchst signifikant ($p < 0,0005$) geringer ist als der aller anderen Zellen.

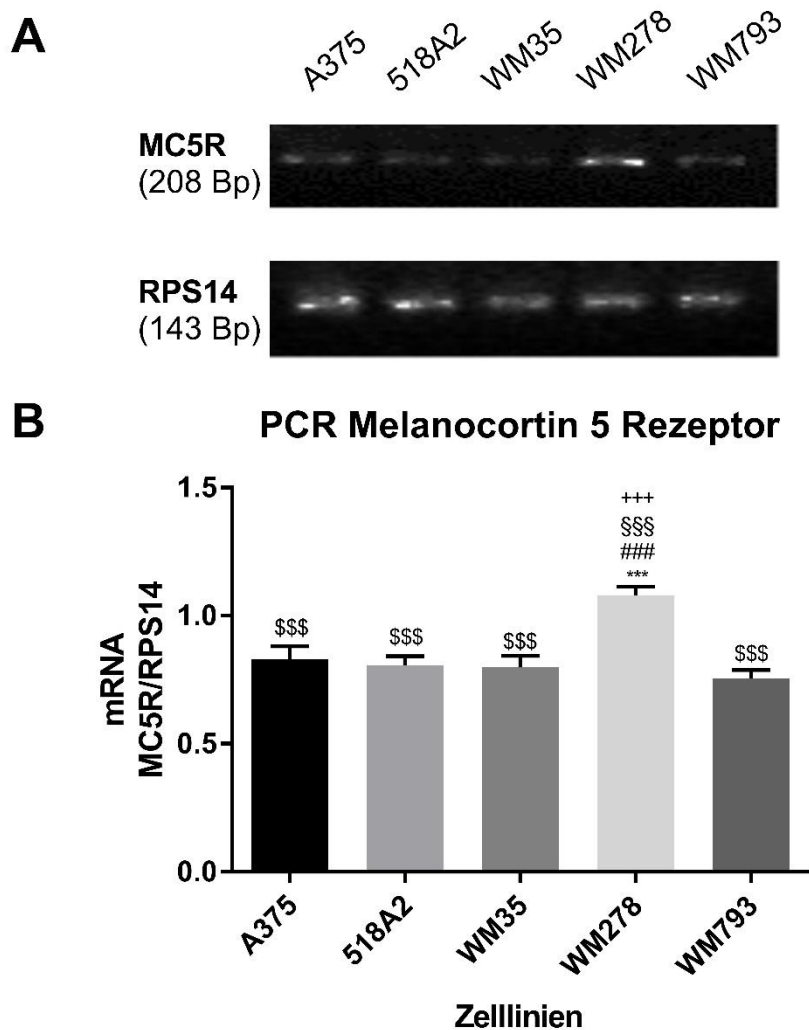


Abb. 24 Nachweis von MC5R mRNA in Melanomzellen

In A375, 518A2, WM35, WM278 und WM793 Zellen wurden spezifische PCR Produkte für MC5R und RPS14 in Agarosegelen (2 %) visualisiert (A). Die Größe der amplifizierten Produkte (208 bzw. 143 Basenpaare, Bp) ist angegeben, die Intensität der Banden wurde mit ImageJ ausgewertet, auf die Referenzintensität von RPS14 normalisiert und unter (B) graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3).

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den Angaben in Abbildung 20.

Die letzte PCR zeigt in Abbildung 24 den Nachweis von MC5R in den fünf Melanomzelllinien. Hierbei wurde für die Bestimmung der Länge des Amplicons wieder auf Primer BLAST zurückgegriffen⁷¹, wo für die verwendeten Primer bereits publizierte Einträge vorhanden sind, die ein Produkt von 208 Basenpaaren beschreiben. Auch dies konnte durch die Position im Gel bestätigt werden. Wie auch bereits in der Darstellung der Banden sichtbar, konnte in der statistischen Auswertung (Abb. 24B) eine signifikant höhere Intensität in den WM278 Zellen beobachtet werden. Alle anderen Zelllinien sind statistisch gesehen nicht signifikant unterschiedlich im Vorkommen des MC5R PCR-Produkts.

Die Auswertung der PCR ergab daher, dass alle Rezeptoren in jeder Zelllinie vorkommen, jedoch in unterschiedlicher Intensität. In der Analyse der Ergebnisse der einzelnen Rezeptoren ist deutlich zu sehen, dass der MC1R in der Zelllinie A375 statistisch signifikant höher exprimiert wird als bei allen anderen Zelllinien. Bei den PCR-Ergebnissen der Melanocortin 2, 3 und 4 Rezeptoren waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien gering, der MC5R wurde in den WM278 Zellen signifikant höher exprimiert. Nachdem der Fokus in dieser Arbeit darauf liegt, mögliche Liganden für den MC1R zu finden, wurde die Zelllinie A375 für weitere Experimente selektiert. Unter rein praktischen Gesichtspunkten war diese Wahl zusätzlich günstig für den weiteren Verlauf, da die Zellen aus dem metastasierenden Stadium generell schnelleres Wachstum zeigten und so eine effizientere Auslegung der Versuche ermöglichten.

5.3.2 Etablierung eines cAMP-assays

Um nun die Effekte der synthetisierten Peptide studieren zu können, wurde nach einem zuverlässigen Assay gesucht, der eine grundsätzliche Aussage über die mögliche Stimulation von Melanocortinrezeptoren im Allgemeinen und in weiterer Folge von MC1R zulässt. Der MC1R gehört, wie auch die anderen vier Melanocortinrezeptoren, zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die sieben transmembranäre Domänen besitzen.⁷³ Sobald der Rezeptor durch einen Liganden stimuliert wird, aktiviert das $G_{s\alpha}$ -Protein die Adenylatcyclase und erhöht dadurch die intrazelluläre Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP).⁷⁴ Durch die Messung dieser intrazellulären Konzentration mit und ohne Stimulation durch einen Liganden kann auf einen agonistischen oder antagonistischen Effekt geschlossen werden.

Am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Universität Wien ist die Methode zur Konzentrationsmessung von cAMP auf zellulärer Ebene etabliert und wurde entsprechend durchgeführt. Die Präinkubation der Zellen mit [³H] radioaktiv markiertem Adenin führt nach ca. 18 Stunden zu einem Einbau in adeninhaltige Nukleotide wie ADP und ATP. Die Applikation eines Agonisten, der an einen $G_{s\alpha}$ gekoppelten GPCR bindet, führt dann rasch zur Bildung von cAMP.⁷⁵ Beim Assay selbst werden die Zellen nach der Inkubation mit Säure aufgeschlossen und cAMP durch sequentielle Säulenchromatographie von den restlichen Nukleotiden getrennt⁷⁶. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt schließlich in einem Szintillationszähler.

Da diese Versuchsanordnung noch nie mit den ausgewählten Zellen und dem zu untersuchenden Rezeptor beschrieben wurde, musste zuerst ein Protokoll entwickelt werden, welches für diese Fragestellung verwendet werden konnte. Um aussagekräftige Werte zu bekommen, sollten möglichst

viele Zellen für eine Bestimmung verwendet werden, die Anzahl sollte aber auch in den Experimenten untereinander vergleichbar sein. Als optimaler Ansatz für die A375 Zellen hat sich daher eine Kultur in Sechs-Well-Platten herausgestellt, welche so ausgesät wurden, dass am Tag der Inkubation mindestens eine Million Zellen vorhanden war. Um eine robuste Aussage von gemessenen Effekten treffen zu können, wurde jede Einzelbestimmung in Triplikaten durchgeführt, d.h. je drei Wells wurden für eine Bedingung parallel angesetzt. Für die Positivkontrolle wurde käuflich erworbenes NDP-MSH verwendet, das ein bekannter Agonist am MC1R ist.

Für einen ersten Versuch wurden die Zellen mit 100 μ M NDP-MSH pro Zellkulturwell für eine halbe Stunde inkubiert und mit einer Kontrollgruppe verglichen, bei der die Zellen nur mit Puffer behandelt wurden. Die gemessenen counts per minute (CPM) von cAMP wurden in Relation zu den gemessenen CPM von gesammeltem ATP und ADP gesetzt, um etwaige Unterschiede in der Zelldichte auszugleichen. Insgesamt war nur ein sehr geringer Anstieg der cAMP-Konzentration messbar, der statistisch nicht signifikant war (Abb. 25).

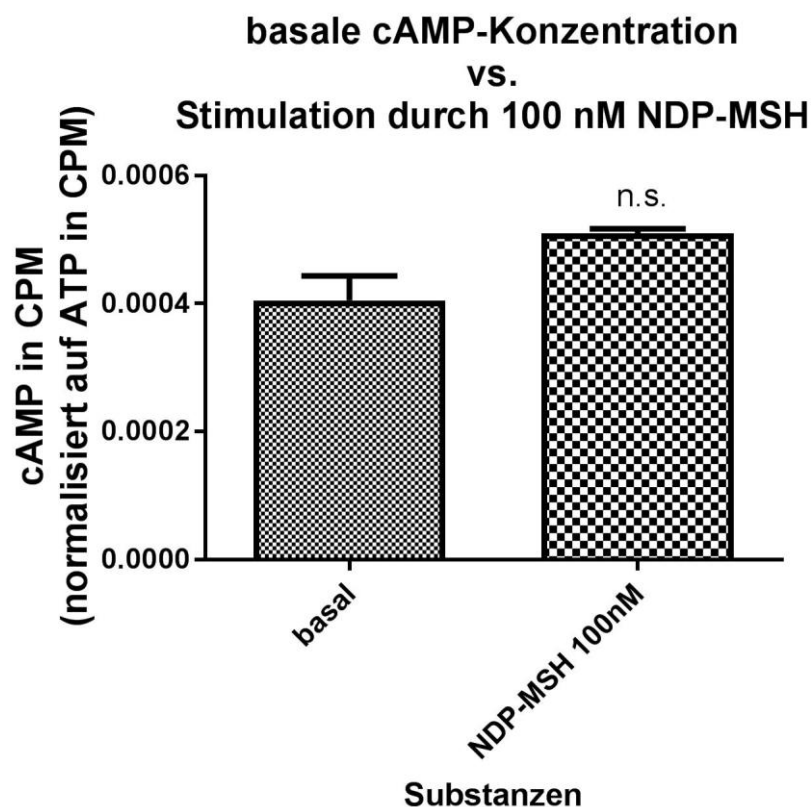


Abb. 25 Vergleich der basalen und durch NDP-MSH stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von gemessenem ATP normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=3$).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem ungepaarten t-Test berechnet. Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p>0,05$), ein Symbol $p<0,05$, zwei Symbole $p<0,005$, drei Symbole $p<0,0005$.

Daher wurde im nächsten Versuch eine Vorstimulation mit Forskolin, welches ein direkter Adenylatcyclasestimulator ist, durchgeführt. Forskolin wurde in einer Konzentration von 25 μM pro Well direkt zum Inkubationspuffer hinzugefügt, in dem auch NDP-MSH vorhanden war. Als Kontrolle wurden parallel dazu Zellen nur mit Puffer und nur mit Forskolin inkubiert, um den Effekt von NDP-MSH zu messen, wurde die Substanz alleine und in Kombination mit Forskolin untersucht.

Die gemessenen counts per minute (CPM) von cAMP wurden wie in Abbildung 25 in Relation zu den CPM von gesammeltem ATP und ADP gesetzt, anschließend wurden diese Werte in Verhältnis zu den Forskolin-Werten gesetzt.

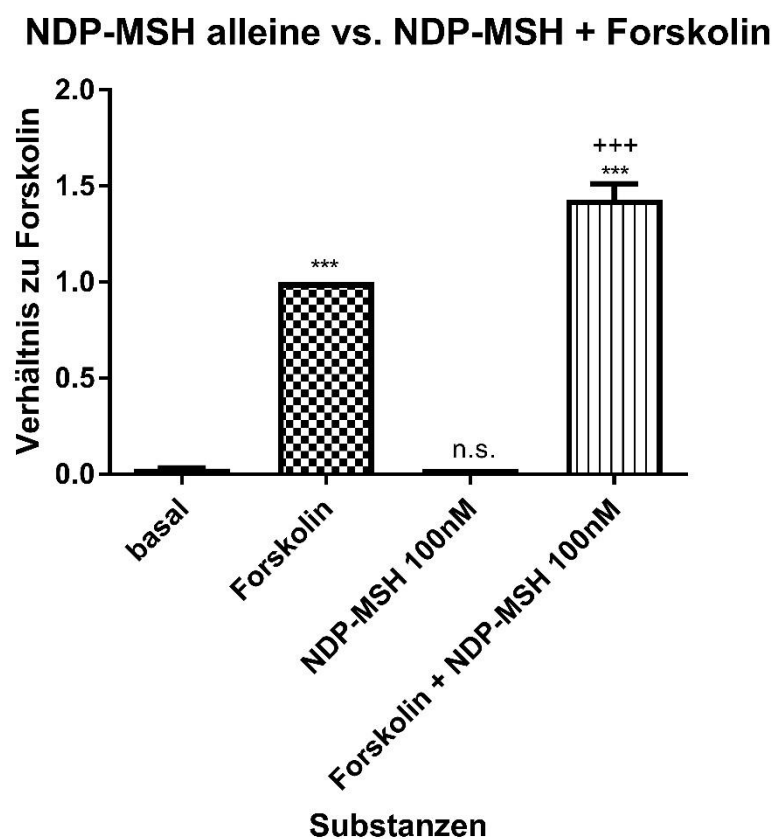


Abb. 26 Vergleich der durch Forskolin und NDP-MSH stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=3$).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (+ zur basalen cAMP-Ausschüttung, * zur mit Forskolin vorstimulierten Exkretion). Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p>0,05$), ein Symbol $p<0,05$, zwei Symbole $p<0,005$, drei Symbole $p<0,0005$.

Durch die Vorstimulation mit Forskolin konnte eine signifikante Steigerung der Konzentration von cAMP in den Zellen nachgewiesen werden, sowohl im Vergleich zur basalen cAMP-Konzentration als auch zur Ausschüttung nach alleiniger Stimulation durch Forskolin. In Abbildung 26 ist zu sehen, dass der cAMP-Anstieg nach der Stimulation durch NDP-MSH alleine keinen signifikanten Unterschied zum

basalen cAMP-Level zeigt. Eine Stimulation ausschließlich mit Forskolin ergibt einen hochsignifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration und eine Kombination von Forskolin und NDP-MSH zeigt eine weitere Zunahme. Die statistische Auswertung der Daten zeigt außerdem, dass der Anstieg von Forskolin zu Forskolin plus NDP-MSH ebenfalls hoch signifikant ist.

Dies zeigt die prinzipielle Eignung der Versuchsanordnung für die Testung von neuen Substanzen, da mit einem bekannten Agonisten eine Stimulation erreicht werden konnte, die auch in mehreren Versuchen verlässlich reproduzierbar war. Zusätzlich wurde ins Protokoll aufgenommen, dass sowohl die basale cAMP-Konzentration bei jedem Versuch gemessen wurde als auch die durch Forskolin erzeugte. Dadurch wurde jedes Mal getestet, ob das Zellsystem an sich intakt ist, da eine Stimulation durch Forskolin in jedem Fall erhöhte cAMP-Konzentrationen auslösen muss.

5.3.3 Konzentrationsabhängige Stimulation durch NDP-MSH

Um auch eine Aussage zur konzentrationsabhängigen cAMP-Stimulation treffen zu können, wurde die Versuchsanordnung mit unterschiedlichen NDP-MSH-Konzentrationen durchgeführt. In der Literatur wird ein Effekt von α -MSH ab 0,1 nM beschrieben⁷⁷, daher wurden initial drei Konzentrationen 1, 10 und 100 nM gewählt, die wiederum mit Forskolin vorstimuliert und mit den beiden Kontrollgruppen, basale cAMP-Produktion und Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion, verglichen wurden.

NDP-MSH konzentrationsabhängige Stimulation

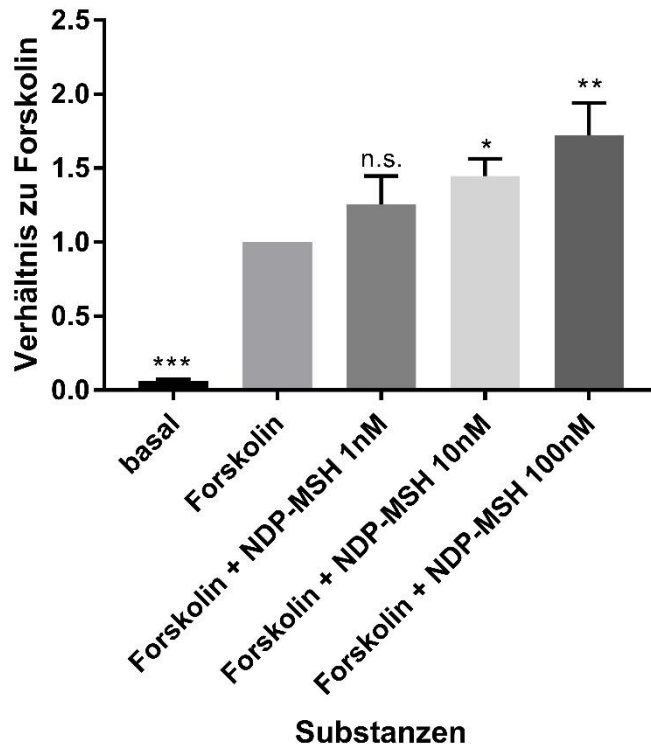


Abb. 27 NDP-MSH stimuliert die cAMP Produktion in Gegenwart von Forskolin in humanen metastatischen A375 Melanomzellen.

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (* zeigt einen signifikanten Unterschied zur mit Forskolin vorstimulierten Exkretion). Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$), ein Symbol $p < 0,05$, zwei Symbole $p < 0,005$, drei Symbole $p < 0,0005$.

Abbildung 27 zeigt die konzentrationsabhängige Stimulation durch NDP-MSH, welche über drei logarithmische Einheiten zunimmt. Dies bestätigte die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Experiment, wo bei 100 nM NDP-MSH ein statistisch hochsignifikanter Anstieg zu beobachten war. Die Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation ist ein wichtiger Punkt, da neue Liganden einen zumindest gleich starken Effekt hervorrufen sollten, im optimalen Fall sogar auch schon in niedrigeren Konzentrationen. Die erhaltenen Effekte standen nun als Vergleich für zukünftige Experimente zur Verfügung, um eine schnelle Einschätzung der Wirksamkeit geben zu können.

Nachfolgend ist in Abbildung 28 eine Dosis-Wirkungskurve von NDP-MSH dargestellt, welche mit den Daten von drei gepoolten Experimenten berechnet wurde. Die Datenpunkte der einzelnen Konzentrationen liegen annähernd auf der sigmoidalen Kurve, die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes ergab einen Wert von $R^2=0,7623$, was angesichts der Arbeit mit biologischem Material vertretbar ist. Die EC50 wurde für $4,558 \times 10^{-9}$ mol NDP-MSH berechnet.

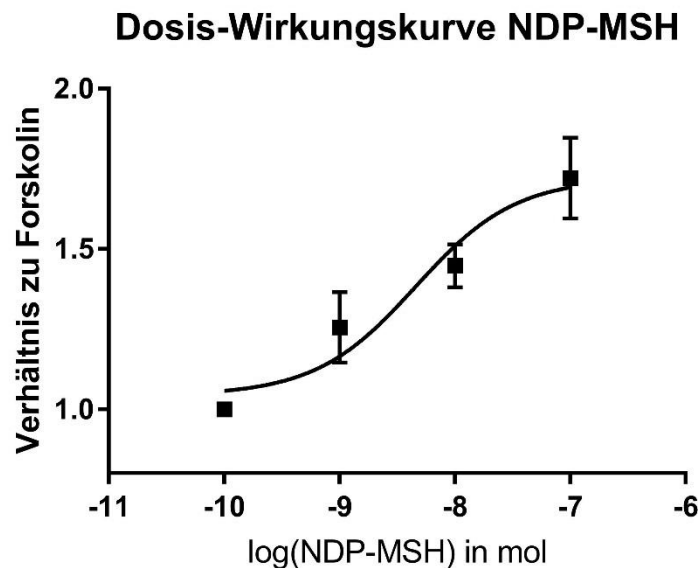


Abb. 28 Dosis-Wirkungskurve der von NDP-MSH vermittelten cAMP-Stimulation in humanen metastatischen A375 Melanomzellen.

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen und auf den Wert von Forskolin normalisiert. Die Konzentrationen von NDP-MSH wurden in logarithmisches Format umgewandelt, eine nichtlineare Regression mit variabler Steigung berechnet und graphisch dargestellt. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=3$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anpassung und Etablierung des cAMP-assays auf die Zelllinie A375 mit Fokus auf die Melanocortinrezeptoren erfolgreich war und die Experimente mit hoher Effizienz durchgeführt werden konnten. Die Bestimmung in Triplikaten wurde beibehalten, um statistisch aussagekräftige Daten zu erzielen, wodurch schon bei einem Einzelexperiment eine Abschätzung über die Wirksamkeit einer Substanz getroffen werden konnte. Die Vorstimulation mit Forskolin hatte den zusätzlichen Vorteil, dass nicht nur ein agonistischer Effekt und dadurch eine Steigerung der cAMP-Produktion sichtbar gemacht werden konnten, sondern auch ein potentieller antagonistischer Effekt. Die getesteten Substanzen konnten daher sowohl auf ihr stimulatorisches als auch inhibitorisches Potenzial getestet werden. Da der experimentelle Aufbau bei der Testung durch NDP-MSH stabile und reproduzierbare Ergebnisse geliefert hat, wurde das Setting für alle weiteren, neu synthetisierten Peptide übernommen.

5.4 Biologische Testung von EEKE, EEDCK, EGGSVES und HFRW

Nachdem nun ein verlässliches System für das Evaluieren von neu synthetisierten Peptiden bezüglich der Aktivität an Melanocortinrezeptoren etabliert wurde, konnten die in Kapitel 5.2 beschriebenen Peptide EEKE, EEDCK und EGGSVES dieser Testung unterworfen werden. Da die potentiellen Liganden in ihrer Wirksamkeit ähnlich oder besser als der bereits bekannte Ligand NDP-MSH sein sollten, wurde als Konzentrationsbereich ein Spektrum von 10 nM bis 1 µM pro well der jeweiligen Substanz verwendet. Dies ist eine log-Einheit höher als der wirksame Bereich von NDP-MSH, wodurch eine zu NDP-MSH vergleichbare Stimulation sichtbar gemacht werden kann. Höhere Konzentrationen wurden nicht getestet, da ein Effekt, der erst bei einer Substanzmenge im hohen mikromolaren Bereich auftreten würde, nicht mehr mit Sicherheit auf eine selektive Bindung an einen Melanocortinrezeptor im Gegensatz zu anderen Targets zurückzuführen ist.

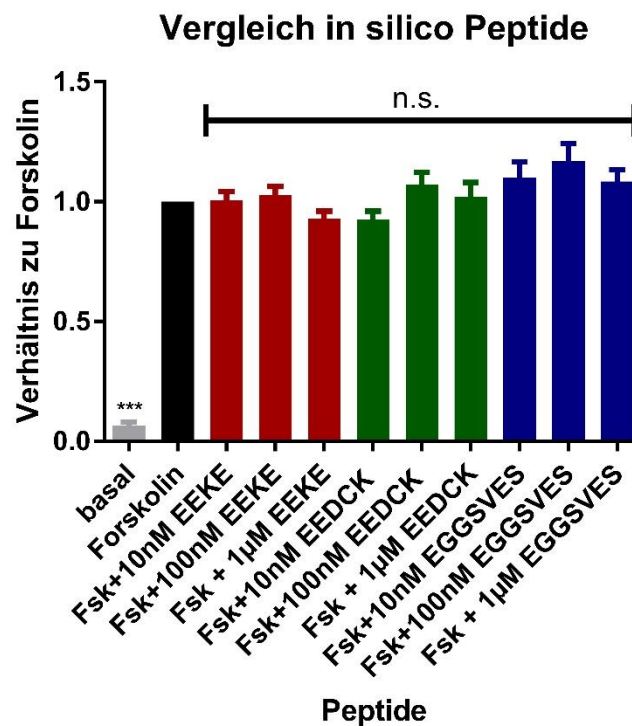


Abb. 29 Vergleich der durch Forskolin und drei synthetisierte Peptide (EEKE, EEDCK und EGGSVES) stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=6$).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (* zeigt einen signifikanten Unterschied zur mit Forskolin vorstimulierten Exkretion). Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p>0,05$), ein Symbol $p<0,05$, zwei Symbole $p<0,005$, drei Symbole $p<0,0005$.

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, konnte keines der drei Peptide einen signifikanten Effekt auf die cAMP-Produktion erzielen, weder als Stimulation noch als Inhibition. Auch konnte kein Trend in eine Richtung, Zunahme oder Abnahme der cAMP-Konzentration, erkennbar gemacht werden.

Diese Ergebnisse waren zu erwarten, da die Aminosäuresequenzen der in silico entworfenen Peptide sehr unterschiedlich zur bereits bekannten, bindenden Sequenz waren. Ein Grund für die sehr große Abwandlung könnte das in der Publikation verwendete Homology-Modell sein,⁶⁷ das mit 49,8 % Sequenz-Gleichheit zwischen dem MC1R und der verwendeten Vorlage trotz einer höheren Ähnlichkeit großen Spielraum zwischen dem simulierten Zustand des Rezeptors und der wahren Gegebenheit lässt. Da auch beschrieben wird, dass die neu gefundenen Liganden einen höheren Docking-Score aufweisen als die Bindungssequenz His-Phe-Arg-Trp, ist zu vermuten, dass das berechnete Modell nicht valide ist.

Zusätzlich wurde auch das Tetrapeptid HFRW auf seine Aktivität getestet, dargestellt in Abbildung 30.

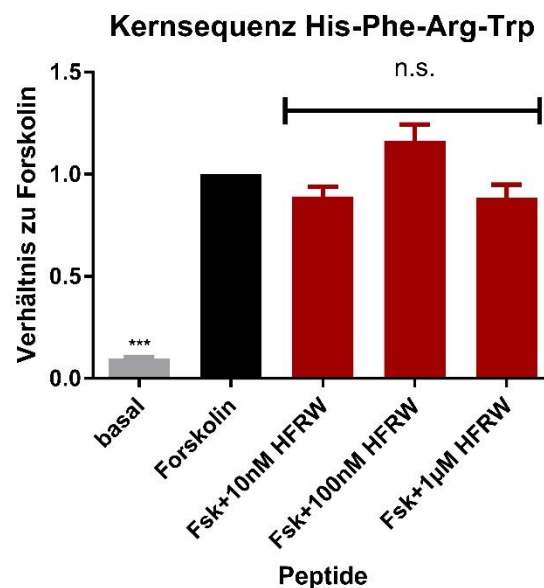


Abb. 30 Vergleich der durch Forskolin und HFRW stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=6).

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den Angaben in Abbildung 29.

Hier wurde ebenfalls keine erhöhte cAMP-Aktivität festgestellt, obwohl dies die bereits bekannte Bindungssequenz des α -MSH darstellt. Im Vergleich zu NDP-MSH sollte zumindest eine Aktivität im hohen nanomolaren Bereich sichtbar werden, da α -MSH ebenfalls eine geringere Aktivität als NDP-MSH aufweist⁷⁸. Jedoch konnte auch über mehrere Experimente mit verschiedenen Konzentrationen kein cAMP-Anstieg gemessen werden. Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde nun für die weitere

Peptidsynthese ein gangbares Konzept gesucht, da sichergestellt werden musste, dass auch eine Teilstruktur aktiv am Rezeptor sein konnte.

5.5 Synthese und Vergleich der biologischen Aktivität von D- und L-Aminosäuren in Position 2

Da in der Sequenz von NDP-MSH L-Phenylalanin durch D-Phenylalanin ersetzt wurde und sich die Wirksamkeit unter anderem dadurch erhöht hatte⁷⁹, wurde in Betracht gezogen, dass eine solche Modifikation auch in der Teilstruktur diesen Effekt zeigen könnte. Daher wurde die Position 2 des Tetrapeptids variiert und untersucht, um ein wirksames Peptid zu generieren, auf dessen Grundstruktur weitere Abwandlungen aufgebaut werden konnten.

Zusätzlich zum Austausch von D-Phenylalanin für L-Phenylalanin, wurde Tyrosin in Position 2 eingeführt, wiederum sowohl das D- als auch das L-Enantiomer. Da Tyrosin die natürliche Aminosäure ist, die Phenylalanin strukturell am ähnlichsten ist, wurde es ausgewählt, um den Effekt dieser Änderung in Form der zusätzlichen Hydroxygruppe zu dokumentieren.

Die Aminosäuren in D-Konfiguration wurden zur besseren Unterscheidung als Kleinbuchstaben im One-letter-code angegeben, die L-Enantiomere wurden weiterhin als Großbuchstabe geführt. Somit ergaben sich die folgenden Namen für die neu synthetisierten Peptide: HfRW (His-D-Phe-Arg-Trp), HYRW (His-Tyr-Arg-Trp) und HyRW (His-D-Tyr-Arg-Trp). Die Strukturen der Peptide und ihre Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 31 dargestellt.

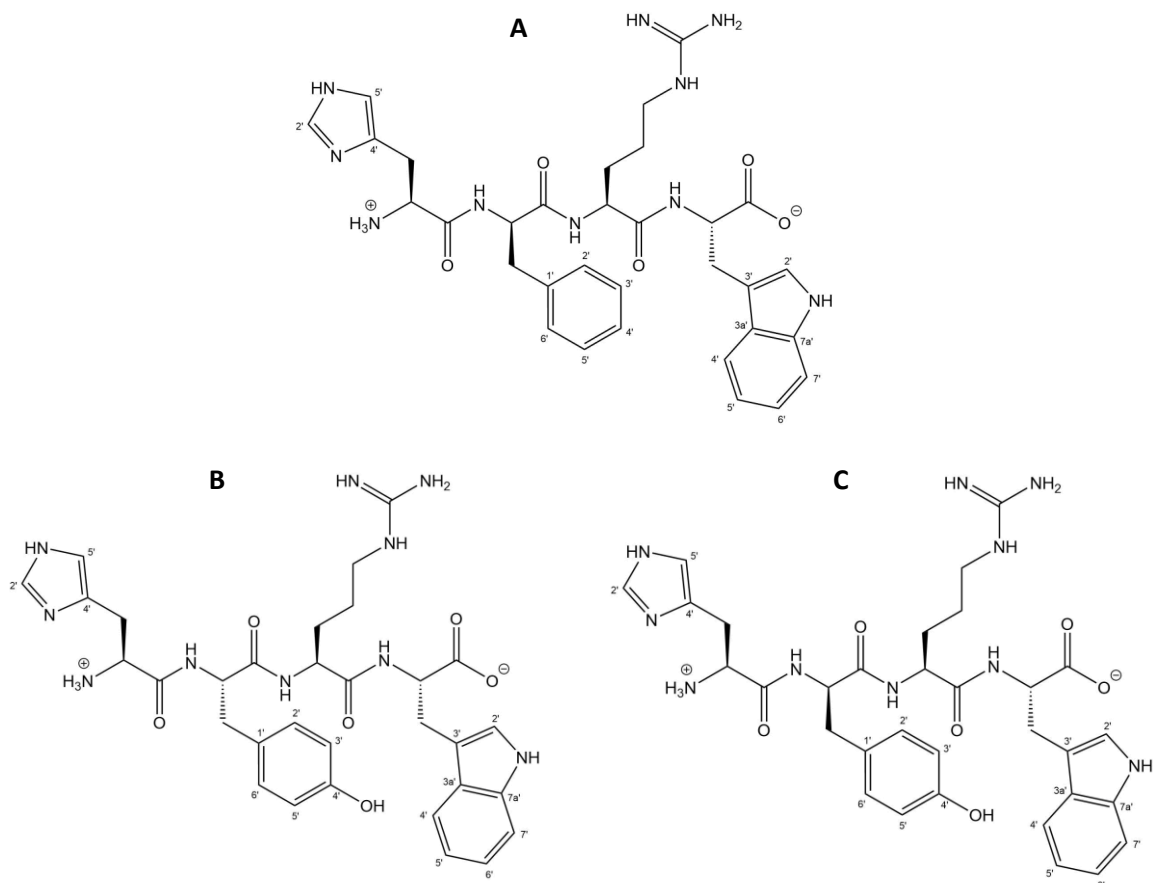


Abb. 31 Strukturen der neu synthetisierten Peptide mit Variation an Position 2

Abb. 31A: His-D-Phe-Arg-Trp (HfRW)

Abb. 31B: His-Tyr-Arg-Trp (HYRW)

Abb. 31C: His-D-Tyr-Arg-Trp (HyRW)

Die Synthesen der Peptide konnten analog zur Synthese von HFRW durchgeführt werden und ergaben Ausbeuten von 36 – 58 %, wiederum mit einer Reinheit von mehr als 95 %.

Um sicher gehen zu können, dass die synthetisierten Peptide auch tatsächlich unterschiedliche Konfigurationen haben, wurden alle NMR-spektroskopisch vermessen, wobei speziell für diese Analysen ein 500 MHz NMR-Gerät mit Kryokopf verwendet wurde, welches eine erhöhte Sensitivität aufweist. Tabelle 9 zeigt einen Überblick über die chemischen Verschiebungen der Positionen, die deutliche Unterschiede aufweisen. Im direkten Vergleich der je zwei Peptide, die sich nur durch die Konfiguration an einer Position unterscheiden, ist sichtbar, dass diese Differenzen die Position 3, Arginin, und dabei, wie erwartet, die Protonen am meisten betreffen.

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| Positionen | Hybridisierung | ^1H | ^{13}C | ^1H | ^{13}C |
|---------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | | HFRW | | HfRW | |
| Arg-1 | C | -- | 172,87 | -- | 173,50 |
| Arg-2 | CH | 4,07 | 54,07 | 3,85 | 54,29 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,53/1,49 | 28,79 | 1,25/1,07 | 28,16 |
| Arg-4 | CH ₂ | 1,31 | 24,69 | 0,84/0,76 | 24,53 |
| | | HYRW | | HyRW | |
| His-5' | CH | 7,22 | 119,16 | 7,56 | 119,14 |
| Tyr-4' | CH | 7,54 | 118,99 | 7,13 | 118,71 |
| Arg-2 | CH | 4,05 | 54,18 | 3,81 | 54,22 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,48 | 28,68 | 1,23/1,02 | 28,14 |
| Arg-4 | CH ₂ | 1,27 | 24,67 | 0,81/0,73 | 24,49 |

Tab. 9 Übersicht der Unterschiede der chemischen Verschiebungen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von vier Peptiden

Die Peptide wurden in Konzentrationen von 3 – 5 mg pro ml in D_2O vermessen und die Spektren mit Topspin 2.1 ausgewertet. Nach der Zuordnung der C-Atome wurden die chemischen Verschiebungen von jenen Peptiden, die sich nur in der Konfiguration an einer Stelle unterscheiden, verglichen. Blau gekennzeichnet sind die Positionen, bei denen ein deutlicher Unterschied in der Verschiebung zwischen den beiden Peptiden mit gleicher Aminosäuresequenz aber unterschiedlicher Konfiguration besteht. Alle chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Die vollständigen Tabellen der Signale sind im experimentellen Teil Kapitel 7.2 abgebildet.

Im Kohlenstoffspektrum waren die Unterschiede in den Verschiebungen an vielen Positionen unter 0,5 ppm und daher durch statistische Streuung erklärbar. Eine größere Abweichung zeigten C1 und C3 von Arginin bei den beiden Peptiden HFRW und HfRW.

Durch die um das Zwanzigfache kleinere Skala im Protonenspektrum sind hier bereits Unterschiede ab 0,15 ppm bedeutend. Auch bei diesen Spektren stachen die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen von Arginin hervor, dies betraf sowohl HFRW und HfRW als auch HYRW und HyRW. Betrachtete man die dreidimensionale Struktur der Peptide, wurde sichtbar, dass sich durch die Konformationsänderung die Seitenketten der Aminosäuren in räumlicher Nähe zueinander befinden können (D-Konfiguration) oder nicht (L-Konfiguration). Da die Kohlenstoffatome das Rückgrat des Moleküls darstellen, sind sie meist nicht oder nur wenig von Wechselwirkungen betroffen und zeigen daher weniger Unterschiede in den chemischen Verschiebungen. Die Wasserstoffatome haben durch ihre außenstehende Lage mehr Interaktionsmöglichkeit, wodurch Änderungen im ^1H -Spektrum deutlicher zu sehen sind. Die Protonen des Argininmoleküls bekamen durch die Konformationsänderung unmittelbare Nachbarn in Form des Phenyl- oder Phenolrings von Phenylalanin bzw. Tyrosin, wodurch es zu einer geänderten chemischen Verschiebung kam.

Zusätzlich zeigten auch die Positionen 4' von Tyrosin und 5' von Histidin der Peptide HYRW und HyRW größere Änderungen durch die unterschiedliche Konformation. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass die räumliche Nähe der Seitenketten, die aufgrund der D-Konfiguration in HyRW zustande kam,

eine Wechselwirkung zwischen der aciden, phenolischen Hydroxygruppe und dem protonierbaren Imidazolring ermöglichte. In der räumlichen Anordnung der Aminosäuren bei HYRW befinden sich diese beiden Seitenketten an gegenüberliegenden Positionen und können so nicht miteinander interagieren. Ebenso ist dieser Unterschied in den Peptiden HFRW und HfRW nicht sichtbar, weil der Phenylring des Phenylalanins keine Wechselwirkung mit Histidin eingehen kann.

Somit konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Synthese oder die Aufreinigung eine Racemisierung stattgefunden hat und die einzelnen Aminosäuren auch die gewünschten, unterschiedlichen Konfigurationen aufwiesen.

Diese vier Peptide wurden nach der bereits definierten Vorschrift an A375 Zellen getestet (HFRW wurde bereits in Kapitel 5.4 beschrieben) und ihr Potential zur Erhöhung des cAMP-Levels wurde evaluiert.

Vergleich D- und L-Aminosäuren in Position 2

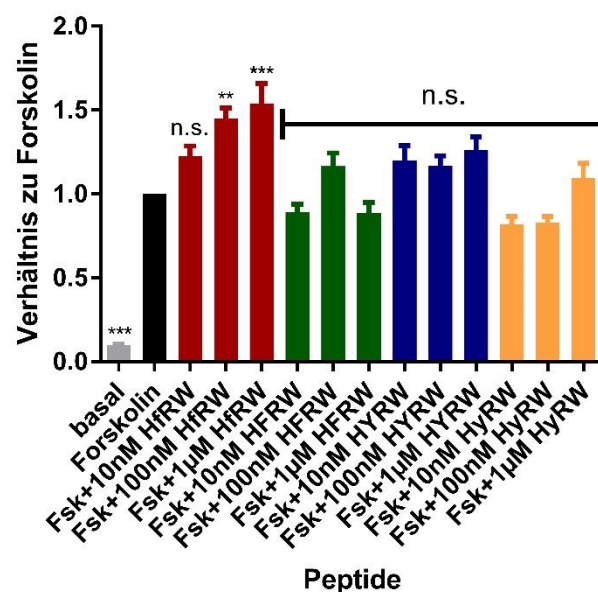


Abb. 32 Vergleich der durch Forskolin und vier synthetisierte Peptide (HfRW, HFRW, HYRW, HyRW) stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=6$).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (* zeigt einen signifikanten Unterschied zur mit Forskolin vorstimulierten Exkretion). Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p>0,05$), ein Symbol $p<0,05$, zwei Symbole $p<0,005$, drei Symbole $p<0,0005$.

Abbildung 32 zeigt, dass der Austausch von L-Phenylalanin durch D-Phenylalanin einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit des Peptids zur Folge hat. Die Stimulation der cAMP-Synthese tritt statistisch signifikant ab einer Konzentration von 100 nM HfRW auf, eine Inkubation mit 10 nM HfRW konnte zwar eine erhöhte Konzentration von cAMP erirken, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei den Peptiden HYRW und HyRW konnte beobachtet werden, dass ein Wechsel von Phenylalanin zu Tyrosin keinen positiven Effekt auf die Stimulationsfähigkeit hervorruft. Hier konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Peptiden mit D- und L-Tyrosin festgestellt werden. Über alle Experimente gemittelt, wurde kein Trend sichtbar.

Im Vergleich zu NDP-MSH ist bei HfRW der stimulatorische Effekt erst ab einer zehnfach erhöhten Konzentration des Peptids zu beobachten. In Abbildung 33 wird dies durch den Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der beiden Substanzen dargestellt. Die EC₅₀ von HfRW wurde berechnet und war mit $1,214 \times 10^{-8}$ mol, wie bereits beobachtet, ca. eine log-Einheit höher als die EC₅₀ von NDP-MSH ($4,558 \times 10^{-9}$ mol).

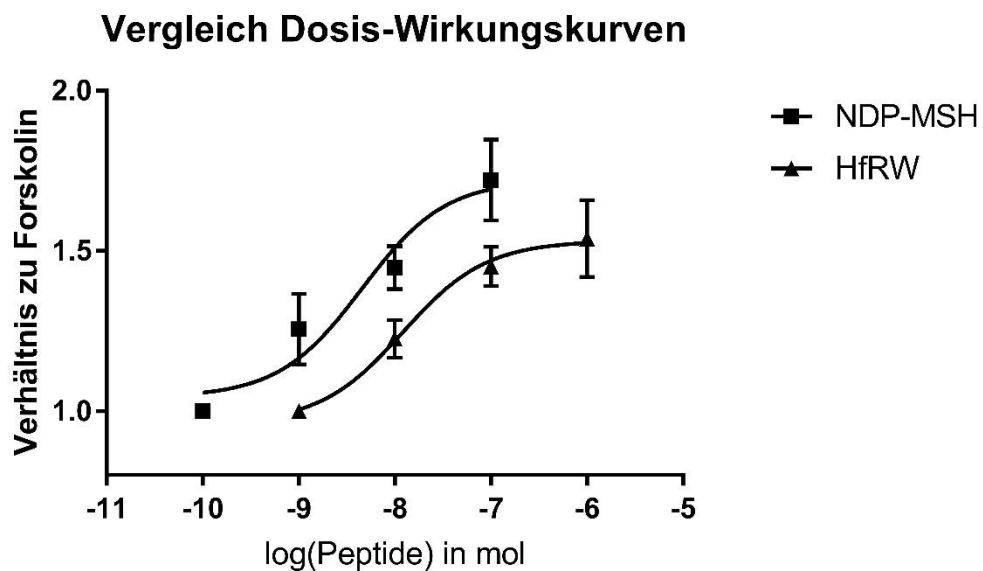


Abb. 33 Dosis-Wirkungskurve der von NDP-MSH bzw. HfRW vermittelten cAMP-Stimulation in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen und auf den Wert von Forskolin normalisiert. Die Konzentrationen von NDP-MSH wurden in logarithmisches Format umgewandelt, eine nichtlineare Regression mit variabler Steigung berechnet und graphisch dargestellt.

Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=3-6).

Dies bedeutete für die weiteren Syntheseversuche, dass D-Phenylalanin an Position 2 beibehalten und nur Variationen an den anderen drei Aminosäuren vorgenommen werden sollten. Da bereits eine kleine Änderung wie die zusätzliche Hydroxygruppe am Phenylring zu einem Wirkungsverlust führte, wurde diese Position nicht mehr verändert.

5.6 Austausch der Positionen 1, 3 und 4 durch natürliche Aminosäuren

Der nächste Schritt zur Modifikation der ursprünglichen Sequenz war die Einbringung von strukturell ähnlichen, jedoch natürlich vorkommenden, proteinogenen Aminosäuren. Durch die D-Aminosäure in Position 2 sollte eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen bereits erreicht worden sein, weshalb für die anderen Positionen nach natürlichen Aminosäuren gesucht wurde, um weiterhin eine einfache und kostengünstige Synthese der Peptide gewährleisten zu können.

Um die Struktur-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Aminosäuren studieren zu können, wurde jeweils nur eine Position ausgetauscht und der Rest des Peptids wie in der ursprünglichen Zusammensetzung beibehalten.

Die eigentliche Kernsequenz His-Phe-Arg-Trp hat abwechselnd eine basische Aminosäure und eine mit aromatischer Seitenkette (im Fall von Histidin erfüllt der Imidazolring beide Kriterien). Auch wenn die Sekundärstruktur bei so kleinen Peptiden noch nicht so ausgeprägt ist wie bei Oligo- und Polypeptiden, kann ein einzelner Austausch einer Aminosäure, die eine Seitenkette mit grundlegend anderen chemischen Eigenschaften besitzt, zu einem großen Unterschied in der Wirksamkeit führen. Daher sollte das bestehende Muster beibehalten werden, um auch bezüglich der Gesamteigenschaften des Peptids keine Änderungen zu verursachen, die eine mögliche Rezeptorbindung beeinflussen.

An Position 1 befindet sich Histidin, eine basische Aminosäure, die zusätzlich einen aromatischen Fünfring in der Seitenkette besitzt. Um die basischen Eigenschaften auch weiterhin zu erhalten, wurde auf einen aromatischen Ring verzichtet und als Modifikation L-Lysin verwendet. Lysin ist durch die zusätzliche, endständige Aminogruppe etwas stärker basisch als Histidin, ist aber sonst hinsichtlich Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit sehr ähnlich.

Auch an Position 3 ist eine basische Aminosäure, Arginin, zu finden, die durch die Guanidinogruppe im Gegensatz zu Histidin stark basische Eigenschaften und eine höhere Flexibilität besitzt. Um wieder eine ähnliche Substitution zu verwenden, wurde ebenfalls L-Lysin als Ersatz ausgewählt, weil es durch die aliphatische Kette mit einer basischen, endständigen Gruppe auch in diesem Fall die naheliegendste Option war.

Die letzte Aminosäure, Tryptophan, ist gekennzeichnet durch den Indolring in der Seitenkette, welcher dem Molekül einen insgesamt hydrophoben Charakter gibt. Anders als Histidin und Arginin ist diese Aminosäure ungeladen. Die beiden anderen Aminosäuren mit Aromaten in der Seitenkette, Phenylalanin und Tyrosin, ähneln einander in vielen Eigenschaften. Ausschlaggebend für die Verwendung von Tyrosin war das Vorhandensein einer phenolischen Hydroxylgruppe, wodurch der daran gebundene Wasserstoff bei einer Reaktion oder Interaktion leicht abgespalten werden könnte.

Somit ergaben sich drei neue Peptide, die synthetisiert und getestet werden sollten, Lys-D-Phe-Arg-Trp (KfRW), His-D-Phe-Lys-Trp (HfKW) und His-D-Phe-Arg-Tyr (HfRY). Die Strukturen der drei Peptide sind in Abbildung 34 dargestellt. Zuvor wurde noch verifiziert, ob die genannten Peptide bereits in irgendeiner Form getestet und publiziert wurden. Dafür wurde die ChEMBL Datenbank in Anspruch genommen, welche eine chemische Datenbank von bioaktiven Molekülen darstellt.³⁷ Zum damaligen Zeitpunkt und auch bis zum Erstellen dieser Arbeit wurden für die beiden Peptide KfRW und HfRY keine Einträge gefunden, HfKW konnte nur als Teilsequenz von drei Octapeptiden gefunden werden, die auf antifungale Wirkung untersucht wurden⁸⁰. Zusätzlich wurde in der betreffenden Publikation L-Phenylalanin statt der D-Form verwendet. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die vorgeschlagenen Peptide noch nicht auf ihre Aktivität gegenüber einem Melanocortinrezeptor getestet wurden. Zusätzlich konnte ausgeschlossen werden, dass die Peptide bekannte Liganden an einem anderen Targetprotein sind, was bei einer eventuell positiven Wirkung auf MC-Rezeptoren zu erhöhtem Potential für Nebenwirkungen führen könnte.



Abb. 34 Strukturen der neu synthetisierten Peptide mit veränderten Aminosäuren an den Positionen 1, 3 und 4

Abb. 34A: Lys-D-Phe-Arg-Trp (KfRW)

Abb. 34B: His-D-Phe-Lys-Trp (HfKW)

Abb. 34C: His-D-Phe-Arg-Tyr (HfRY)

Die Peptide konnten nach der bereits etablierten Vorschrift (Kapitel 4.1) mit 44 – 75 % Ausbeute synthetisiert werden, die Reinheit nach der finalen Aufreinigung betrug 94 – 99 %.

Die Testung der Aktivität am MC1R mittels cAMP assay ergab für KfRW und HfKW in keinem Experiment eine Änderung in der detektierten cAMP Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe, die nur mit Forskolin stimuliert wurde. Bei den Ansätzen mit HfRY war zunächst eine Erhöhung feststellbar, im Mittel war diese jedoch nicht statistisch signifikant. Abbildung 35 zeigt die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Experimente.

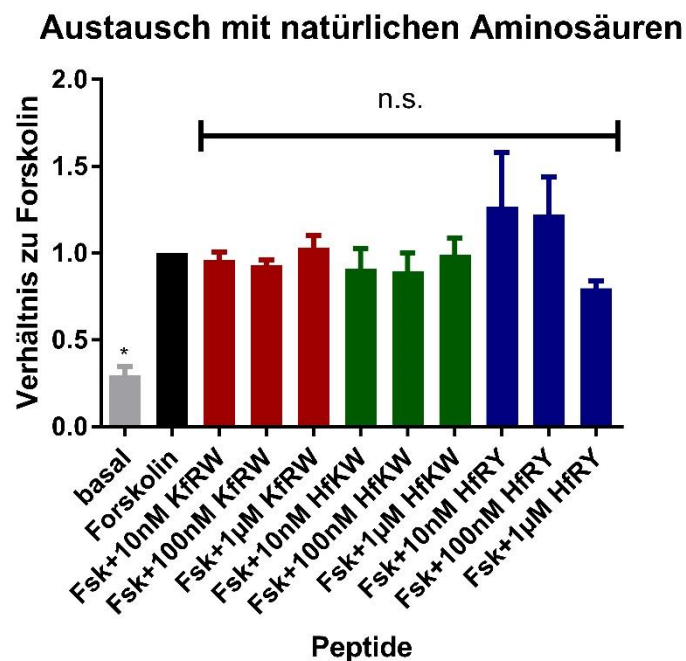


Abb. 35 Vergleich der durch Forskolin und drei synthetisierten Peptiden (KfRW, HfKW, HfRY) stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=6).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (* zeigt einen signifikanten Unterschied zur mit Forskolin vorstimulierten Exkretion). Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p>0,05$), ein Symbol $p<0,05$, zwei Symbole $p<0,005$, drei Symbole $p<0,0005$.

Der Austausch der Positionen 1, 3 und 4 des Tetrapeptids konnte somit nicht zu einer Wirkungssteigerung beitragen, im Gegenteil, es wurde ein Wirkungsverlust beobachtet, da kein statistisch signifikanter Effekt gemessen werden konnte. Ein Grund dafür kann sein, dass trotz der Ähnlichkeit der Aminosäuren doch zu große strukturelle Unterschiede entstanden sind, die auch die chemischen Eigenschaften des Peptids beeinflussten. Vor allem der Austausch der basischen Aminosäuren führte zu einer Änderung im berechneten, isoelektrischen Punkt (pI) der jeweiligen Peptide von bis zu einer pH -Wert-Einheit, was zu einer veränderten Bindungsfähigkeit an Rezeptoren

beitragen kann. Tabelle 10 zeigt den Überblick zu den mithilfe des Peptide Calculators (www.pep-calc.com) berechneten isoelektrischen Punkten der vier Peptide.⁸¹

| Peptid | HfRW | KfRW | HfKW | HfRY |
|-----------------------------------|----------|----------|---------|---------|
| Berechneter isoelektrischer Punkt | pH 10,34 | pH 11,51 | pH 9,37 | pH 9,33 |

Tab. 10 Übersicht zu den berechneten isoelektrischen Punkten von vier Peptiden

Der isoelektrische Punkt gibt den pH-Wert an, bei dem in einem geladenen Molekül die Zahl der positiven und negativen Ladungen genau gleich ist. Die Berechnung des *pI* erfolgt mithilfe eines Peptidberechnungstools (www.pep-calc.com).⁸¹

Da das Peptid mit vier Aminosäureresten bezüglich seiner Struktur schon sehr reduziert ist, können Änderungen wie z.B. das Fehlen eines Aromaten (Austausch von Lysin für Histidin) ebenfalls zu einem Wirkungsverlust führen. Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht, die für die Bindung wichtigen Teilelemente des Peptids herauszufiltern, um diese beibehalten zu können und dennoch gezielte Modifikationen des ursprünglichen Peptids an nicht-essentiellen Stellen durchzuführen.

5.7 In silico-Studien zur weiteren Charakterisierung der Liganden-MC1R-Interaktion

Um gezielter nach Modifikationen am ursprünglichen Peptid suchen zu können, wurde ein neuer Weg eingeschlagen. Anstatt verschiedene Modifikationen an allen Positionen zu synthetisieren und anschließend zu testen, wurde versucht, mithilfe von in silico-Methoden zu ermitteln, welche Regionen des Moleküls für die Bindung an den Rezeptor wichtig sind und welche eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Da von den Melanocortinrezeptoren bis dato noch keine Kristallstrukturen publiziert wurden, wurde ein ligandenbasierter Ansatz gewählt. Dazu wurde zuerst evaluiert, welche Moleküle bereits als Liganden am Melanocortin-1-Rezeptor beschrieben und getestet wurden. Als Datenbank wurde wieder die ChEMBL-Datenbank verwendet,³⁷ die Extraktion der aktiven Moleküle wurde mithilfe der KNIME Analytics Platform durchgeführt.⁸² Zusätzlich zu den Basisfunktionen von KNIME wurde ein Knoten der Firma Inte:ligand verwendet, mit dessen Hilfe die ChEMBL Datenbank durchsucht und die gefundenen Moleküle weiterverarbeitet werden konnten.

Die am MC1R aktiven Moleküle wurden wie in Kapitel 4.7.1 gesucht, gefiltert und von Dubletten bereinigt. Dies ergab 858 Liganden, die eine nachgewiesene Aktivität am MC1R haben, von denen nach dem Aussieben nach Molekulargewicht, EC50 und biologischem System zur Testung 98 Liganden für weitere Berechnungen herangezogen wurden. Die vollständige Liste der verwendeten Liganden ist in Kapitel 7.3.1, Tabelle 12 dargestellt.

Da die Erstellung eines Pharmakophors aus so vielen unterschiedlichen Strukturen nicht möglich ist, wurden Cluster erstellt, die strukturell ähnliche Liganden zusammenfassten. Aus dem vorliegenden Datensatz wurden insgesamt neun Cluster gebildet, zusätzlich dazu wurde als Negativkontrolle ein Cluster aus Antagonisten generiert. Dafür wurden Liganden ausgewählt, die eine IC50 unter 50 nM besitzen, ebenfalls ein Molekulargewicht von unter 1000 g/mol und bereits an menschlichen Zellen getestet wurden.

Aus jedem Cluster wurde nun mithilfe der LigandScout Software ein Pharmakophor generiert. Hierbei wurden von jedem Molekül aus dem Cluster zuerst 25 und anschließend 200 Konformationen berechnet, welche für die Erstellung der Pharmakophore herangezogen wurden. Die Pharmakophore, die mit 25 Konformationen berechnet wurden, hatten teilweise nur sehr wenige gemeinsame Features, weswegen die Berechnung mit einer höheren Anzahl an Konformationen nochmals durchgeführt wurde.

Abbildung 36 zeigt die dreidimensionale Darstellung eines Pharmakophors (in diesem Fall von Cluster 1), die Sphären (chemische Features) zeigen an, dass hier eine Gemeinsamkeit zwischen den Molekülen des Datensets besteht und dadurch ein gemeinsames Merkmal entstanden ist.

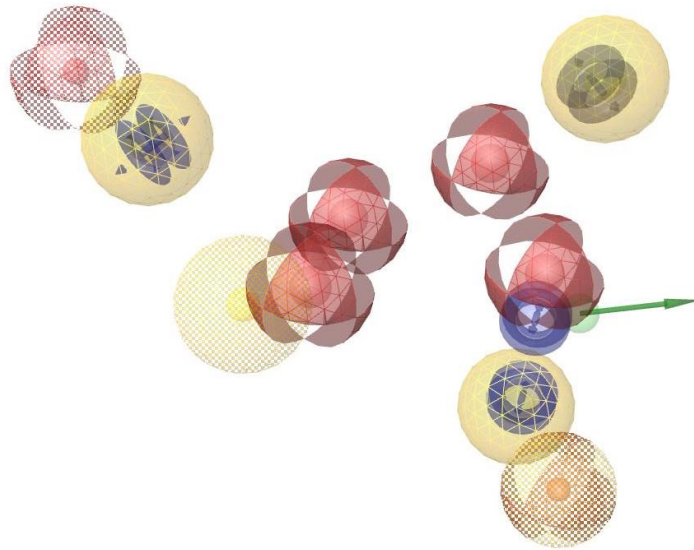


Abb. 36 Dreidimensionale graphische Darstellung des *in silico* generierten Pharmakophors von Liganden am MC1R

Bereits publizierte Liganden am MC1R wurden anhand ihrer strukturellen Merkmale in Cluster eingeteilt, von jeder Substanz wurden 200 Konformationen der 3D-Struktur erstellt und anschließend ein Pharmakophormodell berechnet. Hier dargestellt ist der Pharmakophor, der aus den Substanzen des Cluster 1 berechnet wurde.

Die Sphären stellen chemische Features dar, grün bedeutet ein Vorhandensein eines Wasserstoffbrückendonors, rot das eines –akzeptors, gelb zeigt einen hydrophoben Bereich an und ein blauer Ring ein aromatisches System. Vektorpfeile zeigen zusätzlich die Richtung eines Donors oder Akzeptors an.

Wie an diesem Pharmakophor ersichtlich ist, können einige Merkmale auch in Kombination auftreten, ein klassisches Beispiel dafür ist das Vorhandensein eines aromatischen Systems zusammen mit hydrophoben Merkmalen. In Abbildung 36 ist dies an drei Positionen zu sehen, an denen ein blauer Ring innerhalb einer gelben Sphäre auftritt.

Zusätzlich ist noch zu erwähnen, dass für jeden Cluster mehrere Pharmakophore generiert wurden, die einen unterschiedlich hohen Score aufwiesen, welcher anzeigte, wie sehr der Pharmakophor in Einklang mit möglichst vielen Teilstrukturen der Liganden stand. Um ein valides Modell zu erhalten, wurde standardmäßig das Modell mit dem höchsten Score weiterverwendet.

Diese neun Pharmakophore sollten mit dem Tetrapeptid HFRW verglichen werden, um zu sehen, welche Teilstrukturen sowohl im Molekül als auch in den Pharmakophoren vorkommen. Dafür wurde die Alignment-Perspektive und -Funktion von Ligandscout verwendet, welche eine flexible Anpassung von Ligand und Pharmakophor ermöglicht. In Abbildung 37 wird die dreidimensionale Darstellung des Liganden-Pharmakophor-Komplexes von HFRW und dem Pharmakophor aus Cluster 1 gezeigt.

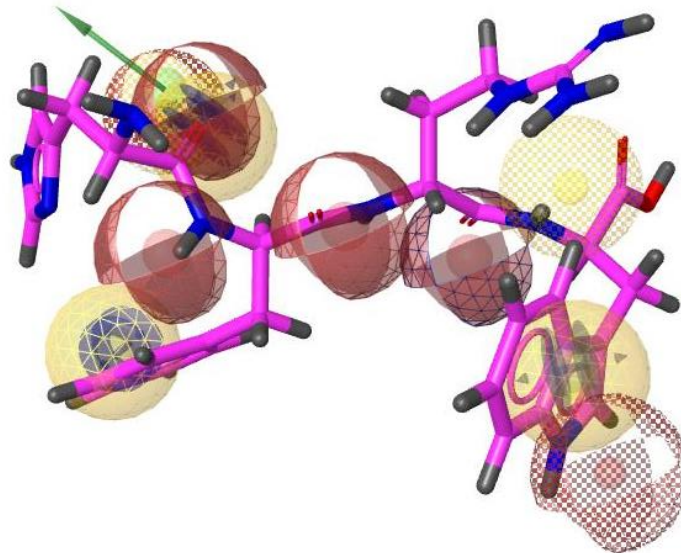


Abb. 37 Dreidimensionale graphische Darstellung des Alignments von HFRW und dem Pharmakophor von Cluster 1
 Es wurden 1000 Konformationen von HFRW berechnet und diese mit dem Pharmakophor von Cluster 1 abgeglichen. Dabei sind alle chemischen Features des Pharmakophors sichtbar, die Übereinstimmung der Features von Molekül und Pharmakophor kann in dieser Ansicht nicht dargestellt werden.
 Die Darstellung der chemischen Features erfolgt analog zu Abbildung 36, das Kohlenstoffgrundgerüst des HFRW-Moleküls ist rosa dargestellt, Wasserstoffatome grau, Sauerstoff rot und Stickstoff blau.

Da die abgeglichenen Merkmale nur im Programm in Zusammenhang mit der dort möglichen interaktiven Steuerung erfassbar sind, werden hier in weiterer Folge die zweidimensionalen Darstellungen abgebildet. Dabei ist zu beachten, dass vom Pharmakophor nur die Merkmale abgebildet werden, die sich auch im Molekül wiederfinden.

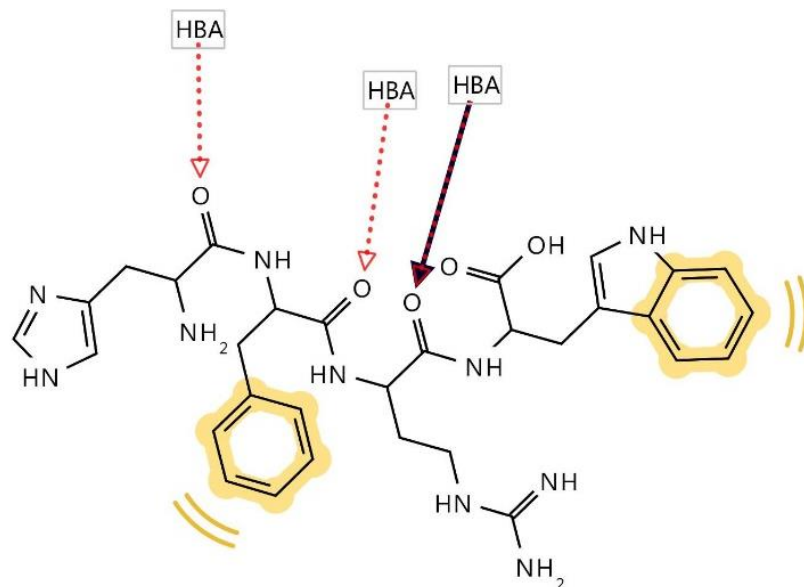


Abb. 38 Zweidimensionale graphische Darstellung des Alignments von HFRW und dem Pharmakophor von Cluster 1
 Die Berechnung des Alignments ist unter Abbildung 37 beschrieben, im Gegensatz zur dreidimensionalen Darstellung sind hier nur die chemischen Features hervorgehoben, die im Molekül und im Pharmakophor vorhanden sind und an ähnlichen Stellen gefunden wurden.
 Die Darstellung der chemischen Features erfolgt ähnlich der dreidimensionalen Illustration, rot bedeutet das Vorhandensein eines Wasserstoffbrückenakzeptors, gelb zeigt einen hydrophoben Bereich an und ein Vektorpfeil die Richtung des Akzeptors. Die schwarze Darstellung eines Pfeils in Kombination mit dem Rot des Akzeptors zeigt eine stärkere Interaktion an als die rote Darstellung alleine.

Abbildung 38 zeigt nun das zweidimensionale Alignment zwischen HFRW und dem Pharmakophor von Cluster 1. In dieser Darstellung ist klar ersichtlich, welche Merkmale sowohl beim Liganden als auch beim Pharmakophor vorkommen, ohne Berücksichtigung aller weiteren Eigenschaften des Pharmakophors, die keine Äquivalente im Ligandenmolekül haben. Die einzelnen Abbildungen der Pharmakophore und Alignments sind im experimentellen Teil (Kapitel 7.3.2 und 7.3.4) zu finden, in Tabelle 11 ist die Zusammenfassung und Auswertung der Berechnungen dargestellt.

| Cluster Nr. | Anzahl an gemeinsamen Feature Pairs (von gesamten Features im Pharmakophor) | Gemeinsame Feature Pairs in % | Score des Alignments |
|-------------|---|-------------------------------|----------------------|
| 1 | 5 von 13 | 38,5 % | 56,0 |
| 2 | 7 von 7 | 100,0 % | 75,0 |
| 3 | 7 von 12 | 58,3 % | 75,0 |
| 4 | 5 von 5 | 100,0 % | 55,5 |
| 5 | 9 von 11 | 81,8 % | 95,5 |
| 6 | 7 von 7 | 100,0 % | 75,6 |
| 7 | 7 von 9 | 77,8 % | 74,2 |
| 8 | 6 von 6 | 100,0 % | 67,6 |
| 9 | 8 von 10 | 80,0 % | 82,2 |

Tab. 11 Überblick der Alignments der neun Cluster mit HFRW

Die Anzahl an Feature Pairs gibt an, wie viele chemische Features des Pharmakophors mit Strukturmerkmalen im HFRW-Molekül übereinstimmen. Die Übereinstimmung wird zusätzlich mithilfe des Scores als Zahlenwert dargestellt, wobei die Zehnerstelle die Anzahl an übereinstimmenden Eigenschaften angibt und die Einerstelle die Güte des Alignments auf einer Skala von 1 bis 10. Die einzelnen Scores können nicht direkt miteinander verglichen werden, sondern nur über die Korrelation mit der Anzahl an Features. Um diese untereinander zu vergleichen, wurde der Prozentsatz an Übereinstimmungen angegeben.

Bei den Pharmakophoren mit bis zu sieben Merkmalen (Cluster Nr. 2, 4, 6 und 8) konnten jeweils alle Merkmale des Pharmakophors auch im Liganden in der gleichen Anordnung gefunden werden. Der Score der Alignments war hier im Bereich von 5 – 6 von 10 (Cluster 2, 4 und 6), Cluster 8 hatte einen Wert von 7,6 von 10. Die Pharmakophore mit einer höheren Anzahl an Merkmalen (Cluster 1, 3, 5, 7 und 9) waren sehr unterschiedlich in der Anzahl an Matches und wiesen 38,5 % bis 81,8 % an gemeinsamen Feature Pairs auf. Auch die Scores der einzelnen Alignments waren durchwegs sehr unterschiedlich, wobei ein hoher Prozentsatz an Feature Pairs auch mit einem niedrigen Score einhergegangen ist (Cluster 9), wodurch in diesem Alignment zwar viele gemeinsame Features gefunden wurden, die Positionen von diesen in Molekül und Pharmakophor jedoch nicht optimal waren. Umgekehrt wurde bei einem niedrigen Prozentsatz ein höherer Score erreicht (Cluster 1),

welcher anzeigt, dass die gemeinsamen Feature Pairs an sehr ähnlichen Positionen in Molekül und Pharmakophor liegen.

Wie bereits erwähnt, wurde auch ein Pharmakophor aus Inhibitoren berechnet (Darstellung in Kapitel 7.3.3), welcher als Negativkontrolle für ein Alignment mit HFRW verwendet wurde. Dieses konnte jedoch nicht berechnet werden, da keine Position des Liganden gefunden wurde, die in das Muster an Merkmalen des Pharmakophors passen würde. Dadurch wurde die Validität der berechneten Modelle bestätigt. Das Ziel war es, die für die Wirkung wichtigen Eigenschaften sichtbar zu machen und HFRW darf als Agonist daher nicht in einen Pharmakophor, also ein Schema für Antagonisten, passen.

Ebenso ist es möglich, ein Alignment von mehreren Pharmakophoren zu berechnen, dies wurde mit allen neun Pharmakophoren durchzuführen versucht. Die ausgewählten Liganden wiesen jedoch eine große Bandbreite an strukturellen Unterschieden auf, so konnte kein Alignment aus allen Pharmakophoren berechnet werden.

Von den neun Alignments wurde nun evaluiert, welche Teilstrukturen von HFRW öfter und welche weniger oft in den Pharmakophoren vorkommen. So konnte eine Strategie für die weiteren Synthesen erstellt werden, die berücksichtigt, ob Substituenten verändert werden sollten oder nicht.

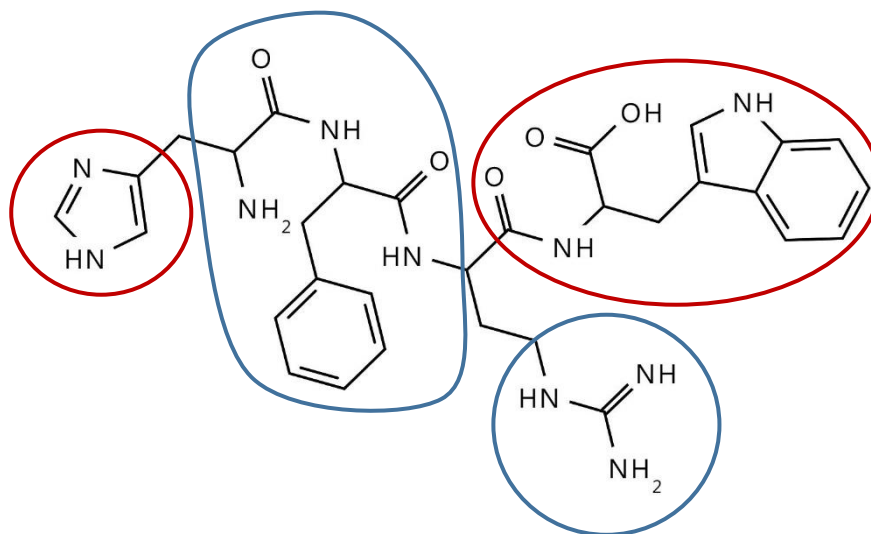


Abb. 39 Zweidimensionale Struktur von HFRW mit Kennzeichnung der möglichen Positionen für Modifikationen

Die gemeinsamen Feature Pairs der neun Alignments von HFRW mit den berechneten Pharmakophoren wurden quantifiziert und in Bezug zu den chemischen Strukturen im HFRW-Molekül gesetzt. Blau gekennzeichnete Strukturelemente wurden in über 50 % der Alignments als Feature Pairs angezeigt und sollten deswegen eine geringe Änderung erfahren, rot gekennzeichnete Teilstrukturen wurden in maximal 25 % der Alignments als Feature Pairs angezeigt und bieten daher breitere Möglichkeiten zur Substitution.

Die blau gekennzeichneten Teilstrukturen von HFRW in Abbildung 39 zeigen die beiden Regionen, die häufig (>50 %) in den Pharmakophoren dieselben Funktionalitäten aufwiesen. Zum einen sind dies die beiden ersten peptidischen Bindungen zwischen Histidin und Phenylalanin sowie Phenylalanin und

Arginin zusammen mit dem Benzylrest von Phenylalanin. Dies korreliert mit der bereits in Kapitel 5.5 beschriebenen Erkenntnis, dass Phenylalanin in Position 2 einen essentiellen Teil zur Wirkung beiträgt. Auch sollten die Peptidbindungen erhalten bleiben, da das abwechselnde Muster von Wasserstoffbrückendonoren und –akzeptoren in fast allen Pharmakophoren (sieben von neun) vorkommt. Zum anderen ist die zweite Teilstruktur, die auffallend oft in Pharmakophoren zu finden war, die Guanidinogruppe des Arginins. Hierbei wurde sowohl die gesamte Gruppe als positiv ionisierbarer Bereich als auch die einzelnen Aminogruppen als Wasserstoffbrückendonoren und –akzeptoren erkannt und in fünf von neun Pharmakophoren wiedergefunden. Daher war auch in diesem Fall die Strategie für die zukünftigen Synthesen, möglichst geringe Änderungen durchzuführen und die Funktionalität der Gruppe zu erhalten.

Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass die beiden endständigen Aminosäuren, Histidin und Phenylalanin, in den Pharmakophoren nur sehr selten (ein bis zwei von neun) vorkommen. Der aromatische Bereich des Indols war in zwei Fällen in den Pharmakophoren zu finden, der Stickstoff als Wasserstoffbrückendonor nur in einem. Die Funktionalitäten der dritten Peptidbindung (Arginin zu Tryptophan) konnten zwar in einigen Modellen (drei von neun) wiedergefunden werden, jedoch nicht so eindeutig wie die der beiden anderen. Der Imidazolring des Histidins konnte sogar nur bei einem Pharmakophor mit ähnlichen Funktionalitäten abgeglichen werden (Cluster 10). Hierbei wurden nicht der aromatische Ring, sondern die beiden Stickstoffe in ihrer Funktion als Wasserstoffbrückendonor bzw. –akzeptor den Features des Pharmakophors zugeordnet. Somit wurde davon ausgegangen, dass an den beiden endständigen Aminosäuren durchaus größere strukturelle Änderungen vorgenommen werden konnten, ohne mit einem Wirkungsverlust rechnen zu müssen.

5.8 Einbau von Variationen der natürlichen Aminosäuren

Nachdem nun durch die *in silico*-Analyse der bekannten Liganden ein Muster erkannt wurde, konnte eine Synthesestrategie dafür entwickelt werden, welche Teilstrukturen modifiziert werden sollten. Die Stabilität gegenüber Proteasen beachtend, wurden speziell Aminosäuren verwendet, die nicht natürlich vorkommen. Dies erweitert das Spektrum an Bausteinen zusätzlich und bietet neben dem Potenzial einer erhöhten Stabilität auch die Möglichkeit das Molekulargewicht besser zu beeinflussen. Um das Peptidrückgrat auf jeden Fall zu erhalten, wurden weiterhin alpha-Aminosäuren in L-Form verwendet.

5.8.1 Strategie zum Ersatz einzelner Positionen durch synthetische Aminosäuren

Als erstes wurden Modifikationen und Substitutionen am Histidin vorgenommen, wobei hier, basierend auf den Erkenntnissen der *in silico*-Berechnungen, absichtlich eine größere Variation der Aminosäuren verwendet wurde. Nachdem mit der Auswechslung von Histidin durch Lysin und dem damit verbundenen Wegfall des aromatischen Rings ein Wirkungsverlust einhergegangen ist, wurde für die Seitenkette weiterhin ein aromatisches System verwendet.

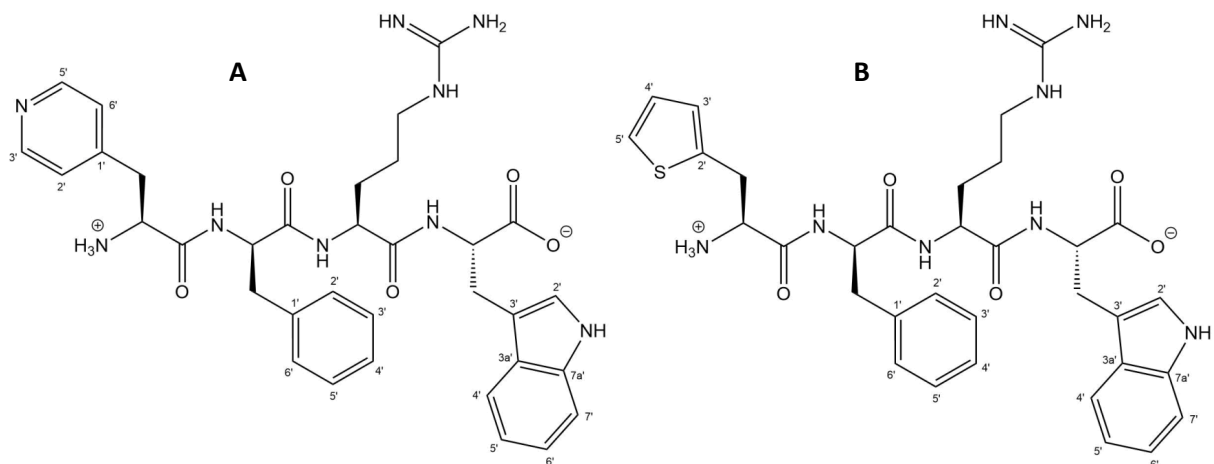


Abb. 40 Strukturen der Peptide mit unnatürlichen Aminosäuren an Position 1

Abb. 40A: 4-Pyridylalanin-D-Phe-Arg-Trp (Pal-fRW)

Abb. 40B: 2-Thienylalanin-D-Phe-Lys-Trp (Tha-fRW)

Abbildung 40A zeigt die Struktur des ersten modifizierten Peptids, hier wurde ein 4-Pyridylalanin anstatt des Histidins an Position 1 eingebaut (Pal-fRW). Der Pyridinring kann als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren, verhält sich ähnlich dem Imidazol basisch und ein kostengünstiges Reagens in der Synthese.

Im zweiten Molekül, dargestellt in Abbildung 40B, wurde der Stickstoff durch Schwefel in Form eines Thiophens als 2-Thienylalanin ersetzt (Tha-fRW). Hierbei wurde die Struktur des Fünfrings beibehalten, jedoch die Heteroatome ausgetauscht. Durch diese Änderung bleibt zwar der aromatische Charakter erhalten, es können allerdings keine Wasserstoffbrückenbindungen eingegangen werden, da weder Donoren noch Akzeptoren vorhanden sind.

Die Modifikationen an Position 3, Arginin, sollten den stark basischen Charakter weiter erhalten, da die Guanidinogruppe in mehreren Alignments als wichtiger Bestandteil vorgekommen ist (siehe Kapitel 5.7). Um trotzdem Variationen der ursprünglichen Struktur zu generieren, wurde Arginin in einem Fall durch Citrullin ersetzt (Abb. 41A). L-Citrullin ist eine natürliche Aminosäure, die jedoch nicht

proteinogen ist. Der Unterschied zu Arginin liegt in der endständigen Carbamoyl- anstatt der Guanidinogruppe, welche ebenso als Wasserstoffbrückendonor- und akzeptor fungieren kann.

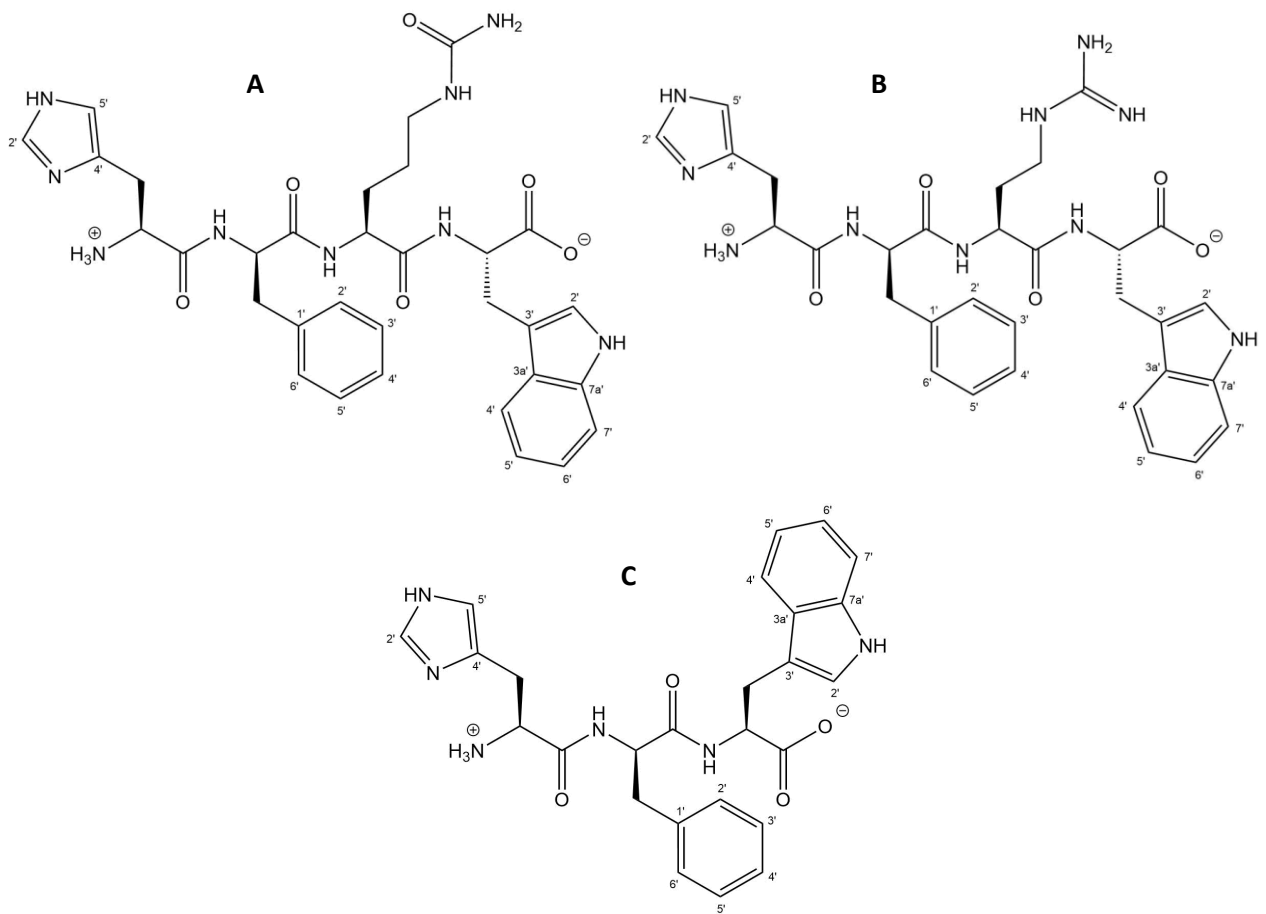


Abb. 41 Strukturen der Peptide mit unnatürlichen Aminosäuren an Position 3

Abb. 41A: His-D-Phe-Citrullin-Trp (Hf-Cit-W)

Abb. 41B: His-D-Phe-Norarginin-Trp (Hf-Nar-W)

Abb. 41C: His-D-Phe-Trp (HfW)

Um die Funktionalität der Argininseitenkette nicht zu ändern, wurde als zweite Modifikation eine Kettenverkürzung gewählt. Das verwendete Norarginin hat vier statt fünf Kohlenstoffatome in der aliphatischen Kette, die Guanidinogruppe bleibt jedoch unverändert (Abb. 41B). Leider konnte dieses Peptid nicht wie gewünscht synthetisiert werden, da die Kopplung von Norarginin nur zu einem sehr geringen Prozentsatz stattgefunden hat. Arginin selbst musste bereits in den vorangegangenen Ansätzen mindestens in doppelter Menge hinzugefügt werden, um akzeptable Kopplungen zu erreichen, meistens wurden diese dann noch zusätzlich wiederholt. Norarginin scheint noch schlechtere Reaktionseigenschaften zu besitzen, was sich darin bemerkbar machte, dass selbst nach mehreren Kopplungsversuchen (4 – 6 Wiederholungen) kein eindeutig negativer Kaiser-Test erreicht werden konnte, welcher eine vollständige Kopplung anzeigen würde. Da die Möglichkeit bestand, dass zumindest ein kleiner Prozentsatz des Tetrapeptids synthetisiert wurde, ist das unaufgereinigte Endprodukt vor der Purifikation analysiert worden. Bei der massenspektrometrischen Analyse war

jedoch kein signifikantes Signal bei $m/z = 631$ (Hf-Nar-W) erkennbar. Im HPLC-Chromatogramm konnten neben einem Hauptpeak zwar zusätzliche Peaks detektiert werden, jedoch wurde nach der Isolierung dieser Fraktionen auch in deren Massenspektren kein passendes Signal gefunden. Der Hauptpeak im Chromatogramm konnte als Tripeptid His-D-Phe-Trp (HfW) identifiziert, isoliert und aufgereinigt werden. Auch im Massenspektrum des unaufgereinigten Peptids war der Molpeak des Tripeptids ($m/z = 489$) das prominenteste Signal. Da HfW strukturell ähnlich der Grundstruktur HfRW war (Abb. 41C), wurde es ebenfalls aufgereinigt und in das Set der zu untersuchenden Substanzen aufgenommen.

Als letzten Ansatz zur Modifikation des Liganden wurde nach Variationen von Tryptophan gesucht, die durchaus andere Funktionalitäten besitzen durften, jedoch den aromatischen Charakter beibehalten sollten. Da der Austausch von Tryptophan durch Tyrosin (siehe Kapitel 5.6) offenbar eine zu große strukturelle Änderung war, wurde auch der Bicyklus erhalten. Der Stickstoff im Indolring hat nur bei einem Pharmakophor einen Gegenpart im HfRW-Molekül gefunden, daher wurde in der ersten Variante auf ein Heteroatom verzichtet und ein Indanylglycin als C-terminale Aminosäure eingesetzt (Abb. 42A). Dadurch konnte nach der Auswertung der biologischen Testungen eine Aussage darüber getroffen werden, ob an dieser Stelle ein Wasserstoffbrückendonator vorhanden sein muss oder ob dies die Wirkung nicht maßgeblich beeinflusst.

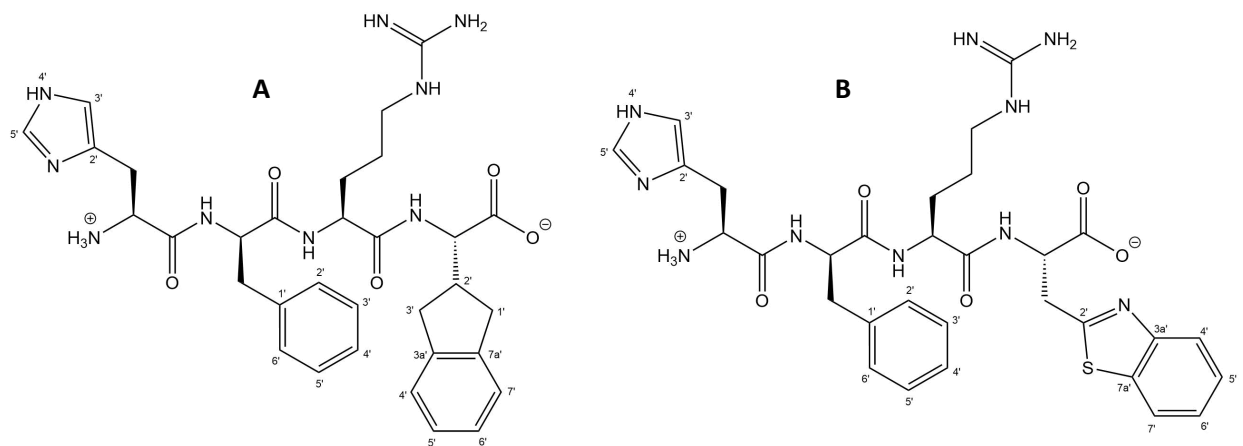


Abb. 42 Strukturen der Peptide mit unnatürlichen Aminosäuren an Position 4

Abb. 42A: His-D-Phe-Arg-Indanylglycin (HfR-Igl)

Abb. 42B: His-D-Phe-Arg-Benzothiazolalanin (HfR-Ala(Bth))

Als Gegensatz dazu wurde ein zusätzliches Heteroatom in den Aromaten aufgenommen und ein Benzothiazol anstatt eines Indols verwendet (Abb. 42B). Der Benzothiazolring bietet nun keinen Wasserstoffbrückendonator mehr, allerdings immer noch einen –akzeptor. Durch den Schwefel wird die Delokalisierung der Elektronen über beide Ringe gefördert und das Molekül bekommt einen hydrophoberen Charakter.

5.8.2 Biologische Testung der Peptide

Wie in Abbildung 43 gezeigt wird, konnte keines der zuvor beschriebenen Peptide einen signifikanten Effekt auf die cAMP-Produktion hervorrufen. Trotz der teils sehr geringen Änderungen an der Grundstruktur konnte in keinem der Versuche eine Steigerung oder Verringerung der cAMP-Konzentration beobachtet werden, die sich signifikant von der Stimulation durch Forskolin alleine unterscheidet oder einen Hinweis auf eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zugelassen hätte. Für die Peptide HfW und HfR-Ala(Bth) ist allerdings eine Tendenz ersichtlich (Abb. 43B bzw. C).

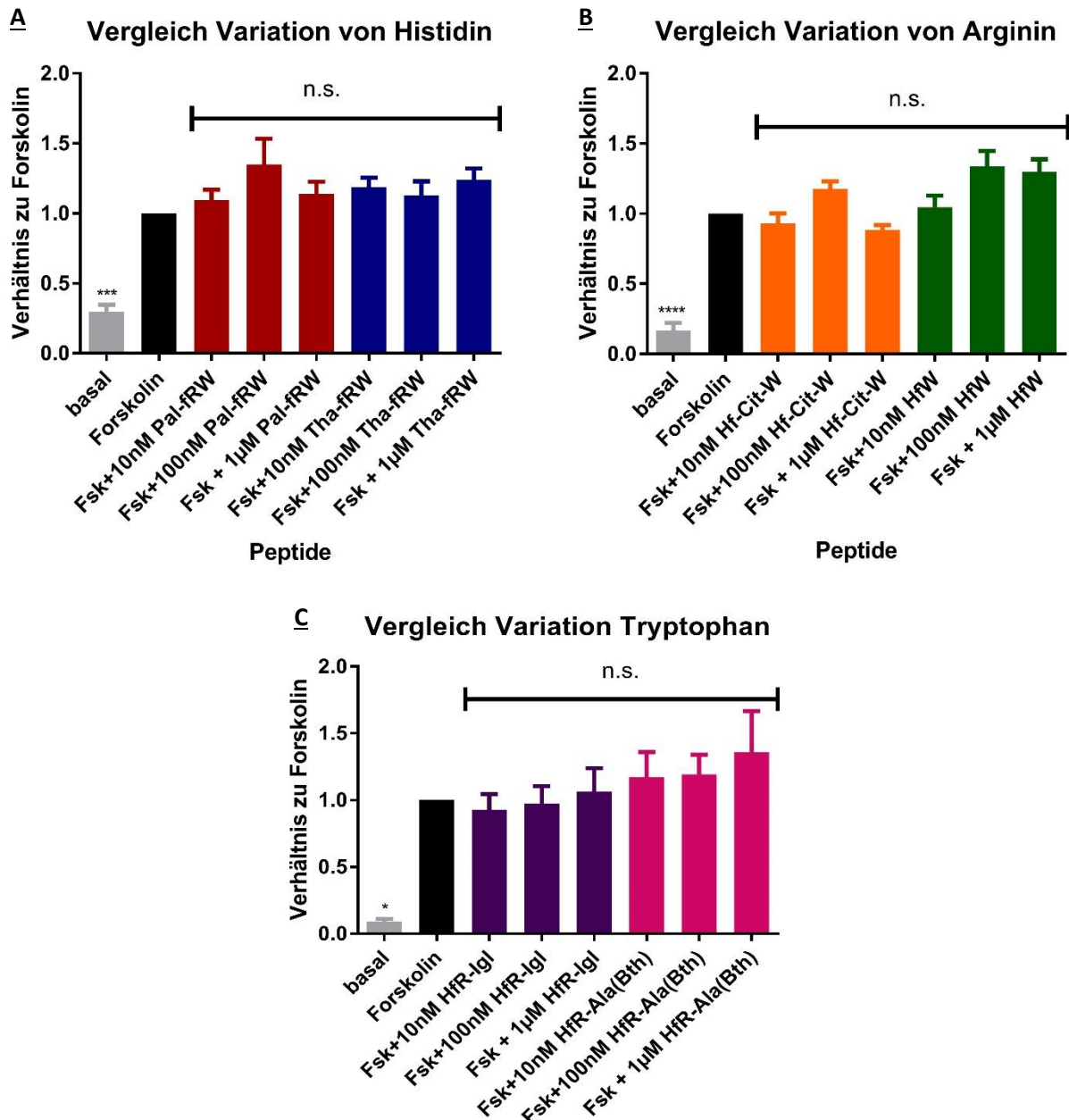


Abb. 43 Vergleich der durch Forskolin und sechs synthetisierten Peptiden stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen

Der Gehalt an radioaktiv markiertem cAMP wurde als counts per minute (CPM) gemessen, auf den Wert von Forskolin normalisiert und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=6).

Abb. 43A: Vergleich der Variation von Histidin, Abb. 43B: Vergleich der Variation von Arginin, Abb. 43C: Vergleich der Variation von Tryptophan

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's Test) berechnet (* zeigt einen signifikanten Unterschied zur mit Forskolin vorstimulierten Exkretion). Kein Symbol bzw. n.s. bedeutet ein nicht signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$), ein Symbol $p < 0,05$, zwei Symbole $p < 0,005$, drei Symbole $p < 0,0005$.

Gründe für die fehlende Wirksamkeit der Peptide können in erster Linie die hier gewählten Modifikationen sein, da jede Änderung eines Liganden immer Einfluss auf seine Fähigkeit zur Bindung an den Rezeptor hat. Auch kleine strukturelle Variationen führten zu einem vollkommenen Wirkungsverlust, daher muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das System zur Testung der Substanzen nicht optimal ist. Jedoch konnte die Stimulation mit dem bekannten Agonisten NDP-

MSH, wie in der Literatur beschrieben, reproduzierbar durchgeführt werden, weshalb angenommen wurde, dass neu synthetisierte Substanzen ebenfalls in dieser Weise auf ihre Struktur-Wirkungsbeziehung untersucht werden können.

5.9 Proliferationsassay der Peptide

Parallel zu den biologischen Testungen der cAMP-abhängigen Stimulation der MC1R-Aktivität wurden die neu synthetisierten Peptide in einem Proliferationsassay mit Melanomzellen untersucht. Dies war ein wichtiger Aspekt in der Evaluierung der pharmakologischen Sicherheit der Peptide. Gegebenenfalls erlaubt diese Untersuchung besser verträgliche von schlechter verträglichen Kandidaten zu unterscheiden. Für die Bestimmung der Proliferation wurde ein Test gewählt, der als Substrat eine gelbe Tetrazolium-Verbindung verwendet, die von lebenden Zellen in ein rot/violettes Formazan-Derivat umgewandelt wird. Dieser Farbumschlag wird anschließend photometrisch bestimmt (Durchführung siehe Kapitel 4.4.6). Die Zellen wurden mit 100 nM und 1 µM der jeweiligen Peptide versetzt und 48 Stunden inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Zum direkten Vergleich wurde NDP-MSH herangezogen. Da das Testsubstrat zum Zellkulturmedium hinzugefügt wurde, dieses selbst gefärbt ist und dadurch eine Eigenabsorption besitzt, ist für die Bestimmung des Leerwerts das Medium mit Substrat ohne Zellmaterial nach derselben Inkubationszeit vermessen worden.

Die Durchführung des Assays wird vom Hersteller mit einer 96-well-Platte empfohlen, was sich als nicht aussagekräftig für die verwendete Zelllinie erwiesen hat. Da die Zellen insgesamt 75 Stunden inkubiert wurden (24 Stunden nach dem Aussäen, 48 Stunden nach Hinzufügen der Peptide, drei Stunden nach Hinzufügen des Reagens), war es notwendig mit einer sehr geringen Zelldichte zu starten, um kein Überwachsen der Kultur zu riskieren. Durch das geringe Volumen an eingesetztem Zellmaterial in 96-well-Platten ergaben sich teils hohe Schwankungen in der tatsächlichen Anzahl an Zellen, und es konnte nicht sichergestellt werden, dass das Ergebnis des Tests aussagekräftig ist. Um diese Schwankungen zu minimieren, wurden mehrere Größen an Wells untersucht und schließlich eine 12-well-Platte als die beste Lösung gefunden.

Ein weiterer Punkt, der vor der Durchführung des eigentlichen Tests evaluiert und optimiert werden musste, war die Inkubationszeit mit der Farbstofflösung. Da unterschiedliche Zellen verschiedene metabolische Kapazitäten besitzen, musste zuerst die passende Inkubationszeit gefunden werden. Nachdem das Testsubstrat nicht toxisch war, konnte die Absorption über die Zeit von zwei bis fünf Stunden kontinuierlich beobachtet und im Halbstundentakt vermessen werden. Dabei wurde

festgestellt, dass nach einer Zeit von drei Stunden eine stabile Absorption gemessen werden konnte, die sich auch nach längerer Inkubation nicht mehr veränderte. Somit konnte der Test mit den Peptiden durchgeführt und deren Effekt auf das Wachstum evaluiert werden.

Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse der Proliferationsassays von jeweils drei bzw. vier Peptiden im Vergleich zu NDP-MSH. In Abbildung 44A sind die drei Peptide zu sehen, deren Struktur als potentielle Liganden bereits publiziert wurden, Abbildung 44B zeigt die Peptide mit einer Variation von D- und L-Aminosäuren in Position 2. Die Abbildungen 44C, D und E stellen jeweils die Substanzen mit Modifikationen an Position 1, 3 und 4 des ursprünglichen Liganden dar.

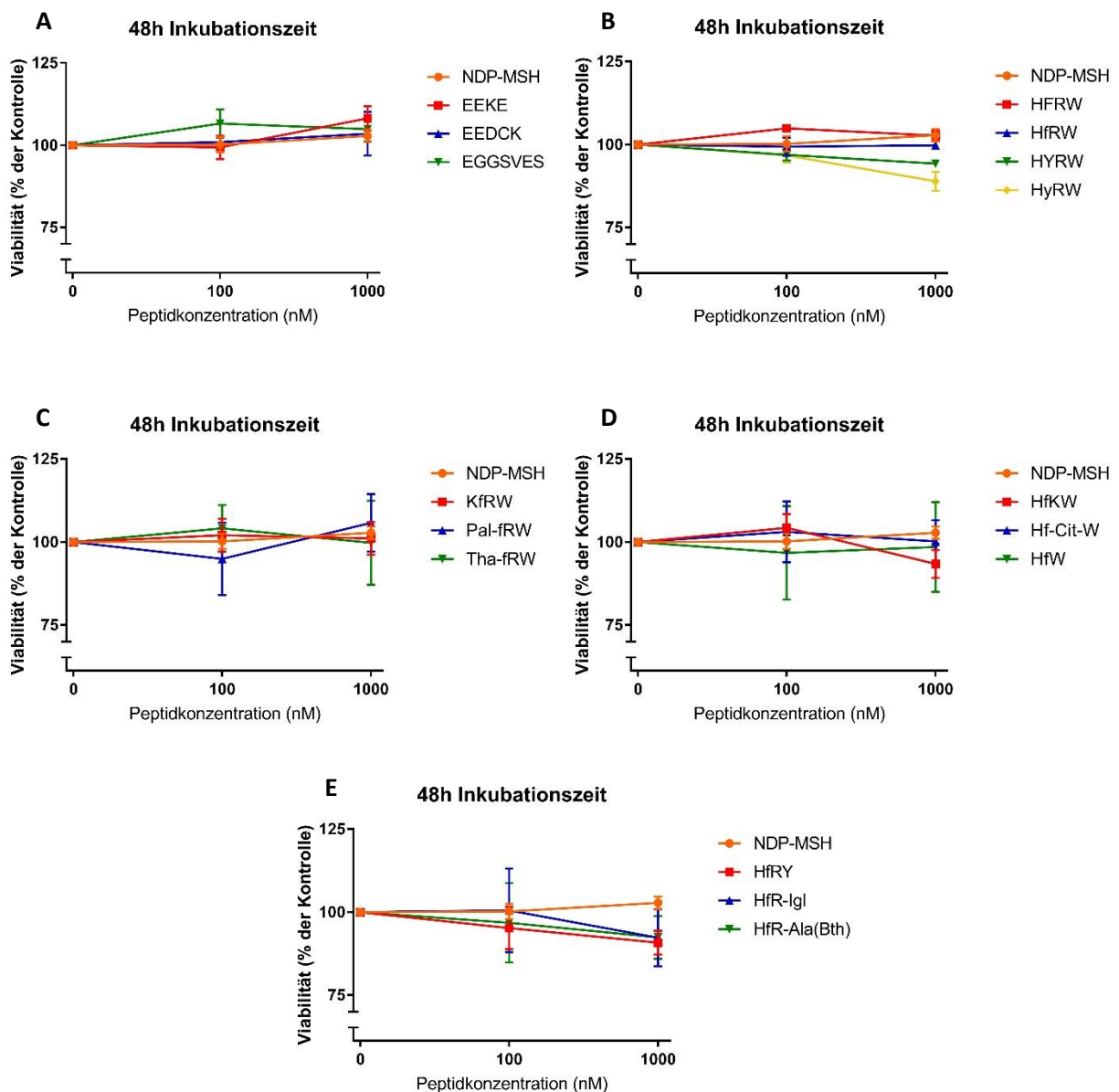


Abb. 44 Vergleich der Proliferation von humanen metastatischen A375 Melanomzellen nach der Inkubation mit 16 verschiedenen, synthetisierten Peptiden und NDP-MSH als Kontrolle über 48 Stunden

Die Melanomzellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen ohne Substanzen inkubiert, anschließend 48 Stunden mit je 100 nM und 1 µM Peptiden, danach wurde das Reagens hinzugefügt, drei Stunden inkubiert und die Absorption bei 450 nm vermessen. Die Werte der Absorptionen wurden durch den Blank-Wert (Absorption von Medium ohne Zellen) korrigiert und in Prozent der Kontrolle (Zellen ohne Peptidinkubation) umgewandelt. Die Punkte repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler (n=4).

In den Abbildungen ist zu sehen, dass die einzelnen Substanzen keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Zellen haben. NDP-MSH selbst zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die Proliferation, wofür es bis zum Erstellen dieser Arbeit auch noch keine Literaturbelege gab.

Da keine wachstumsverändernden Effekte beobachtet wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass die synthetisierten Peptide nicht zytotoxisch agieren. In Anbetracht der Testung an Melanomzellen hätte eine Zytotoxizität auch positive Seiten, jedoch mit dem Ziel einen Agonisten für den MC1-Rezeptor zu finden, wäre dies ein unerwünschter Effekt gewesen. Auf der anderen Seite ist es ebenfalls positiv, dass die Substanzen nicht proliferationsfördernd wirkten, da dieser Effekt auf Krebszellen selbstverständlich ein verheerender Nachteil für etwaige Arzneimittelkandidaten wäre und einem Einsatz als solche grundsätzlich entgegenstünde.

Da die synthetisierten Substanzen eventuell in anderen Einsatzgebieten als hier getestet Anwendung finden könnten, ist es wichtig, die pharmakologischen und toxikologischen Parameter zu erforschen. Ein erster Schritt in diese Richtung stellte daher die Untersuchung der Effekte auf das Zellwachstum dar, welche in weiterer Folge als Basis für eine Einschätzung der Verträglichkeit dienen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden keine toxischen Effekte für die beschriebenen Peptide beobachtet und aus jetziger Sicht steht einer weiteren Testung nichts im Wege.

5.10 Hautstudien

Mit dem Hintergrund dieser Arbeit, Peptide zu entwickeln, die als Melanomprophylaxe eingesetzt werden können, war es auch ein Ziel, zu testen, ob diese Substanzen topisch appliziert werden könnten. Dabei wurde auf zwei etablierte Methoden zurückgegriffen, Tapestripping und Franz-Diffusionszellen. Als Modellpeptid wurde HfRW verwendet, da es eine Aktivität am MC1R aufweist und strukturell eine gute Repräsentation von möglichen weiteren Liganden darstellt.

Da Substanzen, die über die Haut aufgenommen werden sollen, als erstes die Barriere der Hornschicht überwinden müssen, wurden zuerst Tapestripping-Versuche durchgeführt, um abschätzen zu können, ob HfRW überhaupt in die oberste Schicht, das Stratum corneum, eindringen kann. Beim Tapestripping wird auf einer gekennzeichneten Hautstelle eine Formulierung aufgetragen und nach einer definierten Einwirkzeit mit adhäsiven Klebestreifen (Strips) das Stratum corneum schichtweise abgezogen. Durch die Auswertung der Substanzmenge und der Korneozytenmenge auf den einzelnen Strips, kann auf die Eindringtiefe und Menge des Wirkstoffs geschlossen werden.⁸³ Die Zielstrukturen in der Haut, zu der das Peptid im Idealfall vordringen sollte, sind die Melanozyten, die sich in der tiefsten Schicht der Epidermis, dem Stratum basale, befinden. Daher wurden zusätzlich Franz-Zell-Versuche durchgeführt,

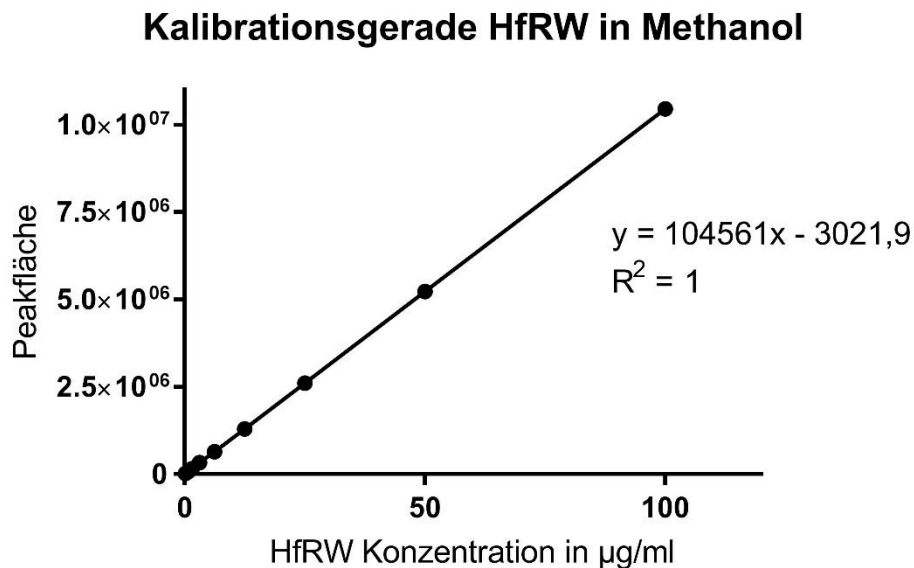
bei denen die Permeation durch die gesamte Epidermis untersucht wird. Hierbei wird ein Stück Haut mit einer fixierten Dicke als Membran verwendet, die ein Donor- und ein Akzeptormedium trennt. Anschließend wird die Diffusion der zu untersuchenden Substanz vom Donor- ins Akzeptormedium gemessen, wodurch auf die Permeationsfähigkeit durch die Epidermis geschlossen werden kann.

5.10.1 Erstellung eines Analysesystems

Die Analytik von HfRW mittels HPLC wurde bereits im Zuge der Synthese und der anschließenden Aufreinigung entwickelt, weshalb nur mehr eine Adaptierung an verschiedene Lösungsmittel notwendig war. Es wurde zuerst eine photometrische Detektion bei 214 nm gewählt, da sich diese bereits bei der Aufreinigung bewährt hat. Die Elution der Strips beim Tapestripping erfolgte in Methanol, bei den Franz-Zellen wurde die Konzentration des Peptids in Phosphat-Puffer bestimmt. Daher wurde zunächst eine Probelösung von 1 mg/ml HfRW in Methanol bzw. Phosphatpuffer hergestellt, um eventuelle Änderungen in der Retentionszeit zu detektieren und das HPLC-System daran anzupassen. Um eine optimale Peakauflösung zu erreichen, wurde für beide Versuchsansätze eine Konzentration von 20 – 27 % Acetonitril bzw. 80 – 73 % Wasser in 10 Minuten gewählt. So konnte der HfRW-Peak bei ca. 6 Minuten detektiert werden, was ideal ist, da der Peak auch bei kleineren Verschiebungen in der Retentionszeit noch immer gut integriert werden konnte.

Um den Gehalt an Peptid in den jeweiligen Strips bzw. Proben der Franz-Zellen bestimmen zu können, wurde eine Kalibrationsgerade mit Konzentrationen von 0,098 µg/ml bis 100 µg/ml hergestellt und vermessen. Für die Aufreinigung der Peptide wurde bis dahin eine photometrische Detektion bei 214 nm verwendet, welche auch für die Kalibration getestet wurde. Es zeichnete sich jedoch sehr schnell ab, dass mit dieser Methode nur Konzentrationen ab ca. 1,5 µg/ml zuverlässig vermessen werden konnten, bei allen niedrigeren Konzentrationen war es nicht möglich, einen eindeutigen Peak auszumachen. Für eine Evaluierung des Eindringens in die Haut müssten jedoch wesentlich geringere Konzentrationen messbar sein, weshalb nach anderen Detektionsmöglichkeiten gesucht wurde. Da HfRW auch einen Tryptophan-Rest beinhaltet, wurde dies genutzt, um das Peptid fluorimetrisch zu quantifizieren. Für die Detektion wurden die Wellenlängen 297 nm (Exzitation) und 344 nm (Emission) für Tryptophan verwendet⁸⁴. Dadurch konnte eine wesentliche Verbesserung im Detektionslimit erzielt werden. Die Peakflächen waren ca. zehn Mal größer als bei der photometrischen Detektion, und es konnte auch noch die höchste Verdünnungsstufe mit 0,098 µg/ml reproduzierbar analysiert werden. Das errechnete Limit of Detection lag bei 0,040 µg/ml, das Limit of Quantification bei 0,052 µg/ml.

Die so erstellte Kalibrationsgerade (Abb. 45) diene nun als Basis für die Quantifizierung des Peptids. Besonders wichtig war es, ein möglichst hohes Bestimmtheitsmaß zu erreichen, um die Gerade sowohl bei hohen als auch bei sehr geringen Konzentrationen verwenden zu können.



*Abb. 45 Kalibrationsgerade für die Bestimmung der Konzentration von HfRW in Methanol durch HPLC-Analyse
Zur Erstellung der Geraden wurden 11 Kalibrationslösungen von HfRW in Methanol mit Konzentrationen von 0,098 µg/ml bis 100 µg/ml hergestellt und mit HPLC vermessen. Die Peaks wurden integriert und die erhaltenen Flächen in Relation zu den bekannten Konzentrationen gesetzt. Abschließend wurde eine Geradengleichung erstellt, die die Berechnung der Konzentration einer unbekannt Probe anhand der Peakfläche ermöglicht.*

Um eine Störung durch etwaige lösliche Proteine aus der Haut auszuschließen, wurde für die Tapestripping-Versuche zusätzlich eine Stelle analysiert, auf die keine Peptidlösung, sondern nur destilliertes Wasser aufgetragen wurde. Die Extraktion wurde analog zu den anderen Proben durchgeführt und mit HPLC analysiert. Es wurden insgesamt 20 Strips abgezogen, extrahiert und analysiert, bei keinem wurde im Chromatogramm ein störender Peak zur Retentionszeit von HfRW detektiert.

5.10.2 Tape Stripping Experimente

Nach der erfolgreichen Etablierung eines Systems zur Quantifizierung des Peptids wurde eine 1 % ige wässrige Lösung von HfRW frisch hergestellt und je 20 µl auf eine Stelle von 4 cm² eines porzinen Ohrs aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde wurde eventuell vorhandene überschüssige Lösung abgetupft. Anschließend wurden versuchsweise zehn Strips abgezogen, extrahiert und analysiert (Methodenbeschreibung siehe Kapitel 4.5). Da auch am letzten Strip noch Peptid in

nachweisbaren Mengen gefunden wurde, konnte die Anzahl an Strips auf 15 erhöht werden. In den nächsten Versuchen wurde sichtbar, dass die Menge an Peptid bis ca. Strip Nr. 12 zuverlässig quantifiziert werden konnte, danach war entweder die Peakfläche im Chromatogramm zu klein oder die Werte begannen stark zu schwanken.

Um nun festzustellen, wie weit HfRW in die Haut eindringen konnte, wurden die Konzentrationen in Relation zu der bestimmten Korneozytenmasse gesetzt. Dafür wurde auf jedem abgezogenen Strip mittels NIR-Densitometrie die Pseudoabsorption gemessen und unter Einbeziehen eines Proportionalitätsfaktors der Proteingehalt berechnet.⁴⁸ Von diesem wurde mithilfe der Proteindichte die Dicke des Stratum corneum in μm berechnet. Zusätzlich wurden an einer Stelle auf jedem Ohr solange Strips abgezogen, bis keine Korneozyten mehr messbar waren, wodurch die Gesamtdicke des Stratum corneum berechnet werden konnte.

Die durchschnittliche Eindringtiefe von HfRW belief sich auf 61,3 % ($\pm 10,2$ %) des Stratum corneum ($n=11$), wodurch eine topische Anwendung möglich erscheint. Da noch keine pharmazeutische Formulierung, sondern nur eine wässrige Lösung verwendet wurde, könnte es sein, dass mit einer optimalen Zubereitung die Hautpenetration noch verbessert werden könnte.

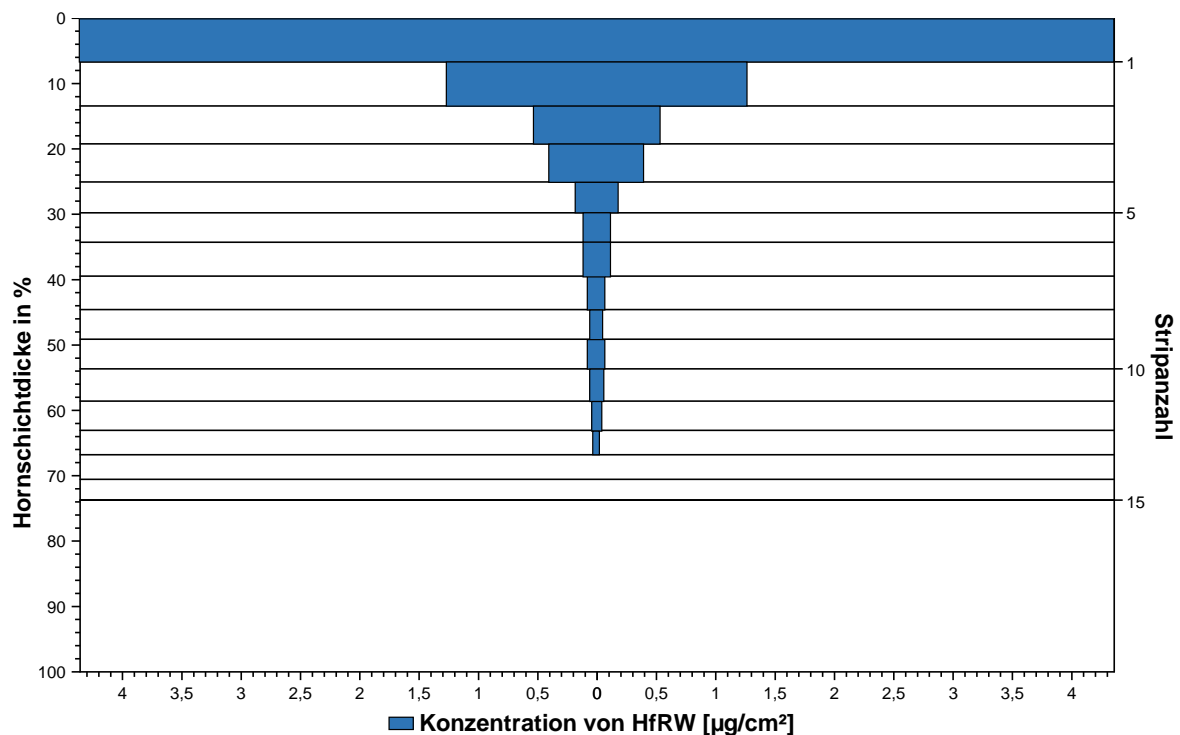


Abb. 46 Hornschichtprofil einer ausgewählten Tapestrippingstelle nach Inkubation mit HfRW

Der Gehalt an Peptid pro Strip wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt und in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Haut umgerechnet. Durch die Bestimmung der Gesamtdicke der Hornschicht an der ausgewählten Stelle kann die Eindringtiefe des Peptids in Prozent angegeben und graphisch dargestellt werden.

Abbildung 46 zeigt das Hornschichtprofil einer repräsentativen Tapestrippingstelle, wobei die Balkenbreite auf der x-Achse die Konzentration an HfRW angibt und die y-Achsen die Eindringtiefe

bzw. die Stripanzahl zeigt, bei der noch Peptid gemessen werden konnte. Da die Dicke des Stratum corneum an unterschiedlichen Hautstellen stark variieren kann, wird die Eindringtiefe in Prozent der Gesamtdicke angegeben.

5.10.3 Franz-Diffusionszellen Experimente

Nachdem mittels Tape Stripping-Versuchen gezeigt werden konnte, dass HfRW in das Stratum corneum penetriert, wurde zusätzlich evaluiert, ob HfRW auch bis in tiefere Hautschichten vordringen kann. Dazu wurde das Franz-Diffusionszellenmodell gewählt, bei dem die Permeation von einem Donor- in ein Akzeptormedium durch eine Modellmembran untersucht wird. Als Donormedium wurde wie beim Tapestripping eine 1 % ige Lösung von HfRW in destilliertem Wasser verwendet, das Akzeptormedium war Phosphatpuffer pH 7,4, um physiologische Bedingungen zu simulieren.

Als Modellmembran wurde porcine Abdominalhaut verwendet, welche bereits hitzebehandelt und enthaart vorliegt. Die Messung der Permeation durch die Membran wurde über 24 Stunden geplant, wobei nach zwei, vier, sechs, acht und 24 Stunden jeweils das gesamte Akzeptormedium entnommen und durch neues ersetzt werden sollte.

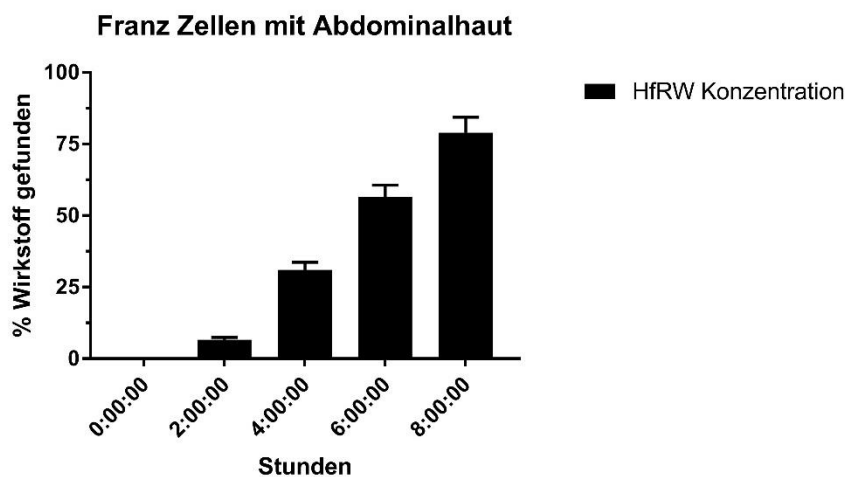


Abb. 47 Zeitabhängige Permeation von HfRW durch porcine Abdominalhaut

In einem Franz-Diffusionszellenmodell wurde die Permeation von HfRW von einem Donor- in ein Akzeptormedium durch porcine Abdominalhaut gemessen. Als Donormedium wurde eine 1 % ige Lösung von HfRW in destilliertem Wasser verwendet, das Akzeptormedium war Phosphatpuffer pH 7,4. Nach zwei, vier, sechs und acht Stunden wurde jeweils das gesamte Akzeptormedium entnommen und mit HPLC analysiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden mithilfe der Kalibrationsgerade in Konzentration HfRW umgerechnet, welche dann in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ umgewandelt wurde. Dies wurde in ein prozentuelles Verhältnis zu der Gesamtmenge an HfRW im Donormedium gesetzt und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=10$).

Abbildung 47 zeigt nun den wiedergefundenen Prozentsatz an Peptid über die Zeit von acht Stunden. Da bereits in dieser Zeit in einigen Zellen bis zu 100 % HfRW in das Akzeptormedium übergegangen ist, wurde auf eine Messung nach 24 Stunden verzichtet. Es ist deutlich zu sehen, dass das Peptid auch schon innerhalb der ersten beiden Stunden eine eindeutig messbare Permeation erreichte. Über den Verlauf von acht Stunden ist eine kontinuierliche Zunahme zu beobachten, wobei durchschnittlich 78,8 % ($\pm 17,1$ %, $n=10$) des eingebrachten Peptids nach acht Stunden im Akzeptormedium gefunden werden konnten.

Diese Werte zeigten eine deutliche Hautpermeation unter den gegebenen Bedingungen, jedoch muss beachtet werden, dass die Barrierefunktion der Haut durch die zuvor stattgefundene Hitzebehandlung und die maschinelle Enthaarung in Mitleidenschaft gezogen werden kann. Deshalb wurde derselbe Versuchsaufbau mit porciner Ohrhaut wiederholt, welche vorab durch keine Behandlung beeinflusst wurde. Die Schichtdicke von 700 μm wurde beibehalten, Haare wurden, wie bei den Tape Stripping Versuchen, mit einer Schere gekürzt. Zusätzlich wurde vor Beginn des Versuchs der Transepidermale Wasserverlust (TEWL) am intakten Ohr gemessen, wodurch eine Hautschädigung erkannt und die Barrierefunktion bewertet werden kann. Nur wenn die Haut intakt war, wurde sie weiter für die Versuche verwendet.

Wie in Abbildung 48 sichtbar ist, konnten nur minimale Mengen von HfRW im Akzeptormedium wiedergefunden werden. Innerhalb der ersten zwei Stunden konnte keine messbare Wirkstoffdiffusion festgestellt werden, ein signifikanter Anstieg wurde erst nach 24 Stunden festgestellt.

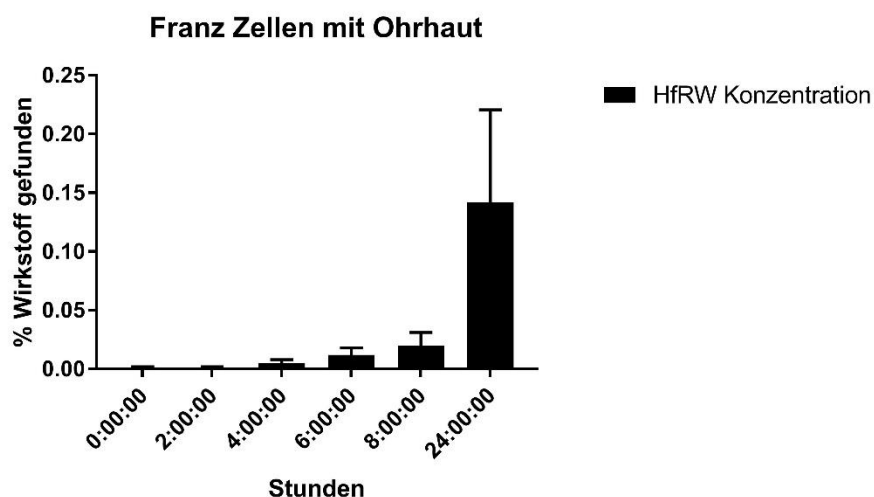


Abb. 48 Zeitabhängige Permeation von HfRW durch porcine Ohrhaut

In einem Franz-Diffusionszellenmodell wurde die Permeation von HfRW von einem Donor- in ein Akzeptormedium durch porcine Ohrhaut gemessen. Als Donormedium wurde eine 1 % ige Lösung von HfRW in destilliertem Wasser verwendet, das Akzeptormedium war Phosphatpuffer pH 7,4. Nach zwei, vier, sechs und acht Stunden wurde jeweils das gesamte Akzeptormedium entnommen und mit HPLC analysiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden mithilfe der Kalibrationsgerade in Konzentration HfRW umgerechnet, welche dann in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ umgewandelt wurde. Dies wurde in ein prozentuelles Verhältnis zu der Gesamtmenge an HfRW im Donormedium gesetzt und graphisch dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler ($n=10$).

Es wurden Konzentrationen von bis zu 0,36 % des Peptids nach der längsten Inkubationszeit (24 Stunden) im Akzeptormedium wiedergefunden, bezogen auf die Konzentration im Donormedium.

Diese großen Unterschiede in der Hautpermeation lassen sich darauf zurückführen, dass die Abdominalhaut, wie bereits erwähnt, zum einen hitzebehandelt und enthaart vorliegt und dadurch Barrierefunktionen verloren gegangen sein können. Zum anderen ist die Beschaffenheit der Haut an verschiedenen Stellen des Körpers sehr unterschiedlich und es kann alleine durch die gewählte Entnahmestelle zu großen Schwankungen in den Eigenschaften kommen.

Zusammenfassend kann jedoch darauf geschlossen werden, dass eine Hautpermeation unter geeigneten Bedingungen durchaus gegeben sein kann und HfRW trotz seiner molekularen Größe das Potential besitzt, erfolgreich topisch appliziert zu werden. Weitere Untersuchungen an magistralen Formulierungen zur Hautgängigkeit sowie zur topischen Verfügbarkeit sind zukünftigen Studien vorbehalten.

6 Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen ganzheitlichen Zugang zur Problemstellung eines wirksamen Agonisten für den Melanocortin-1-Rezeptor zu finden. Dies sollte mit disziplinübergreifenden Methoden durchgeführt werden, wobei sowohl Synthese von potentiellen Liganden, Testung dieser an biologischen Systemen und die Evaluierung einer möglichen Hautpermeation beachtet wurden.

6.1 Synthese von Aminosäurebausteinen

Der erste Ansatz für die Synthese von neuen Liganden am MC1R war die Generierung einer Bibliothek an Aminosäuren und aminosäureähnlichen Bausteinen, die anschließend zu einer Reihe von Oligopeptiden zusammengefügt werden sollten. Ausgehend von einem bereits publizierten Tripeptid¹, das aus einem Histidin-, einem Tyrosin- und einem Phenylpiperidinketonbaustein besteht, wurde versucht Modifikationen dieser Aminosäuren zu synthetisieren. Die Abwandlungen am Histidin und die Synthese des Phenylpiperidinketons erwiesen sich jedoch als deutlich anspruchsvoller als zunächst aufgrund von analogen Reaktionen in der Literatur vermutet. Im Fall des Histidins war sowohl die Hydrophilie des Moleküls als auch die selektive Alkylierung der Ring-Stickstoffe ein Problem. Das Phenylpiperidinketonderivat sollte die Aminosäuren Arginin und Tryptophan der Bindungssequenz His-Phe-Arg-Trp ersetzen. Als Zwischenprodukt wurde ein Weinrebamidderivat gewählt, welches anschließend leicht zu einem Keton umgewandelt werden sollte. Die Weinrebamidsynthese wurde bereits in vielen Publikationen beschrieben und konnte dort oft in einem oder zwei Schritten umgesetzt werden.^{56,57,63} Dies war mit der Phenylpiperidincarbonsäure als Ausgangsprodukt nicht möglich, es konnte kein Produkt isoliert werden (Tab. 6, 7). Auch eine Aktivierung der Carbonsäure durch die vorherige Bildung eines Säurechlorids oder eines Benzotriazolderivats führte nicht zum gewünschten Produkt (Tab. 7, 8). Die Synthese des entsprechenden Weinrebamids konnte erst durch einen dreistufigen Ansatz verwirklicht werden, bei dem N,O-Dimethylhydroxylamin.HCl zuvor mit 1,1-Carbonyldiimidazol aktiviert wurde (Abb. 15, Tab. 8).

Ursache für die schwierige Zugänglichkeit könnten die sterischen Gegebenheiten um die Carbonsäurefunktion sein. Diese befindet sich in α -Position zum Piperidin- und in β -Position zum Phenylring, welche bedingt flexibel bzw. komplett starr in ihrer Konformation sind und räumlich viel Platz einnehmen. Dadurch ergibt sich ein nur eingeschränkter Bereich, in dem die Carbonsäure Platz finden muss, wobei sie dadurch nicht mehr frei drehbar vorliegt, wie es z.B. am Ende einer Aliphatenkette der Fall wäre. Diese sterischen Gegebenheiten führen dazu, dass ein Reaktionspartner

die Gruppe nur mehr von einer bestimmten Seite angreifen kann und die Reaktion an Effizienz verliert bzw. überhaupt nicht mehr stattfinden kann. Das stimmt überein mit den Beobachtungen nach den Syntheserversuchen, da in vielen Fällen kein Produkt in den NMR- und Massenspektren gefunden wurde. Erst durch die Aktivierung des angreifenden Amins konnte die Reaktion durchgeführt werden, wobei zu beachten ist, dass die Reaktionszeit mit 72 Stunden sehr lange war und die Ausbeute nur auf 20 % erhöht werden konnte. Dies genügt für den Labormaßstab, könnte sich jedoch in Hinblick auf eine Produktion in größerem Maßstab und die weitere Verwendung des Moleküls als nicht optimal erweisen.

Grundsätzlich sollte die Strategie der Generierung einer Bibliothek aus Aminosäurebausteinen jedoch weiter verfolgt werden. Mit einem Pool an Molekülen, die zu Oligopeptiden kombiniert werden können, wäre es – ausgehend von einer Grundsequenz – möglich, Reihen dieser Peptide zu synthetisieren, die sich nur in einer Position unterscheiden. In Kombination mit der biologischen Testung stellt dies eine Methode dar, Struktur-Wirkungsbeziehungen der neu gewonnenen Peptide zu charakterisieren.

6.2 Synthese von Oligopeptiden

Die Synthese von Tri- und Tetrapeptiden unter semiautomatischen Bedingungen konnte verlässlich und reproduzierbar durchgeführt werden. Durch die mikrowellenassistierte Durchführung war es möglich, ein Tetrapeptid durchschnittlich innerhalb eines Tages zu synthetisieren, da die Kopplung der Aminosäuren und die Fmoc-Abspaltung innerhalb von 20 – 30 Minuten machbar war. Ein Vorteil der semiautomatischen Synthese im Gegensatz zum vollautomatischen Konzept ist die Möglichkeit der Inprozesskontrolle durch Kaiser-Tests, um die Vollständigkeit der Kopplungen zu verifizieren. Da der Kaiser-Test schnell und kostengünstig ist, sollte er nach jedem Kopplungsschritt durchgeführt werden, um nach einem positiven Ergebnis die zuletzt hinzugefügte Aminosäure einmal oder mehrere weitere Male zuzusetzen. Somit wird die Entstehung von kettenverkürzten Peptiden eingedämmt und die Reinheit des Rohprodukts erhöht. Zusätzlich bietet diese Vorgangsweise einen Kontrollschritt, der besonders bei synthetisch modifizierten Aminosäuren wichtig ist, da zu diesen, im Gegensatz zu den proteinogenen Aminosäuren, meist wenige Daten über das Kopplungsverhalten vorliegen. Die Minimierung von verkürzten Nebenprodukten ist bereits bei Peptiden mit drei bis vier Aminosäureresten von Vorteil und erlangt bei länger-kettigen Molekülen umso mehr Bedeutung.

Für die Auswahl der Aminosäuren in den Tetrapeptiden wurde zunächst nur das Spektrum an proteinogenen Aminosäuren verwendet, um in Hinblick auf die mögliche Anwendung als Arzneistoff

eine einfache und kostengünstige Synthese zu entwickeln. Im Spektrum dieser Aminosäuren befinden sich jedoch nur drei mit basischen und drei mit aromatischen Seitenketten, wodurch nur zwei Optionen als Ersatz für die zu verändernden Positionen (Histidin, Arginin und Tryptophan) herangezogen werden konnten. Anhand der chemischen Eigenschaften der Seitenketten wurde die jeweils ähnlichere Aminosäure als Ersatz ausgewählt. Lysin ersetzte Histidin bzw. Arginin und Tyrosin war die Alternative für Tryptophan (Strukturen siehe Abb. 34).

Da die Bandbreite an natürlich vorkommenden Aminosäuren begrenzt war, wurden hier veränderte, synthetisch generierte Bausteine verwendet. Hierbei wurde jedoch eine mögliche Synthese in großem Maßstab bedacht und daher nach kommerziell erhältlichen Elementen gesucht. Obwohl das Angebot diesbezüglich bereits sehr groß ist, sind durchaus beträchtliche Unterschiede in den Kosten zu beobachten, welche ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden sollten. Als Ersatz für Histidin wurden 2-Thienylalanin und 4-Pyridylalanin ausgewählt, Arginin wurde durch Citrullin und Norarginin ersetzt und Tryptophan durch Indanylglycin und Benzothiazolalanin (Abb. 40 – 42). Die Synthesen der Peptide konnten bis auf eine Ausnahme erfolgreich durchgeführt werden, das Tetrapeptid mit Norarginin an Position 3 war selbst nach mehrmaligen Kopplungen dieser Aminosäure nicht zugänglich.

Grundsätzlich wurde eine ähnliche Strategie wie im vorherigen Kapitel beschrieben angewandt und immer nur eine Position der Bindungssequenz His-Phe-Arg-Trp verändert. Dadurch konnte aufgrund der Ergebnisse der biologischen Testungen auf die Struktur-Wirkungsbeziehungen geschlossen werden.

Zur Bestimmung der Elemente, die verändert werden können, wurden *in silico*-Methoden angewandt. Wie bereits in Kapitel 5.7 erwähnt, ist derzeit keine Kristallstruktur des MC1R verfügbar, weshalb ligandenbasierte Modelle verwendet wurden. Als Ausgangspunkt wurde nach allen bereits publizierten Liganden am MC1R gesucht, diese nach Aktivität, Molekulargewicht und getestetem Organismus gefiltert und anschließend anhand ihrer chemischen Eigenschaften in Ähnlichkeitsgruppen, sogenannten Clustern, zusammengefasst. Die Pharmakophore, die aus jedem der neun Cluster berechnet wurden, gaben nun an, welche Teilstrukturen den Liganden gemeinsam waren. Anschließend wurden die Pharmakophore räumlich mit dem Tetrapeptid HFRW auf gemeinsame chemische Features getestet, die so auf potentielle Wechselwirkungen mit dem Zielrezeptor hinweisen können. Die Analyse dieser Alignments machte nun deutlich, an welchen Positionen das Molekül HFRW verändert werden kann, ohne mit einem totalen Wirkungsverlust rechnen zu müssen. Dies war für die weitere Synthese wichtig, da die nachfolgenden Modifikationen der Basisaminosäuren nicht alleine aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit entschieden werden sollten, sondern auch anhand von Berechnungen, welche die Struktur-Wirkungsbeziehungen beachten.

Für die weitere Forschung am MC1R wäre es eine interessante Möglichkeit, ein Homology-Modell des Rezeptors zu berechnen, um die Interaktion zwischen Liganden und der Bindungstasche genauer untersuchen zu können. In einer bereits erwähnten Publikation wurde ein 3D-Modell des MC1R erstellt, allerdings wurde als Vorlage dafür nur eine Simulation des MC4R verwendet.⁶⁷ Die in dieser Publikation vorgeschlagenen Liganden konnten in der biologischen Testung keine Aktivierung des Rezeptors hervorrufen, weshalb vermutet werden kann, dass das Modell nicht valide ist. Durch die Verwendung eines Rezeptors, dessen Kristallstruktur bekannt ist, als Vorlage, wäre eine Verbesserung dieses Ansatzes möglich. Mithilfe der zunehmenden Zahl an bekannten Kristallstrukturen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann das Protein mit der größten Ähnlichkeit zum MC1R ausgewählt und anhand dessen ein neues Modell generiert werden. Dies erfordert jedoch umfassende Kenntnisse im Bereich des Homology-Modellings und sollte daher darauf spezialisierten Arbeitsgruppen vorbehalten sein.

6.3 Biologische Testungen

Ein Anspruch dieser Arbeit war es, nicht nur potentielle Liganden zu synthetisieren, sondern sie auch auf ihre Aktivität zu testen. Es wurden alle 16 Peptide einer solchen Prüfung unterzogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein System verwendet wird, das humanen Ursprung hat, im Gegensatz zu oft gebrauchten murinen Modellen. Am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Universität Wien standen für diese Versuche fünf Melanomzelllinien aus verschiedenen Krebsstadien zur Verfügung.

Um die passende Zelllinie für weitere Versuche auszuwählen, wurde mittels PCR auf das Vorhandensein der Melanocortinrezeptoren getestet. Die Auswertung der PCR zeigte in jeder der getesteten Zelllinien alle fünf Rezeptoren, allerdings in unterschiedlichen Intensitäten. Da der MC1R das Target der synthetisierten Substanzen ist, wurden aufgrund seines circa doppelt so hohen Vorkommens in A375 Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien, diese für die weiteren Versuche ausgewählt (Abb. 20). Interessant ist auch das Vorkommen der anderen vier Melanocortinrezeptoren, die ebenfalls in allen Zelllinien nachgewiesen werden konnten (Abb. 21 – 24). Im gesunden menschlichen Körper ist nur der MC1R in der Haut vorhanden, die weiteren Rezeptoren sind im gesamten Organismus verteilt vom Hypothalamus bis zur Nebenniere zu finden.²⁶ Dabei ist es auffällig, dass die unterschiedlichen Melanomzellen die genetischen Informationen aller Melanocortinrezeptoren aufweisen. Eine genaue Untersuchung dieser Ergebnisse z.B. mithilfe von Westernblots könnte Aufschluss darüber geben, welche Rezeptoren tatsächlich in diesen Melanomzellen exprimiert werden. Diese Erkenntnisse könnten mehr Einblick in die Regulation

und Funktion von Melanomen geben und damit zur Erforschung und Behandlung dieser aggressiven Krebsart beitragen.

Die Effekte der Peptide auf den MC1R wurden mittels Bestimmung der cAMP-Konzentration in den Zellen untersucht. Als Test des Systems wurden die Melanomzellen mit NDP-MSH stimuliert um festzustellen, ob ein bekannter Agonist eine messbare Erhöhung der cAMP-Konzentration hervorruft. Dies konnte nach einer Vorstimulation mit Forskolin reproduzierbar gemessen werden, ebenso wie ein konzentrationsabhängiger Anstieg des stimulierenden Effekts.

Die synthetisierten Peptide konnten, bis auf HfRW, keine signifikante Änderung der cAMP-Produktion erwirken (Abb. 29, 32, 35, 43). Bei den ersten drei Peptiden (EEKE, EEDCK und EGGSVES, Abb. 29) war dieses Ergebnis zu erwarten, da die Aminosäuresequenzen drastisch von HFRW als Vorlage abwichen. Wie bereits im vorigen Kapitel erwähnt, ist zu bezweifeln, dass das Homology-Modell der Publikation, die diese Peptide als Liganden vorschlägt, valide ist, da es auf einer ebenfalls rein berechneten dreidimensionalen Struktur aufbaut.

Die Änderungen an Position 2 des Peptids zeigten, dass HfRW (Phenylalanin in D-Konfiguration) einen statistisch signifikanten, stimulierenden Effekt auf MC1R hat. Im Gegensatz dazu konnten die Peptide HFRW (all-L-Konfiguration) bzw. HYRW und HyRW (Tyrosin in L- oder D-Konfiguration) kein signifikant unterschiedliches Ergebnis zu Forskolin allein hervorrufen. Tyrosin wurde auch deswegen als Ersatz für Phenylalanin gewählt, weil es in der Publikation von Herpin et al.¹ ebenfalls an Position 2 verwendet wird. Dort wird jedoch ein O-methyliertes Derivat eingesetzt, welches wiederum andere chemische Eigenschaften als Tyrosin selbst besitzt. Durch die endständige Methylgruppe hat das Peptid an dieser Stelle keinen Wasserstoffbrückendonator mehr, der beispielsweise einer hydrophoben Wechselwirkung mit dem Rezeptor entgegenstehen könnte. Diese Interaktion wäre auch mit dem Phenylring des Phenylalanins möglich, was den Wirkungsverlust der Peptide HYRW und HyRW erklären könnte.

In Kapitel 5.6 wird bereits auf die fehlende stimulatorische Wirkung der Peptide KfRW, HfKW und HfRY eingegangen (Abb. 35), wie auch im Fall von HYRW und HyRW kann die Änderung der chemischen Eigenschaften der Peptide im Vergleich zur Vorlage zu einem Wirkungsverlust führen. Da ein Ligand räumlich perfekt in die Bindungstasche des Rezeptors passen muss, um die gewünschte Wirkung hervorzurufen, können auch ähnliche Moleküle völlig unterschiedliche Effekte erzielen. Im Fall der oben erwähnten Peptide waren die strukturellen Änderungen vermutlich zu groß und hatten daher einen Verlust der Aktivität am Rezeptor zur Folge.

Da die Ergebnisse der Testungen der zuvor erwähnten Peptide negativ ausfielen, wurden synthetisch abgewandelte Aminosäuren in die Peptide inkorporiert, um grundlegende chemische Eigenschaften bewahren zu können und trotzdem eine Variation der Seitenketten zu erzielen. Die Peptide Pal-fRW,

Tha-fRW, Hf-Cit-W, HfW, HfR-Igl und HfR-Ala(Bth) zeigten keinen signifikanten Anstieg der cAMP-Produktion, bei HfW und HfR-Ala(Bth) konnte jedoch ein solcher Trend nachgewiesen werden (Abb. 43). Daher sollten diese beiden Peptide als Ausgangspunkt für die weitere Suche nach Liganden am MC1R verwendet werden.

Für zukünftige Testungen könnte auch das biologische System reevaluiert und beispielsweise eine andere Zelllinie verwendet werden. Eine Möglichkeit dabei wäre die Verwendung von HEK-Zellen, in denen der MC1R überexprimiert wurde. Dies kann durch die Einführung eines Vektors in das Genom der Zellen durchgeführt werden, wodurch nach der Selektierung der transfizierten Klone eine Population mit sehr hoher MC1R-Konzentration ausgewählt werden kann. Dies hat den Vorteil, dass ein sensibles System entsteht, das selbst auf geringe Mengen von Liganden reagiert und Effekte sichtbar machen kann, die unter anderen Umständen vielleicht nicht messbar wären. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist rein praktischer Natur, nämlich der erhöhte Aufwand, die Zellen zu transfizieren und danach erst für Experimente verwenden zu können. Aus pharmakologischer Sicht repräsentieren diese Zellen mit einer Überexpression keine natürlich vorkommenden Bedingungen mehr, ihr biologischer Ursprung wäre in diesem Fall auch ein völlig anderer (embryonale Niere im Gegensatz zu entarteten Melanozyten eines Erwachsenen). Auch von immortalisierten Melanomzelllinien kann nicht direkt auf den zellulären Ablauf in einem Melanom geschlossen werden, zudem birgt jede zusätzliche Veränderung des Systems die Gefahr, das fragile Gleichgewicht im Inneren der Zellen zu stören. Es sollte daher weiterhin darauf geachtet werden, dass ein biologisches System von humanem Ursprung in der Haut verwendet wird.

6.4 Hautpenetration und –permeation von HfRW

Ein wichtiger Punkt bei der Evaluierung von potentiellen Agonisten am MC1R war die Frage, ob diese die Haut penetrieren bzw. durch sie permeieren können. Da ein Agonist als Prophylaxe für Melanome Anwendung finden soll, ist ein wesentlicher Aspekt, die Verfügbarkeit für Patienten mit einzubeziehen. Gerade bei prophylaktischen Maßnahmen sollte eine einfache und leicht zugängliche Arzneiform angestrebt werden, um die Compliance bei der Verwendung möglichst hoch zu halten. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit zu evaluieren, ob die synthetisierten Oligopeptide für eine topische Anwendung infrage kommen, wodurch eine einfache Anwendung für den Patienten in Form von halbfesten Zubereitungen in Betracht käme.

Die Zielstrukturen, zu denen Agonisten am MC1R vordringen müssen um ihre Wirkung zu entfalten, sind Melanozyten, welche sich im Stratum basale befinden, der innersten Schicht der Epidermis.⁶

Damit ein Arzneistoff in tiefere Hautschichten gelangen kann, muss er gewisse Voraussetzungen aufweisen. Wichtige Merkmale dabei sind, dass das Molekül sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzt und im Idealfall ein Molekulargewicht von weniger als 500 Dalton aufweist.⁴²

Die erste Barriere, die ein Arzneistoff in der Haut überwinden muss, ist das Stratum corneum, welches durch seine Struktur aus Korneozyten und Lipiden einen lipophilen Charakter hat.³ Daher sollten Moleküle einen gewissen Anteil an lipophilen Strukturelementen besitzen, um diese Hürde zu nehmen. Im Fall des Peptids HfRW ist dies durch die beiden Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan gegeben, welche beide aromatische Seitenketten besitzen. Die beiden anderen Aminosäuren, Histidin und Arginin sind durch ihren basischen Charakter hydrophil und können so in tieferen Hautschichten penetrationsfördernd wirken. Das Molekulargewicht von HfRW liegt mit 644,73 g/mol über dem empfohlenen Wert von 500, wobei dieser als Richtlinie allerdings auch überschritten werden kann.

Um eine erste Abschätzung treffen zu können, ob das Peptid überhaupt in die Haut einzudringen vermag, wurden Tape Stripping-Versuche an porziner Ohrhaut durchgeführt. Es wurde dabei eine wässrige Lösung des Peptids (1 %) aufgetragen und nach einer Stunde Einwirkzeit das Stratum corneum mit Klebestreifen schichtweise abgezogen. Durchschnittlich konnte eine Eindringtiefe von HfRW von 61,3 % (\pm 10,2 %) der Dicke des Stratum corneum (n=11) gemessen werden, das Hornschichtprofil einer ausgewählten Stelle ist in Abbildung 46 dargestellt. Dieses Ergebnis lässt eine topische Anwendung möglich erscheinen und bietet eine Basis für weitere Experimente an der Haut.

Nachdem bei Tape Stripping-Versuchen eine Penetration der Haut beobachtet werden konnte, wurde in weiterer Folge die Hautpermeation untersucht. Dies erfolgte mittels Franz-Diffusionszellen, wobei wiederum eine 1 % ige wässrige Lösung des Peptids als Donormedium verwendet wurde. Als Membranen wurde sowohl porzine Abdominal- als auch Ohrhaut verwendet. Das Akzeptormedium bestand aus Phosphatpuffer pH 7,4, um physiologische Bedingungen zu simulieren. Die ersten Versuche mit Abdominalhaut zeigten eine durchschnittliche Permeation von 78,8 % des Peptids über 8 Stunden (Abb. 47) vom Donor- in das Akzeptormedium.

Da die Abdominalhaut hitzebehandelt vorlag und einer maschinellen Enthaarung unterzogen wurde, muss beachtet werden, dass die Barrierefunktion der Haut möglicherweise nicht mehr intakt ist. Um diese Resultate auch mit unverletzter Haut zu überprüfen, wurde derselbe Versuchsaufbau mit porziner Ohrhaut wiederholt, die keinerlei vorherige Behandlung erfahren hatte. Diese Versuche mit Ohrhaut zeigten eine deutlich geringere Konzentration an Peptid im Akzeptormedium (bis zu 0,36 %) nach 24 Stunden Inkubationszeit (Abb. 48).

Wie bereits in Kapitel 5.10.3 erwähnt, sind diese Unterschiede in der Permeation unter anderem auf die unterschiedlichen Hautstellen und ihre Beschaffenheit zurückzuführen. Dennoch ist die gemessene

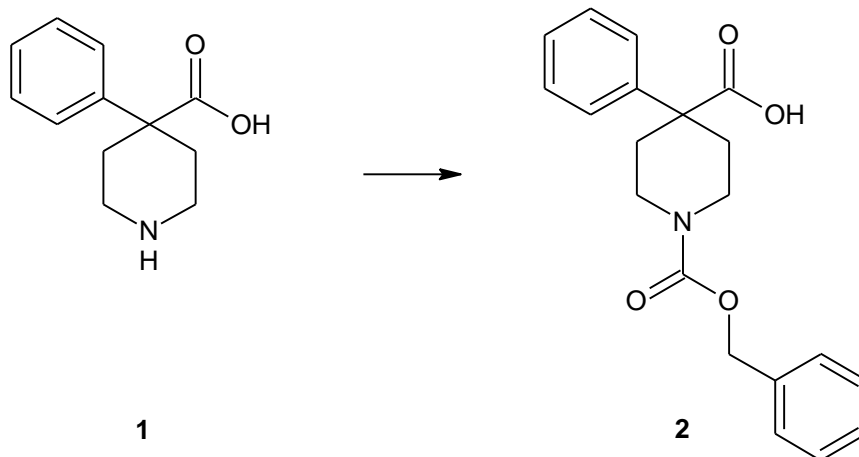
Peptidmenge im Akzeptormedium bei beiden Versuchsansätzen ein Indikator für eine mögliche Hautpermeation unter geeigneten Bedingungen.

Zu beachten ist auch die hier verwendete Darreichungsform einer wässrigen Lösung, die nur einer ersten Evaluierung diene. Für zukünftige Studien wäre es daher interessant, unterschiedliche topische Formulierungen auszuarbeiten. Dafür stehen verschiedene Trägersysteme wie etwa Mikroemulsionen oder liposomale Zubereitungen zur Verfügung, die die Hautpenetration des Peptids unterstützen könnten. Auch Penetrationsförderer wie z.B. Ethanol oder Propylenglykol könnten zum Einsatz kommen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Organische Synthese

7.1.1 1-Benzyloxycarbonyl-4-Phenylpiperidin-4-carbonsäure



Kaliumhydroxid (1,12 g, 20 mmol) wurde in 20 ml Methanol gelöst, 4-Phenyl-4-Piperidincarbonsäure-Tosylat (**1**, 7,5 g, 20 mmol) wurde in 100 ml MeOH suspendiert und beide Lösungen zusammengeführt. Durch kräftiges Umschwenken wurden alle festen Bestandteile gelöst. Nach Zugabe von Kaliumcarbonat (5,52 g, 40 mmol) wurde mit Methanol auf 200 ml ergänzt. Anschließend wurde unter Eiskühlung Chlorameisensäurebenzylester (4,44 g, 26 mmol) zugetropft und die Reaktionsmischung 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufreinigung wurde die Lösung einrotiert, der Rückstand in 300 ml Wasser aufgenommen und mit 2 N Salzsäure vorsichtig auf pH 5 gebracht. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 200 ml Dichlormethan extrahiert, nochmals mit ein wenig Salzsäure angesäuert und ein drittes Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Produkt ergab ein weißliches Öl, das rasch zu kristallisieren begann und nach Umkristallisation mit Methanol weiße Nadeln ergab.

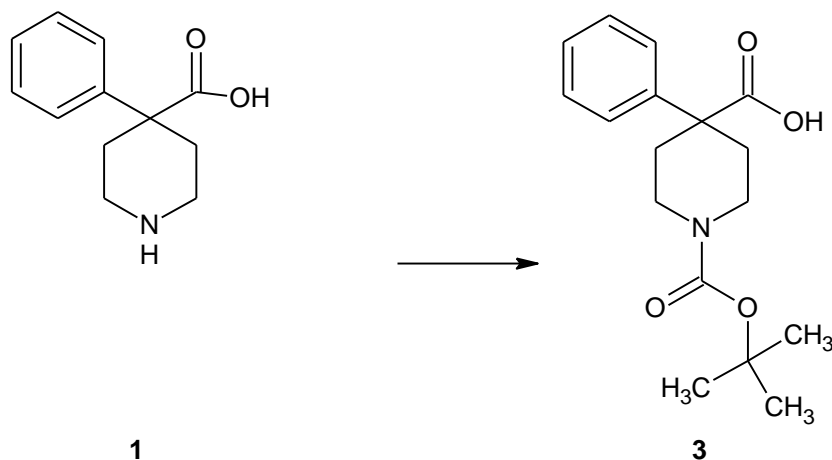
Ausbeute: 6,52 g (96 %)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.90 (t, 2H), 2.56 (d, 2H), 3.18 (t, 2H), 4.04 (d, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.24-7.49 (m, 10H)

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 179.83, 155.74, 141.54, 137.08, 129.23, 128.91, 128.44, 128.28, 128.05, 126.34, 67.61, 49.42, 42.03

Masse (m/z): [M+K]⁺ = 378.20 (67 %)

7.1.2 1-(Tert-butoxycarbonyl)-4-Phenylpiperidin-4-carbonsäure



Zu einer Suspension von 4-Phenyl-4-Piperidincarbonsäure-Tosylat (**1**, 7,55 g, 20 mmol) und Triethylamin (6,07 g, 60 mmol) in 110 ml Tetrahydrofuran wurde Di-tert-butyldicarbonat (4,80 g, 22 mmol) hinzugefügt. Die Reaktion wurde langsam zum Rückfluss erhitzt und eine Stunde gekocht. Währenddessen kam es zu Gasentwicklung und die Reaktion wurde eine klare Lösung. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Aufreinigung wurde zuerst das Lösungsmittel abrotiert und der Rückstand in einer 1:1 Mischung von Wasser und Diethylether aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit 10 ml 10 N Natronlauge stark basisch gemacht und zwei Mal mit Diethylether gewaschen. Die gesammelten organischen Phasen wurden verworfen und die wässrige Phase wurde mit Essigsäure versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und zunächst an der Luft, anschließend unter Hochvakuum getrocknet. Das Produkt ergab einen kristallinen, weißen Feststoff.

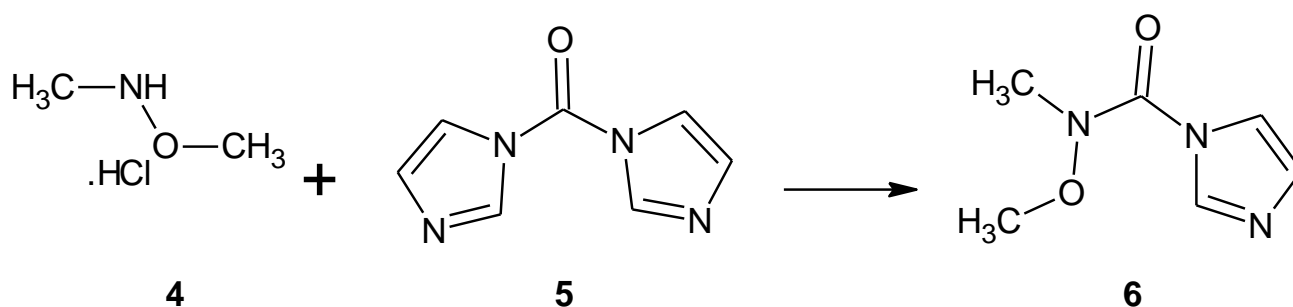
Ausbeute: 5,70 g (93 %)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.45 (s, 9H), 1.87 (t, 2H), 2.50 (d, 2H), 3.09 (t, 2H), 3.93 (d, 2H), 7.26-7.40 (m, 5H)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 199.36, 179.18, 154.88, 141.65, 128.71, 127.43, 125.94, 79.69, 49.18, 33.39, 28.44

Masse (m/z): [M+Tosylat]⁺ = 477.07 (74 %)

7.1.3 N-Methoxy-N-Methyl-1H-Imidazol-1-carboxamid



Zu einer gekühlten Lösung von 1,1'-Carbonyldiimidazol (**5**, 8,92 g, 55 mmol) in 60 ml Dichlormethan wurde N,O-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid (**4**, 4,88 g, 50 mmol) portionsweise hinzugefügt. Sobald sich die Feststoffe gelöst hatten, wurde die Kühlung entfernt. Anschließend wurde Triethylamin (5,06 g, 50 mmol) hinzugefügt und die Mischung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufreinigung wurden 20 ml Dichlormethan hinzugefügt und mit 80 ml Wasser gequenchet. Die wässrige Phase wurde vier Mal mit 80 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Produkt ergab ein gelbes, dünnflüssiges Öl.

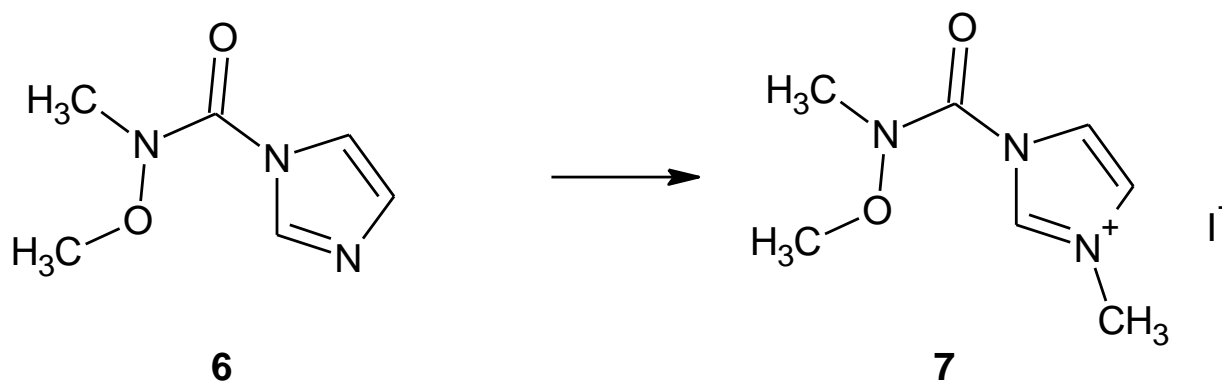
Ausbeute: 7,72 g (100 %)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.40 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 7.07 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 8.27 (s, 1H)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 149.04, 129.34, 121.80, 118.74, 61.34, 34.59

Masse (m/z): [M+H]⁺ = 156.07 (100 %)

7.1.4 1-[Methoxy-(Methyl)carbamoyl]-3-Methyl-1H-Imidazol-3-iumiodid



Zu einer Lösung des Carbamoylimidazols (**6**, 6,21 g, 40 mmol) in 75 ml Acetonitril wird Methyljodid (25,94 g, 160 mmol) hinzugefügt. Die Mischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach Beenden der Reaktion wurden das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile abrotiert. Da das Produkt sofort weiterverarbeitet wurde, war keine zusätzliche Aufreinigung erforderlich. Das Produkt ergab ein oranges, zähflüssiges Öl.

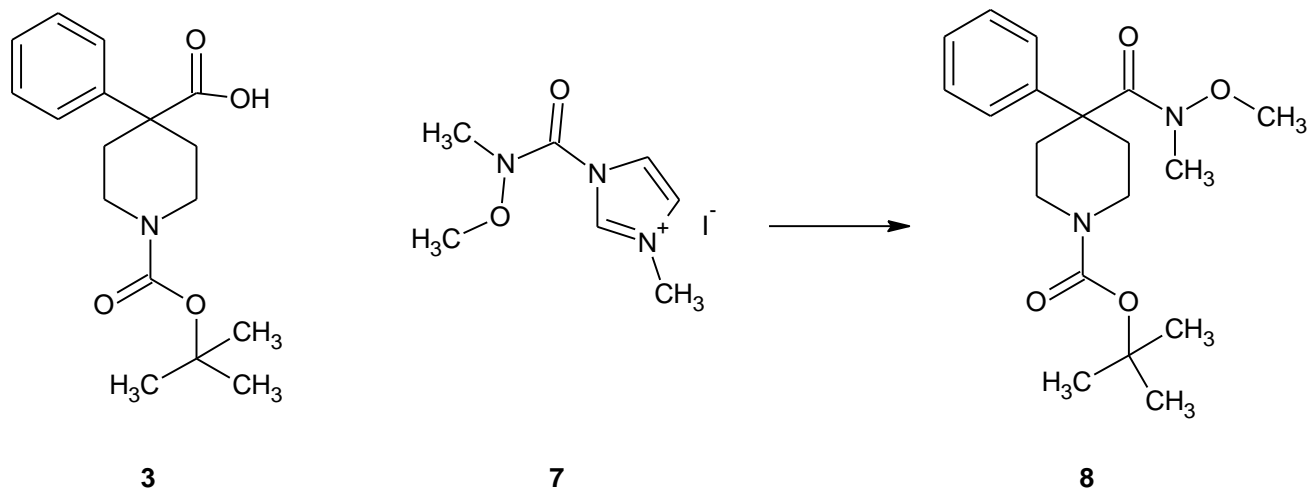
Ausbeute: 6,53 g (96 %)

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3.50 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 4.36 (s, 3H), 7.07 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 8.27 (s, 1H)

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 138.38, 123.80, 121.55, 63.86, 38.76, 35.20

Masse (m/z): $[M]^+ = 170.00$ (100 %)

7.1.5 1-(Tert-butoxycarbonyl)-4-[Methoxy(Methyl)carbamoyl]-4-Phenyl-Piperidinsäureamid



Das Carbamoylimidazoliumsalz (**7**, 1,70 g, 10 mmol) wurde in 60 ml Acetonitril suspendiert. Anschließend wurden 1-(Tert-butoxycarbonyl)-4-Phenylpiperidin-4-carbonsäure (**3**, 3,05 g, 10 mmol) und Triethylamin (1,01 g, 10 mmol) hinzugefügt. Die Mischung wurde über 72 Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach Beenden der Reaktion wurde Acetonitril abrotiert und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Zur organischen Phase wurden 60 ml 0,2 N Salzsäure hinzugefügt, extrahiert und getrennt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit 60 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und die organischen Phasen vereinigt. Abschließend wurde mit 60 ml 0,2 N Salzsäure, 120 ml 0,5 M Kaliumcarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das erhaltene gelbe Öl wurde danach säulenchromatographisch an Kieselgel 60 mit Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 7:3 aufgetrennt. Das Produkt ergab einen weißen Feststoff.

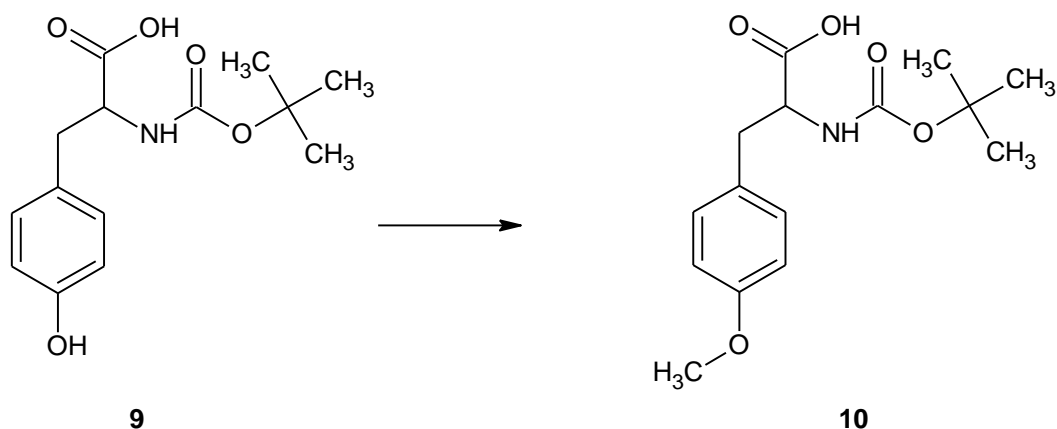
Ausbeute: 0,68 g (20 %)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.45 (s, 9H), 1.90 (t, 2H), 2.53 (d, 2H), 2.66 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 3.29 (t, 2H), 3.85 (d, 2H), 7.13-7.53 (m, 5H)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 143.74, 128.52, 126.64, 126.01, 79.33, 59.19, 49.09, 42.80, 38.11, 33.21, 28.47

Masse (m/z): [M+Na]⁺ = 371.07 (38 %)

7.1.6 O-Methyl-Boc-Tyrosin



Boc-Tyrosin (**9**, 1,41 g, 5 mmol) wurde in 4 M Natronlauge gelöst und über 15 Minuten langsam mit Dimethylsulfat (1,70 g, 13,5 mmol) versetzt. Die Temperatur wurde mithilfe eines Eisbades bei ca. 20-30 °C gehalten. Anschließend wurde die Reaktion für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde danach mit 1 M Salzsäure versetzt und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das entstandene Produkt war ein farbloses Öl.

Ausbeute: 1,43 g (97 %)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.52 (s, 9H), 3.19 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.68 (d, 1H), 6.97 (d, 2H), 7.22 (d, 2H)

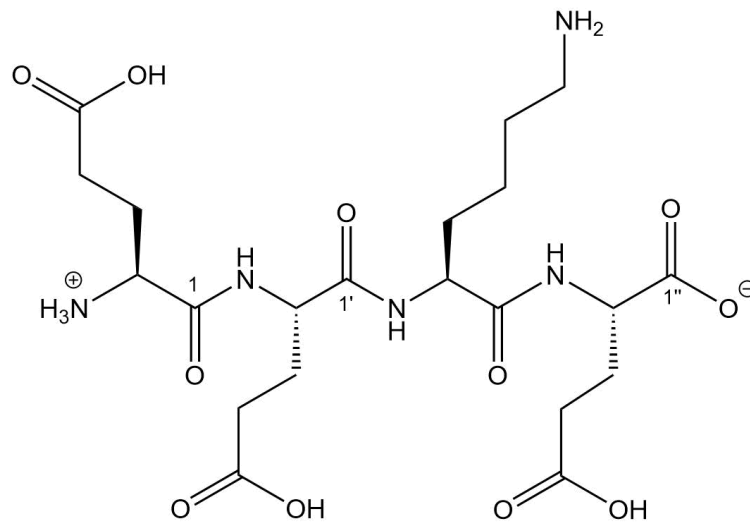
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 176.44, 159.12, 155.85, 130.80, 114.47, 55.66, 37.29, 28.69

Masse (m/z): [M+Na]⁺ = 318.13 (100 %)

7.2 Peptidsynthese

Die allgemeine Vorschrift zur Synthese der Peptide ist unter Kapitel 4.1 nachzulesen. Bei den einzelnen Verbindungen werden nachfolgend die verwendeten Aminosäuren mit deren Schutzgruppen und der Cleavage Cocktail angegeben, allgemeine Reagenzien und Geräte wurden bereits in Kapitel 3.1 erwähnt. Für die Aufreinigung wurde eine jeweils individuell ausgearbeitete HPLC-Methode verwendet, das Gradientenprofil ist bei jedem Peptid vermerkt. Alle Aufreinigungen wurden an der präparativen HPLC P1 mit der Säule Zorbax® 5 µm SB-C18, 21,2 mmx25 cm (Agilent Technologies) durchgeführt. Die Proben für die massenspektrometrische Analyse wurden am hochauflösenden Gerät maXis HD ESI-Qq-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics) vermessen, die NMR-Spektroskopie wurde am Avance Ultrashield 500 Spektrometer (500 MHz) mit TCI Prodigy Kryo Probenkopf, 5 mm, Tripelresonanz-Invers-Detektion Probenkopf (beides Bruker BioSpin Corp.) durchgeführt.

7.2.1 Glu-Glu-Lys-Glu (EEKE)



Spezifikationen der Synthese

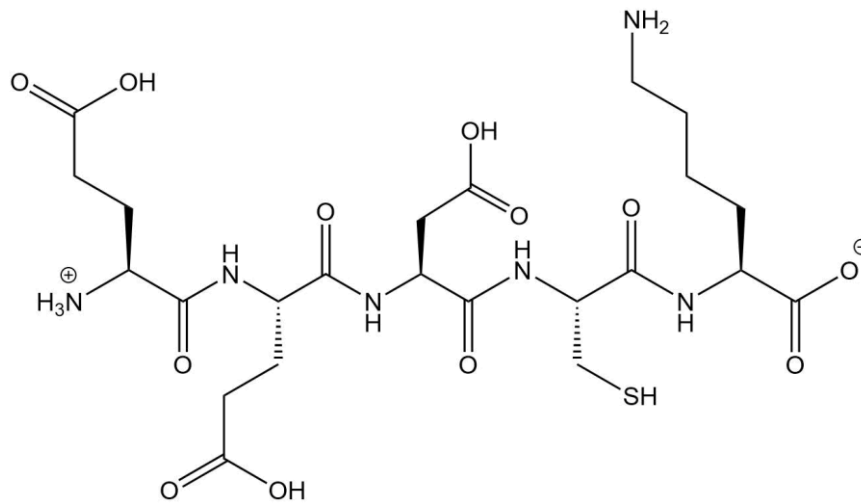
| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-L-Glutaminsäure-tert-butylester ○ Fmoc-L-Lysin-tert-butylester |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 95 % ○ Wasser 5 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 97 – 90 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 3 – 10 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 95,6 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 22,9 mg (35,4 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 534,2406 ○ [M+H]⁺ gefunden: 534,2412 |
| | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im ¹³C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im ¹H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| EEKE in D ₂ O | | ^1H | ^{13}C |
|-----------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| Glu-5'' | C | -- | 177,87 |
| Glu-5' | C | -- | 177,71 |
| Glu-5 | C | -- | 177,08 |
| Glu-1'' | C | -- | 176,15 |
| Lys-1 | C | -- | 173,96 |
| Glu-1' | C | -- | 173,13 |
| Glu-1 | C | -- | 169,87 |
| Glu-2 | CH | 4,21 | 54,28 |
| Glu-2' | CH | 4,32 | 53,57 |
| Glu-2'' | CH | 4,29 | 53,17 |
| Lys-2 | CH | 4,00 | 52,77 |
| Lys-6 | CH ₂ | 2,89 | 39,78 |
| Lys-2 | CH ₂ | 1,73/1,68 | 30,97 |
| Glu-4'' | CH ₂ | 2,37 | 30,68 |
| Glu-4' | CH ₂ | 2,37 | 30,50 |
| Glu-4 | CH ₂ | 2,42 | 29,90 |
| Glu-3' | CH ₂ | 2,00/1,91 | 26,90 |
| Lys-5 | CH ₂ | 1,58 | 26,90 |
| Glu-3 | CH ₂ | 2,06 | 26,62 |
| Glu-3'' | CH ₂ | 2,06/1,87 | 26,62 |
| Lys-4 | CH ₂ | 1,35 | 22,53 |

alle Angaben in ppm

7.2.2 Glu-Glu-Asp-Cys-Lys (EEDCK)



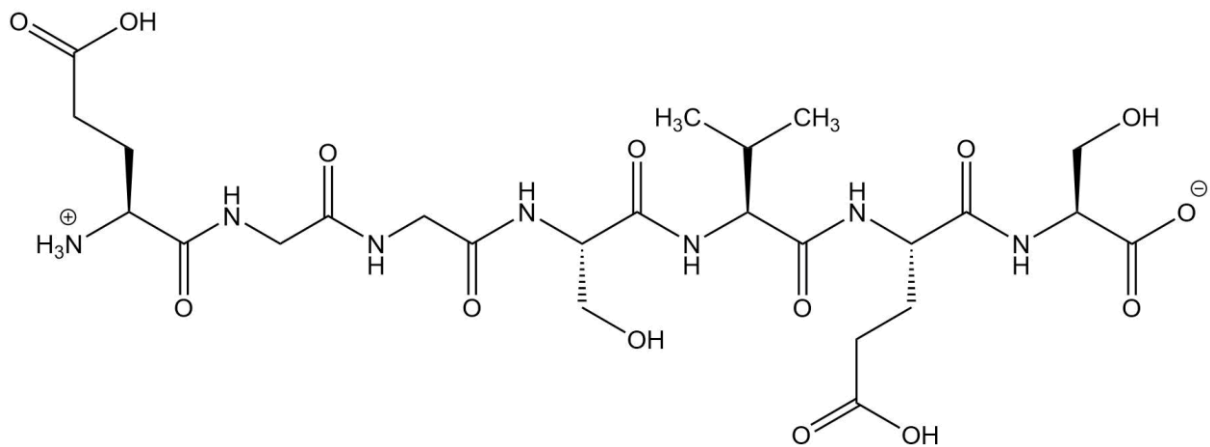
Spezifikationen der Synthese

| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-L-Asparaginsäure-tert-butylester ○ Fmoc-L-Cystein-tritylester ○ Fmoc-L-Glutaminsäure-tert-butylester ○ Fmoc-L-Lysin-tert-butylester |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 97 – 90 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 3 – 10 % <p>Laufzeit 11 Minuten</p> |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 95,04 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 55,7 mg (23,6 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 623,2341 ○ [M+H]⁺ gefunden: 623,2346 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Die NMR-Daten des Peptids waren trotz nötiger Reinheit nicht auswertbar, als Grund wurde eine Dimer-Bildung durch Disulfidbrücken von zwei Cysteinen vermutet. Um einen Strukturbeweis zu erlangen, wurde die Probe mit hrMS-MS analysiert, wobei folgende Fragmente detektiert wurden:

- 494,1908 (EDCK), berechnet: 494,1915
- 365,1692 (DCK), berechnet: 365,1489
- 250,1229 (CK), berechnet: 250,1220
- 147,1134 (K), berechnet: 147,1128

7.2.3 Glu-Gly-Gly-Ser-Val-Glu-Ser (EGGSVES)



Spezifikationen der Synthese

| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-L-Glutaminsäure-tert-butylester ○ Fmoc-L-Glycin ○ Fmoc-L-Serin-tert-butylester ○ Fmoc-L-Valin |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 95 – 91 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 5 – 9 % Laufzeit 12 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 95,28 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 47,9 mg (13,9 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 664,2784 ○ [M+H]⁺ gefunden: 664,2785 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

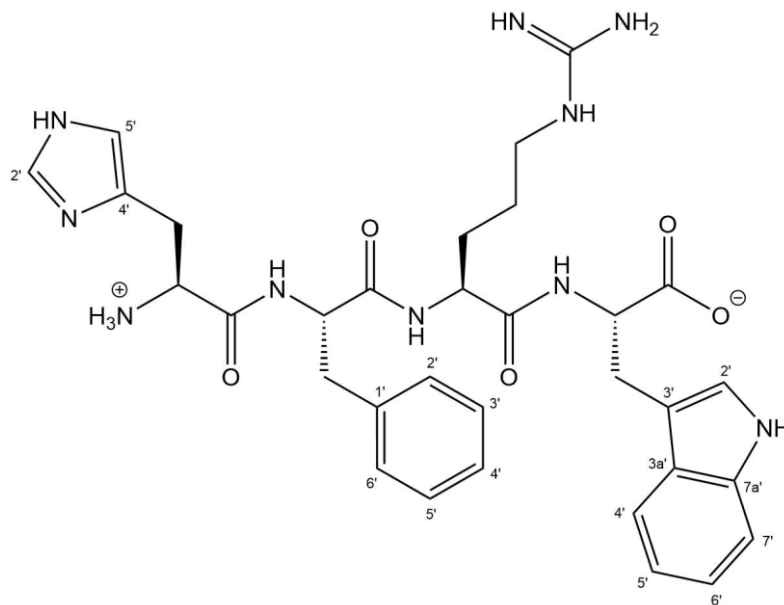
Signalzuordnung aus ¹H und ¹³C NMR-Spektren

| EGGSVES in D ₂ O | | ¹ H | ¹³ C |
|--------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Glu-5' | C | -- | 177,72 |
| Glu-5 | C | -- | 176,98 |
| Val-1 | C | -- | 174,12 |
| Ser-1' | C | -- | 174,01 |
| Glu-1' | C | -- | 173,59 |
| Ser-1 | C | | 172,43 |
| Gly-1 + 1' | C | -- | 172,07 |
| Glu-1' | C | -- | 170,67 |
| Ser-3' | CH ₂ | 3,85/3,77 | 61,75 |
| Ser-3 | CH ₂ | 3,75 | 61,71 |
| Val-2 | CH | 4,05 | 60,36 |
| Ser-2 | CH | 4,41 | 56,00 |
| Ser-2' | CH | 4,37 | 55,84 |
| Glu-2' | CH | 4,36 | 53,42 |
| Glu-2 | CH | 4,03 | 53,09 |
| Gly-2 | CH ₂ | 3,95/3,91 | 43,01 |
| Gly-2' | CH ₂ | 3,91 | 42,90 |
| Val-3 | CH | 1,98 | 30,69 |
| Glu-4' | CH ₂ | 2,39 | 30,50 |
| Glu-4 | CH ₂ | 2,48 | 29,83 |
| Glu-3' | CH ₂ | 2,04/1,88 | 26,81 |
| Glu-3 | CH ₂ | 2,09 | 26,46 |
| Val-4/1 | CH ₃ | 0,83 | 18,97 |
| Val-4/2 | CH ₃ | 0,83 | 18,24 |

alle Angaben in ppm

Anmerkung zur Nummerierung: Bei den Aminosäuren, die doppelt im Peptid vorkommen, wurde jeweils die Aminosäure, die näher am N-Terminus ist, ohne Zusatz angegeben, diejenige, die näher am C-Terminus ist, mit einem Vermerk (') versehen.

7.2.4 His-Phe-Arg-Trp (HFRW)



Spezifikationen der Synthese

| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-L-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 68 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 32 % Laufzeit 15 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 98,17 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 82,4 mg (40,8 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 645,3256 ○ [M+H]⁺ gefunden: 645,3258 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

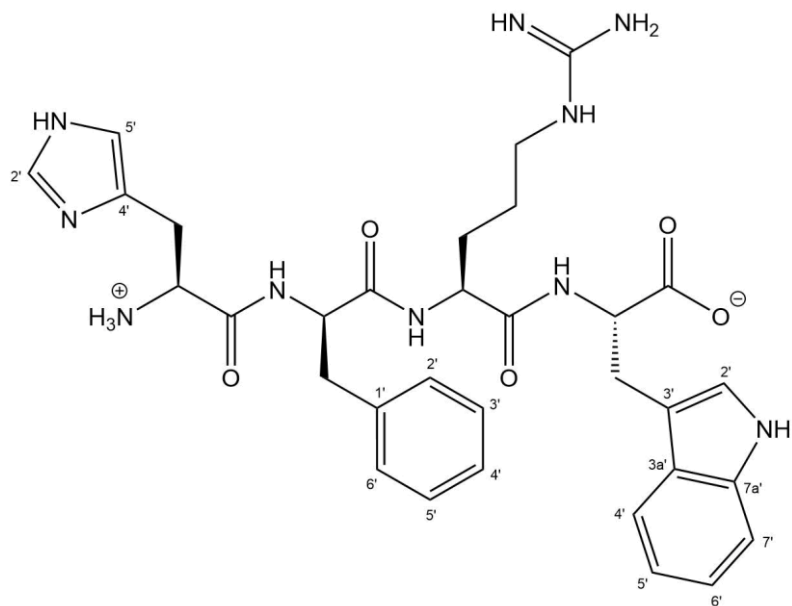
Signalzuordnung aus ¹H und ¹³C NMR-Spektren

| HFRW in D ₂ O | | ¹ H | ¹³ C |
|-----------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,55 |
| Arg-1* | C | -- | 172,87 |
| Phe-1* | C | -- | 172,83 |
| His-1 | C | -- | 168,48 |
| Arg-6' | C | -- | 157,26 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,70 |
| Phe-1' | C | -- | 136,08 |
| His-2' | CH | 8,35 | 134,82 |
| Phe-2',6' | CH | 6,99 | 129,70 |
| Phe-3',5' | CH | 7,06 | 129,36 |
| Phe-4' | CH | 7,07 | 127,94 |
| Trp-3a' | C | -- | 127,57 |
| His-4' | C | -- | 126,04 |
| Trp-2' | CH | 7,14 | 124,86 |
| Trp-6' | CH | 7,05 | 122,53 |
| Trp-5' | CH | 7,04 | 119,93 |
| His-5' | CH | 7,14 | 119,14 |
| Trp-4' | CH | 7,57 | 119,01 |
| Trp-7' | CH | 7,22 | 112,40 |
| Trp-3' | C | -- | 109,95 |
| Phe-2 | CH | 4,45 | 55,76 |
| Trp-2 | CH | 4,55 | 54,73 |
| Arg-2 | CH | 4,07 | 54,07 |
| His-2 | CH | 4,14 | 52,25 |
| Arg-5 | CH ₂ | 2,96 | 41,11 |
| Phe-3 | CH ₂ | 2,82/2,74 | 37,40 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,53/1,49 | 28,79 |
| Trp-3 | CH ₂ | 3,30/3,12 | 27,37 |
| His-3 | CH ₂ | 3,21 | 26,69 |
| Arg-4 | CH ₂ | 1,31 | 24,69 |

alle Angaben in ppm

* Signalzuordnung wegen zu geringem Verschiebungsunterschied nicht festgelegt

7.2.5 His-D-Phe-Arg-Trp (HfRW)



Spezifikationen der Synthese

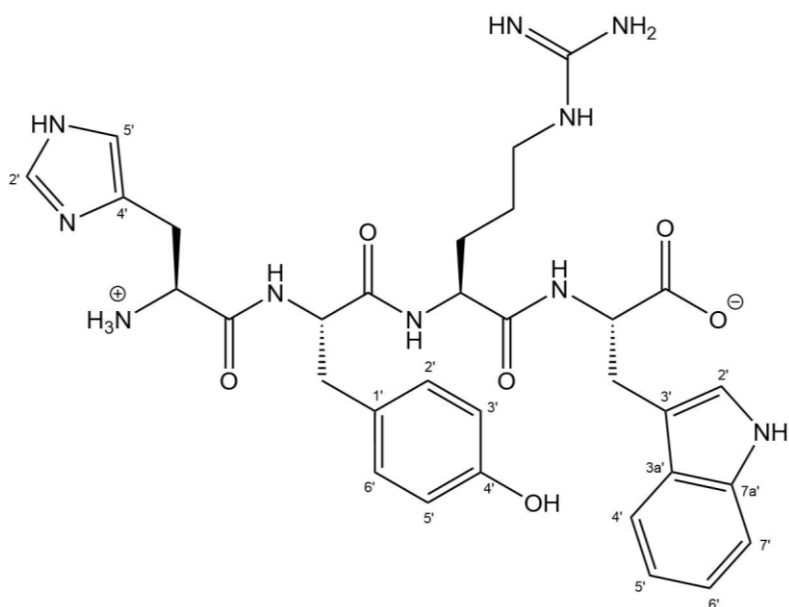
| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 71 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 29 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 98,67 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 68,1 mg (56,0 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 645,3256 ○ [M+H]⁺ gefunden: 645,3256 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| HfRW in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|---------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,47 |
| Arg-1 | C | -- | 173,50 |
| Phe-1 | C | -- | 173,35 |
| His-1 | C | -- | 168,54 |
| Arg-6' | C | -- | 157,13 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,70 |
| Phe-1' | C | -- | 136,28 |
| His-2' | CH | 8,48 | 134,83 |
| Phe-2',6' | CH | 7,10 | 129,67 |
| Phe-3',5' | CH | 7,22 | 129,51 |
| Phe-4' | CH | 7,19 | 127,96 |
| Trp-3a' | C | -- | 127,68 |
| His-4' | C | -- | 126,29 |
| Trp-2' | CH | 7,13 | 125,12 |
| Trp-6' | CH | 7,13 | 122,53 |
| Trp-5' | CH | 7,04 | 119,89 |
| His-5' | CH | 7,07 | 118,66 |
| Trp-4' | CH | 7,57 | 119,13 |
| Trp-7' | CH | 7,36 | 112,44 |
| Trp-3' | C | -- | 110,04 |
| Phe-2 | CH | 4,47 | 56,04 |
| Trp-2 | CH | 4,60 | 54,56 |
| Arg-2 | CH | 3,85 | 54,29 |
| His-2 | CH | 4,15 | 52,54 |
| Arg-5 | CH_2 | 2,75 | 40,84 |
| Phe-3 | CH_2 | 2,83/2,79 | 37,45 |
| Arg-3 | CH_2 | 1,25/1,07 | 28,16 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,27/3,13 | 27,56 |
| His-3 | CH_2 | 3,16 | 26,52 |
| Arg-4 | CH_2 | 0,84/0,76 | 24,53 |

alle Angaben in ppm

7.2.6 His-Tyr-Arg-Trp (HYRW)



Spezifikationen der Synthese

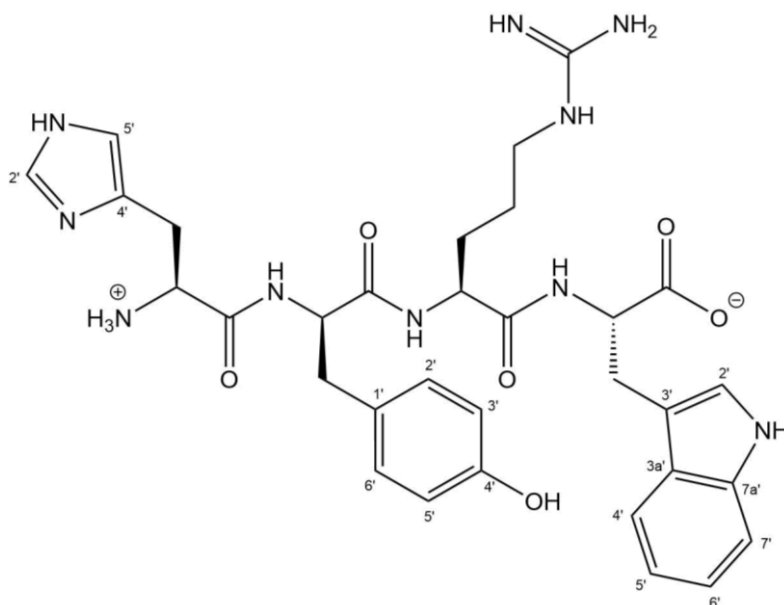
| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-L-Tyrosin-tert-butylester ○ Fmoc-tert-butylloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 71 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 29 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 99,16 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 68,3 mg (48,3 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 661,3205 ○ [M+H]⁺ gefunden: 661,3209 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| HYRW in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|---------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,22 |
| Tyr-1 | C | -- | 173,05 |
| Arg-1 | C | -- | 172,92 |
| His-1 | C | -- | 168,49 |
| Arg-6 | C | -- | 157,27 |
| Tyr-4' | C | -- | 155,24 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,69 |
| His-2' | CH | 8,36 | 134,73 |
| Tyr-2',6' | CH | 6,87 | 131,15 |
| Tyr-1' | C | -- | 127,85 |
| Trp-3a' | C | -- | 127,57 |
| His-4' | C | -- | 126,06 |
| Trp-2' | CH | 7,12 | 124,87 |
| Trp-6' | CH | 7,05 | 122,54 |
| Trp-5' | CH | 7,03 | 119,93 |
| His-5' | CH | 7,22 | 119,16 |
| Trp-4' | CH | 7,54 | 118,99 |
| Tyr-3',5' | CH | 6,62 | 116,09 |
| Trp-7' | CH | 7,23 | 112,40 |
| Trp-3' | C | -- | 109,82 |
| Tyr-2 | CH | 4,41 | 55,87 |
| Trp-2 | CH | 4,59 | 54,43 |
| Arg-2 | CH | 4,05 | 54,18 |
| His-2 | CH | 4,15 | 52,26 |
| Arg-5 | CH_2 | 2,94 | 41,11 |
| Tyr-3 | CH_2 | 2,76/2,66 | 36,60 |
| Arg-3 | CH_2 | 1,48 | 28,68 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,29/3,13 | 27,26 |
| His-3 | CH_2 | 3,21 | 26,71 |
| Arg-4 | CH_2 | 1,27 | 24,67 |

alle Angaben in ppm

7.2.7 His-D-Tyr-Arg-Trp (HyRW)



Spezifikationen der Synthese

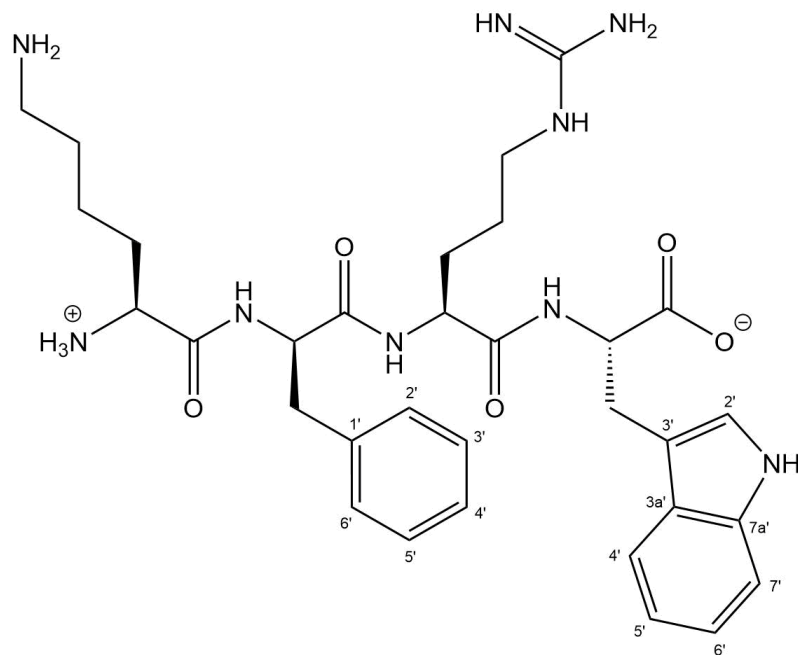
| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Tyrosin-tert-butylester ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 71 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 29 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 95,25 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 40,5 mg (36,8 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 661,3205 ○ [M+H]⁺ gefunden: 661,3227 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| HyRW in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|---------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,79 |
| Tyr-1 | C | -- | 173,55 |
| Arg-1 | C | -- | 173,22 |
| His-1 | C | -- | 168,49 |
| Arg-6 | C | -- | 157,18 |
| Tyr-4' | C | -- | 155,29 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,66 |
| His-2' | CH | 8,53 | 134,82 |
| Tyr-2',6' | CH | 6,97 | 131,09 |
| Tyr-1' | C | -- | 127,99 |
| Trp-3a' | C | | 127,74 |
| His-4' | C | -- | 126,36 |
| Trp-2' | CH | 7,11 | 125,07 |
| Trp-6' | CH | 7,12 | 122,49 |
| Trp-5' | CH | 7,04 | 119,84 |
| Trp-4' | CH | 7,56 | 119,14 |
| His-5' | CH | 7,13 | 118,71 |
| Tyr-3',5' | CH | 6,69 | 116,11 |
| Trp-7' | CH | 7,36 | 112,42 |
| Trp-3' | C | | 110,15 |
| Tyr-2 | CH | 4,40 | 56,27 |
| Trp-2 | CH | 4,57 | 54,82 |
| Arg-2 | CH | 3,81 | 54,22 |
| His-2 | CH | 4,15 | 52,46 |
| Arg-5 | CH_2 | 2,75 | 40,88 |
| Tyr-3 | CH_2 | 2,73 | 36,59 |
| Arg-3 | CH_2 | 1,23/1,02 | 28,14 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,26/3,10 | 27,61 |
| His-3 | CH_2 | 3,19 | 26,56 |
| Arg-4 | CH_2 | 0,81/0,73 | 24,49 |

alle Angaben in ppm

7.2.8 Lys-D-Phe-Arg-Trp (KfRW)



Spezifikationen der Synthese

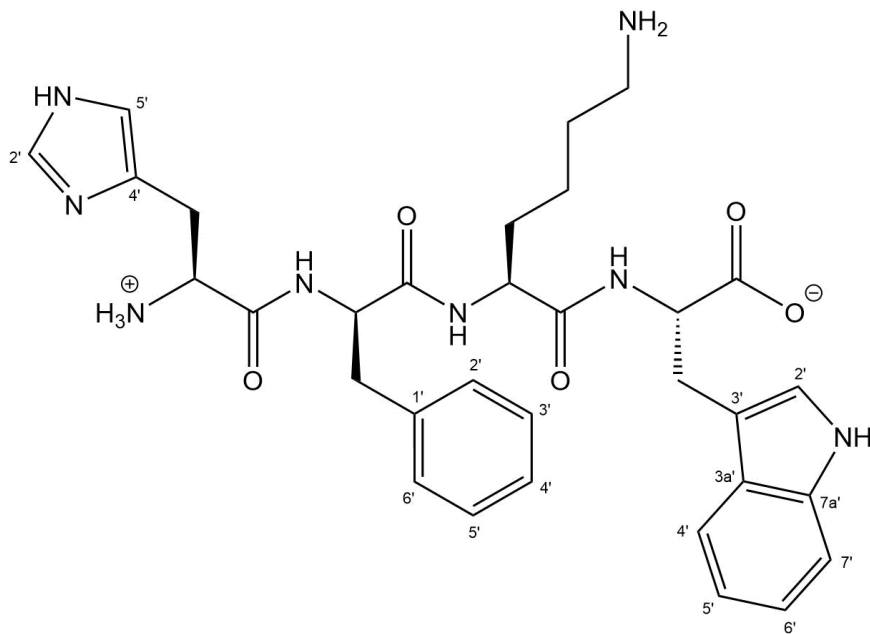
| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Lysin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 73 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 27 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 98,91 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 38,9 mg (43,6 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 636,3616 ○ [M+H]⁺ gefunden: 636,3636 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| KfRW in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|---------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,55 |
| Phe-1 | C | -- | 173,62 |
| Arg-1 | C | -- | 173,37 |
| Lys-1 | C | -- | 170,15 |
| Arg-6' | C | -- | 157,14 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,70 |
| Phe-1' | C | -- | 136,51 |
| Phe-2',6' | CH | 7,16 | 129,77 |
| Phe-3',5' | CH | 7,26 | 129,49 |
| Phe-4' | CH | 7,20 | 127,91 |
| Trp-3a' | C | -- | 127,68 |
| Trp-2' | CH | 7,13 | 125,13 |
| Trp-6' | CH | 7,13 | 122,52 |
| Trp-5' | CH | 7,05 | 119,88 |
| Trp-4' | CH | 7,57 | 119,15 |
| Trp-7' | CH | 7,37 | 112,44 |
| Trp-3' | C | -- | 110,07 |
| Phe-2 | CH | 4,55 | 55,79 |
| Trp-2 | CH | 4,60 | 54,59 |
| Arg-2 | CH | 3,87 | 54,29 |
| Lys-2 | CH | 3,83 | 53,49 |
| Arg-5 | CH_2 | 2,76 | 40,86 |
| Lys-6 | CH_2 | 2,78 | 39,55 |
| Phe-3 | CH_2 | 2,92 | 37,56 |
| Lys-3 | CH_2 | 1,63 | 30,81 |
| Arg-3 | CH_2 | 1,27/1,10 | 28,19 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,28/3,12 | 27,59 |
| Lys-5 | CH_2 | 1,48 | 26,99 |
| Arg-4 | CH_2 | 0,87/0,79 | 24,56 |
| Lys-4 | CH_2 | 1,04 | 21,65 |

alle Angaben in ppm

7.2.9 His-D-Phe-Lys-Trp (HfKW)



Spezifikationen der Synthese

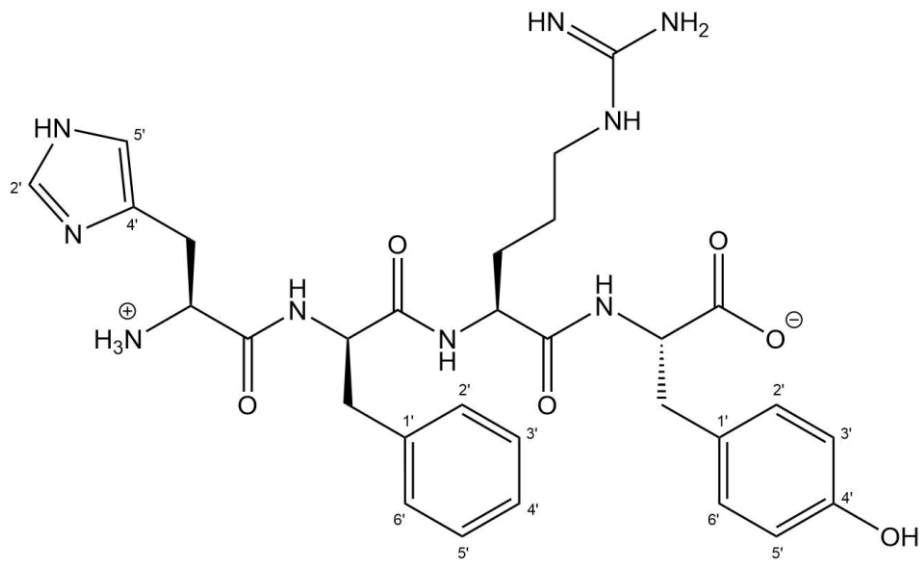
| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Lysin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 73 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 27 % <p>Laufzeit 10 Minuten</p> |
| Reinheit lt. HPLC | ○ 94,08 % |
| Ausbeute | ○ 52,0 mg (47,3 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ $[M+H]^+$ berechnet: 617,3194 ○ $[M+H]^+$ gefunden: 617,3222 |
| NMR | ○ Aufgenommen in D ₂ O, Eichung auf Essigsäure im ¹³ C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im ¹ H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| HfKW in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|---------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,53 |
| Lys-1 | C | -- | 173,56 |
| Phe-1 | C | -- | 173,50 |
| His-1 | C | -- | 168,57 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,70 |
| Phe-1' | C | -- | 136,39 |
| His-2' | CH | 8,45 | 134,82 |
| Phe-2',6' | CH | 7,10 | 129,68 |
| Phe-3',5' | CH | 7,23 | 129,52 |
| Phe-4' | CH | 7,20 | 127,98 |
| Trp-3a' | C | -- | 127,68 |
| His-4' | C | -- | 126,24 |
| Trp-2' | CH | 7,13 | 125,15 |
| Trp-6' | CH | 7,13 | 122,53 |
| Trp-5' | CH | 7,05 | 119,91 |
| Trp-4' | CH | 7,57 | 119,18 |
| His-5' | CH | 7,02 | 118,60 |
| Trp-7' | CH | 7,37 | 112,46 |
| Trp-3' | C | -- | 110,03 |
| Phe-2 | CH | 4,48 | 55,97 |
| Trp-2 | CH | 4,59 | 54,59 |
| Lys-2 | CH | 3,88 | 54,47 |
| His-2 | CH | 4,13 | 52,52 |
| Lys-6 | CH_2 | 2,67 | 39,62 |
| Phe-3 | CH_2 | 2,86/2,76 | 37,45 |
| Lys-3 | CH_2 | 1,29/1,14 | 30,57 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,26/3,14 | 27,56 |
| Lys-5 | CH_2 | 1,31 | 26,77 |
| His-3 | CH_2 | 3,13 | 26,50 |
| Lys-4 | CH_2 | 0,71 | 22,31 |

alle Angaben in ppm

7.2.10 His-D-Phe-Arg-Tyr (HfRY)



Spezifikationen der Synthese

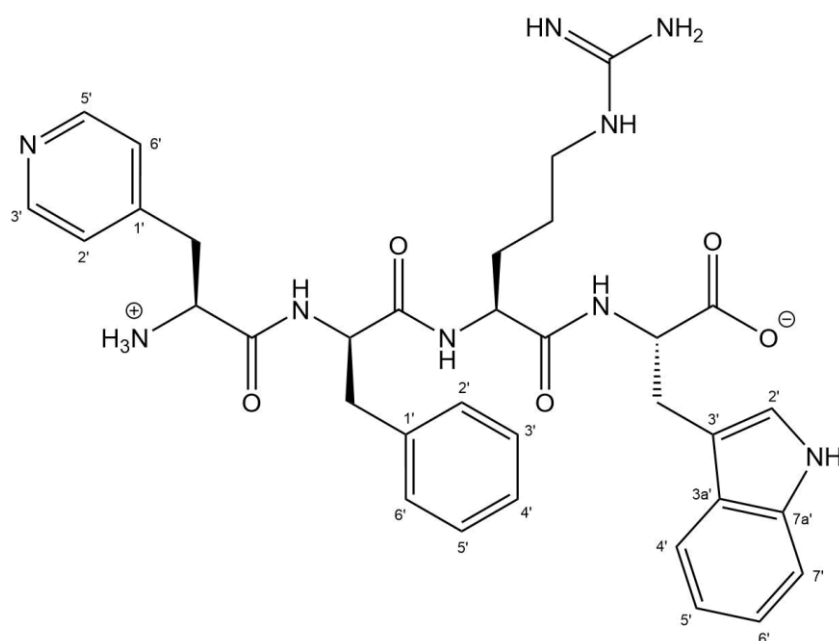
| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-L-Tyrosin-tert-butylester |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 73 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 27 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 94,32 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 89,9 mg (75,3 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 622,3096 ○ [M+H]⁺ gefunden: 622,3107 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| HfRY in D ₂ O | | ^1H | ^{13}C |
|-----------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| Tyr-1 | C | -- | 176,22 |
| Phe-1 | C | -- | 173,49 |
| Arg-1 | C | -- | 173,40 |
| His-1 | C | -- | 168,56 |
| Arg-6 | C | -- | 157,21 |
| Tyr-4' | C | -- | 154,96 |
| Phe 1' | C | -- | 136,27 |
| His-2' | CH | 8,48 | 134,80 |
| Tyr-2',6' | CH | 7,02 | 131,31 |
| Phe-2',6' | CH | 7,11 | 129,69 |
| Phe-3',5' | CH | 7,23 | 129,51 |
| Tyr-1' | C | -- | 129,32 |
| Phe-4' | CH | 7,19 | 127,96 |
| His-4' | C | -- | 126,31 |
| His-5' | CH | 7,07 | 118,67 |
| Tyr-3',5' | CH | 6,70 | 115,92 |
| Phe-2 | CH | 4,51 | 55,97 |
| Tyr-2 | CH | 4,45 | 55,14 |
| Arg-2 | CH | 3,87 | 54,36 |
| His-2 | CH | 4,16 | 52,58 |
| Arg-5 | CH ₂ | 2,85 | 40,91 |
| Phe-3 | CH ₂ | 2,84/2,79 | 37,55 |
| Tyr-3 | CH ₂ | 3,05/2,78 | 36,82 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,36/1,22 | 28,38 |
| His-3 | CH ₂ | 3,16 | 26,54 |
| Arg-4 | CH ₂ | 0,92 | 24,76 |

alle Angaben in ppm

7.2.11 Pal-D-Phe-Arg-Trp (Pal-fRW)



Spezifikationen der Synthese

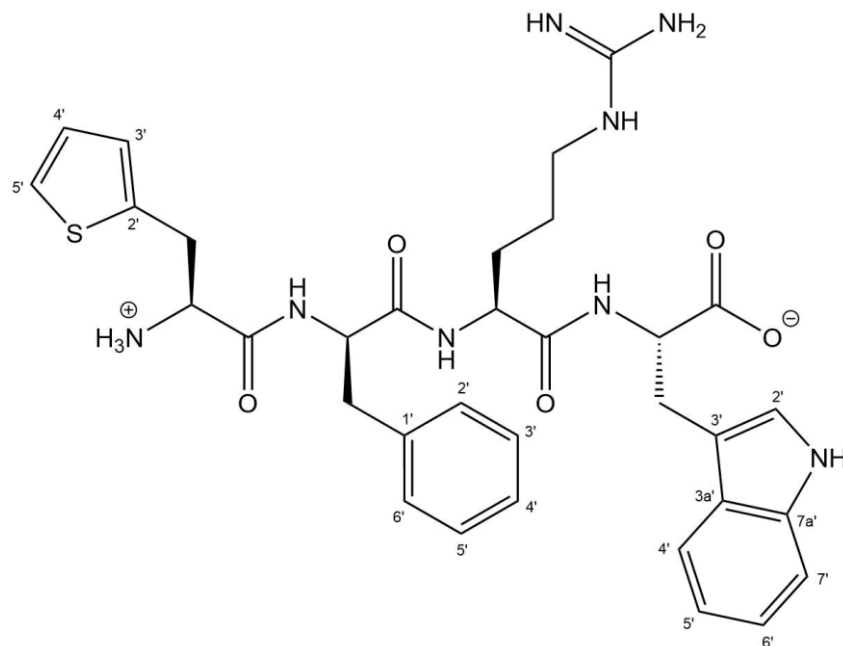
| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-3-(4-pyridyl)-L-Alanin ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 73 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 27 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 95,17 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 71,8 mg (52,9 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 656,3303 ○ [M+H]⁺ gefunden: 656,3329 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im ¹³C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im ¹H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| Pal-frW in D ₂ O | | ^1H | ^{13}C |
|--------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,71 |
| Phe-1 | C | -- | 173,48 |
| Arg-1 | C | -- | 173,28 |
| Pal-1 | C | -- | 168,36 |
| Arg-6 | C | -- | 157,14 |
| Pal-1' | C | -- | 155,83 |
| Pal-3',5' | CH | 8,54 | 142,01 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,69 |
| Phe-1' | C | -- | 136,34 |
| Phe-2',6' | CH | 7,09 | 129,63 |
| Phe-3',5' | CH | 7,24 | 129,53 |
| Pal-2',6' | CH | 7,68 | 128,67 |
| Phe-4' | CH | 7,23 | 128,00 |
| Trp-3a' | C | -- | 127,73 |
| Trp-2' | CH | 7,15 | 125,08 |
| Trp-6' | CH | 7,14 | 122,51 |
| Trp-5' | CH | 7,06 | 119,87 |
| Trp-4' | CH | 7,59 | 119,15 |
| Trp-7' | CH | 7,38 | 112,43 |
| Trp-3' | C | -- | 110,16 |
| Phe-2 | CH | 4,44 | 55,98 |
| Trp-2 | CH | 4,60 | 54,74 |
| Arg-2 | CH | 3,88 | 54,31 |
| Pal-2 | CH | 4,30 | 53,23 |
| Arg-5 | CH ₂ | 2,78 | 40,85 |
| Phe-3 | CH ₂ | 2,83/2,71 | 37,32 |
| Pal-3 | CH ₂ | 3,31 | 37,05 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,29/1,12 | 28,14 |
| Trp-3 | CH ₂ | 3,29/3,14 | 27,61 |
| Arg-4 | CH ₂ | 0,88/0,81 | 24,53 |

alle Angaben in ppm

7.2.12 Tha-D-Phe-Arg-Trp (Tha-fRW)



Spezifikationen der Synthese

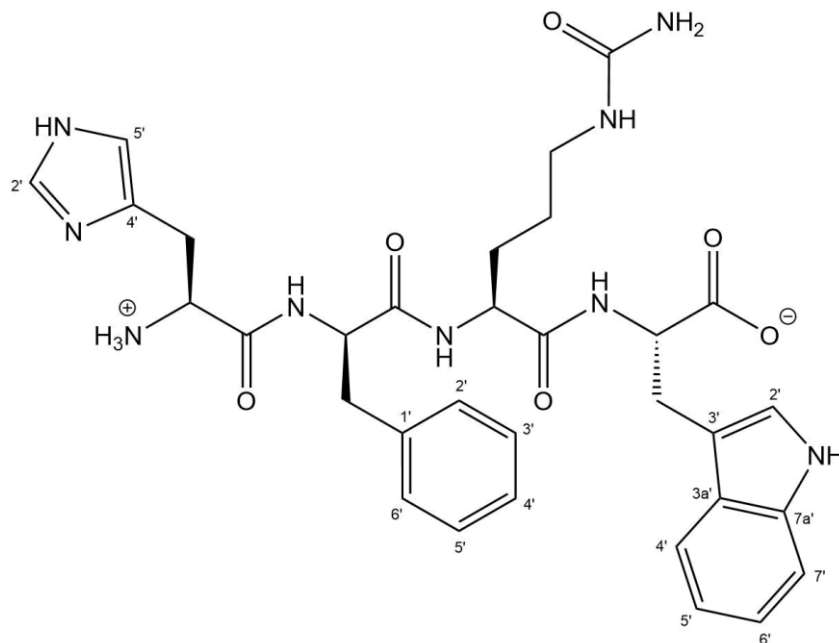
| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-3-(2-thienyl)-L-Alanin ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 65 – 55 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 35 – 45 % <p>Laufzeit 10 Minuten</p> |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 97,70 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 40,7 mg (31,3 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 661,2915 ○ [M+H]⁺ gefunden: 661,2937 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im ¹³C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im ¹H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ¹H und ¹³C NMR-Spektren

| Tha-fRW in D ₂ O | | ¹ H | ¹³ C |
|--------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 180,23 |
| Phe-1 | C | -- | 177,19 |
| Arg-1 | C | -- | 176,86 |
| Tha-1 | C | -- | 172,81 |
| Arg-6 | C | -- | 160,73 |
| Trp-7a' | C | -- | 140,31 |
| Phe-1' | C | -- | 139,83 |
| Tha-2' | C | -- | 138,86 |
| Phe-2',6' | CH | 7,12 | 133,43 |
| Phe-3',5' | CH | 7,25 | 133,14 |
| Tha-3' | CH | 6,84 | 132,53 |
| Tha-4' | CH | 6,98 | 132,01 |
| Phe-4' | CH | 7,19 | 131,59 |
| Trp-3a' | C | -- | 131,31 |
| Tha-5' | CH | 7,32 | 130,64 |
| Trp-2' | CH | 7,11 | 128,82 |
| Trp-6' | CH | 7,14 | 126,14 |
| Trp-5' | CH | 7,06 | 123,48 |
| Trp-4' | CH | 7,58 | 122,78 |
| Trp-7' | CH | 7,37 | 116,08 |
| Trp-3' | C | -- | 113,71 |
| Phe-2 | CH | 4,36 | 60,00 |
| Tha-2 | CH | 4,14 | 58,40 |
| Trp-2 | CH | 4,59 | 58,25 |
| Arg-2 | CH | 3,83 | 57,64 |
| Arg-5 | CH ₂ | 2,73 | 44,43 |
| Phe-3 | CH ₂ | 2,82 | 41,00 |
| Tha-3 | CH ₂ | 3,29 | 34,99 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,23/0,99 | 31,59 |
| Trp-3 | CH ₂ | 3,27/3,14 | 31,17 |
| Arg-4 | CH ₂ | 0,74/0,62 | 28,08 |

alle Angaben in ppm

7.2.13 His-D-Phe-Cit-Trp (Hf-Cit-W)



Spezifikationen der Synthese

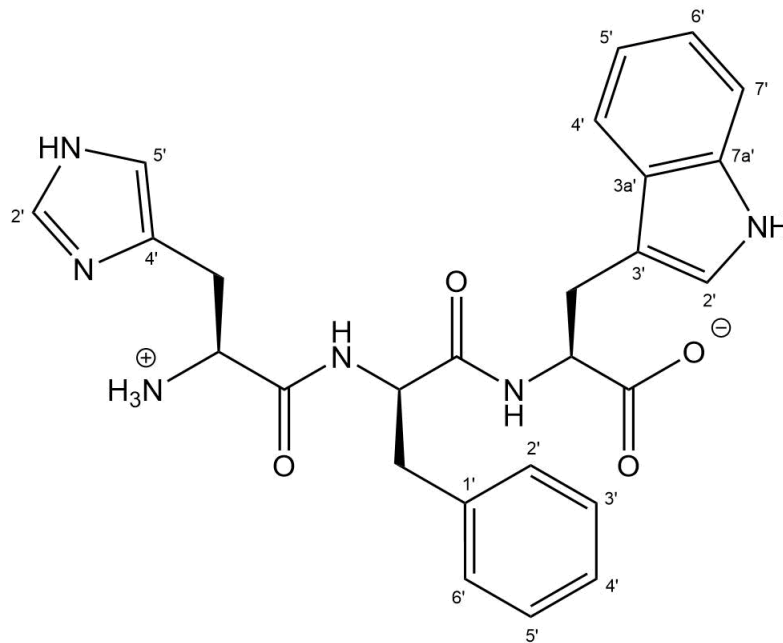
| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-L-Citrullin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 77 – 73 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 23 – 27 % <p>Laufzeit 10 Minuten</p> |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 99,45 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 58,0 mg (41,2 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 646,3102 ○ [M+H]⁺ gefunden: 646,3104 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| Hf-Cit-W in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|-------------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 176,07 |
| Cit-1 | C | -- | 173,76 |
| Phe-1 | C | -- | 173,47 |
| His-1 | C | -- | 168,50 |
| Cit-6 | C | -- | 162,00 |
| Trp-7a' | C | -- | 136,73 |
| Phe-1' | C | -- | 136,30 |
| His-2' | CH | 8,48 | 134,75 |
| Phe-2',6' | CH | 7,10 | 129,64 |
| Phe-3',5' | CH | 7,24 | 129,54 |
| Phe-4' | CH | 7,21 | 128,05 |
| Trp-3a' | C | | 127,60 |
| His-4' | C | | 126,26 |
| Trp-2' | CH | 7,15 | 125,19 |
| Trp-6' | CH | 7,14 | 122,56 |
| Trp-5' | CH | 7,06 | 119,91 |
| Trp-4' | CH | 7,59 | 119,11 |
| His-5' | CH | 7,05 | 118,64 |
| Trp-7' | CH | 7,39 | 112,51 |
| Trp-3' | C | -- | 109,86 |
| Phe-2 | CH | 4,47 | 56,09 |
| Cit-2 | CH | 3,88 | 54,46 |
| Trp-2 | CH | 4,63 | 54,23 |
| His-2 | CH | 4,16 | 52,55 |
| Cit-5 | CH_2 | 2,73 | 39,66 |
| Phe-3 | CH_2 | 2,86/2,77 | 37,51 |
| Cit-3 | CH_2 | 1,28/1,12 | 28,42 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,29/3,17 | 27,46 |
| His-3 | CH_2 | 3,16 | 26,50 |
| Cit-4 | CH_2 | 0,80 | 25,84 |

alle Angaben in ppm

7.2.14 His-D-Phe-Trp (HfW)



Spezifikationen der Synthese

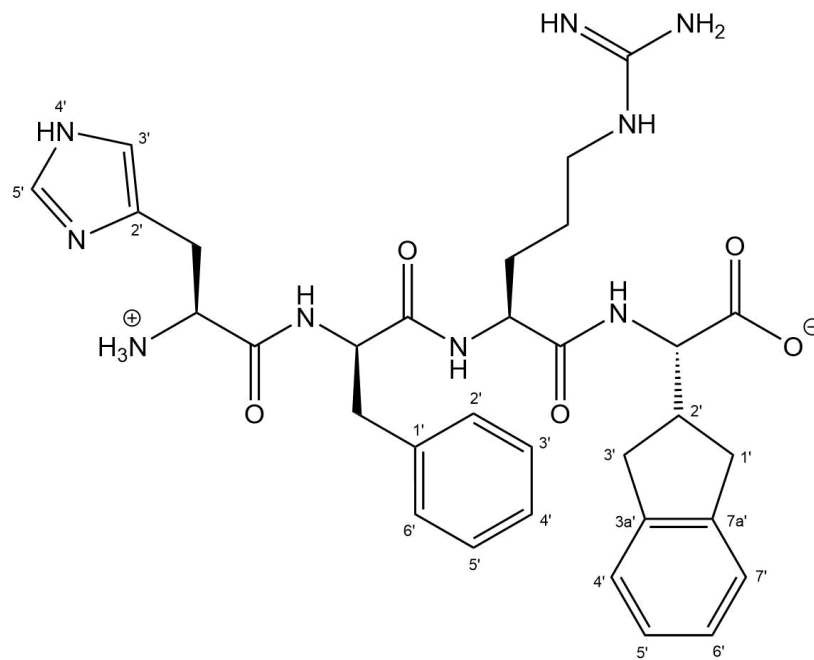
| | |
|------------------------|---|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Phenylalanin ○ Fmoc-tert-butyloxycarbonyl-L-Tryptophan |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 65 – 60 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 35 – 40 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 97,60 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 25,8 mg (28,8 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ $[M+H]^+$ berechnet: 489,2245 ○ $[M+H]^+$ gefunden: 489,2269 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im ¹³C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im ¹H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ^1H und ^{13}C NMR-Spektren

| HfW in D_2O | | ^1H | ^{13}C |
|--------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| Trp-1 | C | -- | 177,75 |
| Phe-1 | C | -- | 173,53 |
| His-1 | C | -- | 169,09 |
| Trp-7a' | C | -- | 137,59 |
| Phe-1' | C | -- | 137,35 |
| His-2' | CH | 8,36 | 135,32 |
| Phe-2',6' | CH | 6,84 | 130,16 |
| Phe-3',5' | CH | 7,11 | 130,05 |
| Phe-4' | CH | 7,13 | 128,54 |
| Trp-3a' | C | -- | 128,27 |
| His-4' | C | -- | 126,84 |
| Trp-2' | CH | 7,08 | 125,74 |
| Trp-6' | CH | 7,12 | 123,30 |
| Trp-5' | CH | 7,08 | 120,68 |
| Trp-4' | CH | 7,60 | 119,86 |
| His-5' | CH | 6,82 | 119,07 |
| Trp-7' | CH | 7,37 | 113,25 |
| Trp-3' | C | -- | 110,89 |
| Phe-2 | CH | 4,47 | 56,09 |
| Trp-2 | CH | 4,63 | 55,69 |
| His-2 | CH | 4,08 | 53,17 |
| Phe-3 | CH_2 | 2,44/2,32 | 38,15 |
| Trp-3 | CH_2 | 3,32/3,06 | 28,50 |
| His-3 | CH_2 | 3,03 | 27,17 |

alle Angaben in ppm

7.2.15 His-D-Phe-Arg-Igl (HfR-Igl)



Spezifikationen der Synthese

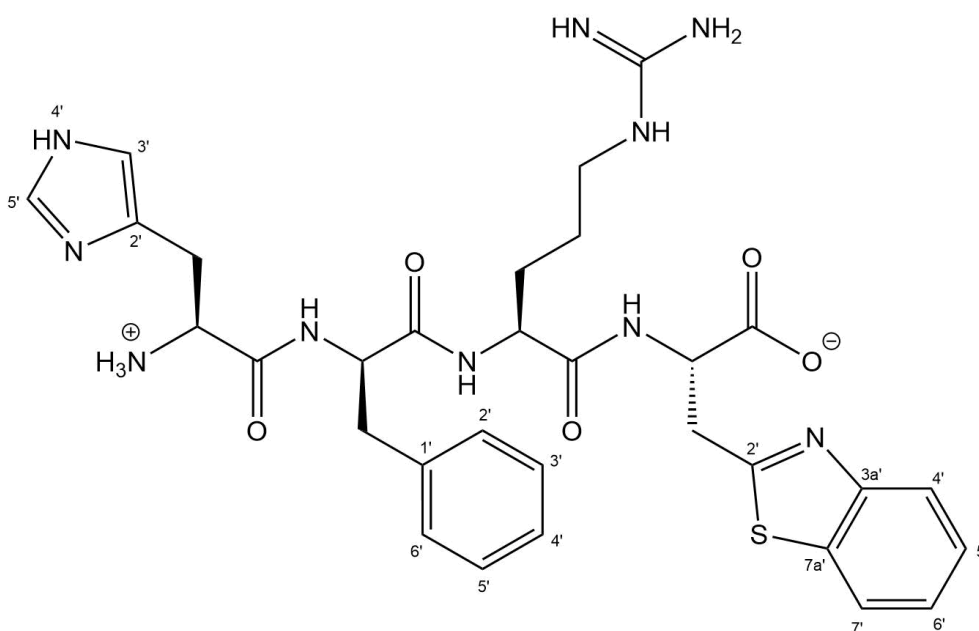
| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-2-indanyl-Glycin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Phenylalanin |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 73 – 65 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 27 – 35 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 98,70 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 53,9 mg (59,6 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 632,3303 ○ [M+H]⁺ gefunden: 632,3302 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im 13C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im 1H-Spektrum (4,72 ppm) |

Signalzuordnung aus ¹H und ¹³C NMR-Spektren

| HfR-Igl in D ₂ O | | ¹ H | ¹³ C |
|--------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Igl-1 | C | -- | 176,57 |
| Arg-1 | C | -- | 173,75 |
| Phe-1 | C | -- | 173,45 |
| His-1 | C | -- | 168,53 |
| Arg-6 | C | -- | 157,24 |
| Igl-3a',7a' | C | -- | 143,36 |
| Igl-3a',7a' | C | -- | 142,98 |
| Phe-1' | C | -- | 136,30 |
| His-2' | CH | 8,48 | 134,82 |
| Phe-2',6' | CH | 7,14 | 129,69 |
| Phe-3',5' | CH | 7,27 | 129,52 |
| Phe-4' | CH | 7,22 | 127,97 |
| Igl-5',6' | CH | 7,12 | 127,29 |
| Igl-5',6' | CH | 7,12 | 127,24 |
| His-4' | C | -- | 126,31 |
| Igl-4',7' | CH | 7,19 | 125,13 |
| His-5' | CH | 7,10 | 118,68 |
| Igl-2 | CH | 4,33 | 57,65 |
| Phe-2 | CH | 4,53 | 56,03 |
| Arg-2 | CH | 4,00 | 54,22 |
| His-2 | CH | 4,18 | 52,54 |
| Igl-2' | CH | 2,87 | 41,67 |
| Arg-5 | CH ₂ | 2,93 | 40,96 |
| Phe-3 | CH ₂ | 2,86 | 37,52 |
| Igl-1',3' | CH ₂ | 2,99/2,74 | 36,15 |
| Igl-1',3' | CH ₂ | 2,98/2,71 | 35,46 |
| Arg-3 | CH ₂ | 1,53/1,26 | 28,37 |
| His-3 | CH ₂ | 3,19 | 26,53 |
| Arg-4 | CH ₂ | 1,07 | 24,88 |

alle Angaben in ppm

7.2.16 His-D-Phe-Arg-Ala(Bth) (HfR-Ala(Bth))



Spezifikationen der Synthese

| | |
|------------------------|--|
| Verwendete Aminosäuren | <ul style="list-style-type: none"> ○ Fmoc-3-(benzothiazol-2-yl)-Alanin ○ Fmoc-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-Arginin ○ Fmoc-trityl-L-Histidin ○ Fmoc-D-Phenylalanin |
| Cleavage Cocktail | <ul style="list-style-type: none"> ○ Trifluoressigsäure 88 % ○ Wasser 2,5 % ○ Phenol 2,5 % ○ Triisopropylsilan 1 % |
| Aufreinigung mit HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ Wasser + 0,1 % Trifluoressigsäure 73 – 67 % ○ Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure 27 – 33 % Laufzeit 10 Minuten |
| Reinheit lt. HPLC | <ul style="list-style-type: none"> ○ 96,90 % |
| Ausbeute | <ul style="list-style-type: none"> ○ 12,4 mg (10,9 %) |
| hrMS | <ul style="list-style-type: none"> ○ [M+H]⁺ berechnet: 663,2820 ○ [M+H]⁺ gefunden: 663,2812 |
| NMR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Aufgenommen in D₂O, Eichung auf Essigsäure im ¹³C-Spektrum (21,03 ppm) und auf HDO im ¹H-Spektrum (4,72 ppm) |

Die NMR-Daten des Peptids waren trotz nötiger Reinheit nicht auswertbar, als Grund wurde eine Anlagerung von zwei Molekülen, eventuell am Schwefel des Benzothiazins, vermutet. Als Strukturbeweis wurde die Probe mit hrMS-MS analysiert, wobei folgende Fragmente detektiert wurden:

- 526,2225 (fR-Ala(Bth)), berechnet: 526,2223
- 379,1542 (R-Ala(Bth)), berechnet: 379,1539
- 223,0532 (Ala(Bth)), berechnet: 222,9639

7.3 In silico-Studien

7.3.1 Agonisten am MC1R, die für die Berechnung der Pharmakophore verwendet wurden

In der nachfolgenden Tabelle sind die 98 Liganden aufgelistet, die für die Generierung von Pharmakophoren verwendet wurden. Die Liganden sind nach aufsteigendem Molekulargewicht geordnet, um einen Überblick zu den Kriterien zu geben, die als Filter gesetzt wurden, sind zusätzlich eine Kurzbeschreibung des Assays, die EC50 und der LogP angegeben. Über die Compound ID können alle weiteren Informationen zum Molekül in der ChEMBL Datenbank abgerufen werden.

| Compound ID | Assay Description | Activity Operator | Activity Value | Activity Units | Molecular Weight | ALogP |
|--------------|---|-------------------|----------------|----------------|------------------|-------|
| CHEMBL605115 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 1,58 | nM | 519,59 | 3,4 |
| CHEMBL599867 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 1,58 | nM | 519,59 | 3,4 |
| CHEMBL596804 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 35,48 | nM | 525,57 | 3,35 |
| CHEMBL276301 | In vitro effective concentration towards human Melanocortin 1 receptor (MC1R) in SPA-based cAMP assay in melanoma cells | = | 2,5 | nM | 530,66 | 3,49 |
| CHEMBL183434 | Displacement of [125I]NDP-MSH from HEK293 cells expressing human melanocortin-1 receptor at 10 uM | = | 27 | nM | 532,08 | 3,34 |
| CHEMBL598214 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 1,58 | nM | 537,58 | 3,61 |

| | | | | | | |
|--------------|---|---|-------|----|--------|------|
| CHEMBL598631 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 29,51 | nM | 537,61 | 3,13 |
| CHEMBL598011 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 15,85 | nM | 537,61 | 3,13 |
| CHEMBL598617 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 14,13 | nM | 543,56 | 3,55 |
| CHEMBL446941 | In vitro effective concentration towards human Melanocortin 1 receptor (MC1R) in SPA-based cAMP assay in melanoma cells | = | 1,5 | nM | 545,67 | 2,55 |
| CHEMBL276012 | In vitro effective concentration towards human Melanocortin 1 receptor (MC1R) in SPA-based cAMP assay in melanoma cells | = | 3,8 | nM | 546,66 | 2,84 |
| CHEMBL590281 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 1,58 | nM | 555,6 | 3,33 |
| CHEMBL590794 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 12,59 | nM | 556,59 | 2,18 |
| CHEMBL14642 | In vitro effective concentration towards human Melanocortin 1 receptor (MC1R) in SPA-based cAMP assay in melanoma cells | = | 28 | nM | 559,7 | 2,61 |
| CHEMBL206033 | Binding affinity to MC1 receptor | = | 30 | nM | 582,74 | 3,01 |
| CHEMBL213956 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 40 | nM | 584,75 | 3,18 |

| | | | | | | |
|--------------|--|---|-------|----|--------|------|
| CHEMBL210011 | Agonist activity at human MC1R transfected in HEK293 cells | = | 28 | nM | 584,75 | 3,18 |
| CHEMBL275067 | In vitro effective concentration towards human Melanocortin 1 receptor (MC1R) in SPA-based cAMP assay in melanoma cells | = | 0,35 | nM | 587,71 | 2,57 |
| CHEMBL209622 | Agonist activity at human MC1R transfected in HEK293 cells | = | 4,3 | nM | 587,71 | 0,93 |
| CHEMBL339053 | Agonist activity at human MC1 receptor expressed in HEK293 cells | = | 5 | nM | 589,17 | 4,75 |
| CHEMBL591037 | Agonist activity at human MC1R expressed in CHO cells after 4 hrs by luciferase reporter gene assay | = | 22,39 | nM | 591,58 | 5,26 |
| CHEMBL569694 | Agonistic activity against human MC1R | = | 5 | nM | 603,72 | 0,75 |
| CHEMBL447117 | Agonist activity at human MC1R expressed in HEK293 cells assessed as effect on CRE-driven luminescence by luciferase reporter gene assay | = | 48 | nM | 615,74 | 3,5 |
| CHEMBL384176 | Binding affinity to human MC1R | = | 18 | nM | 617,71 | 1,79 |
| CHEMBL380120 | Binding affinity to MC1 receptor | = | 9 | nM | 628,76 | 2,61 |
| CHEMBL506762 | Displacement of europium-labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 17 | nM | 629,76 | 3,53 |
| CHEMBL450236 | Agonist activity at human MC1R expressed in HEK293 cells assessed as effect on CRE-driven luminescence by luciferase reporter gene assay | = | 44 | nM | 629,76 | 3,95 |
| CHEMBL214347 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 42 | nM | 632,79 | 3,92 |

| | | | | | | |
|---------------|--|---|------|----|--------|-------|
| CHEMBL213751 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 19 | nM | 632,79 | 3,92 |
| CHEMBL209587 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 15 | nM | 639,75 | 0,29 |
| CHEMBL89270 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 31,8 | nM | 643,74 | -0,36 |
| CHEMBL209789 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 35 | nM | 643,78 | 1,28 |
| CHEMBL1682209 | Agonist activity at human MC1 receptor expressed in BHK cells assessed as stimulation of agonist-induced cAMP accumulation | = | 16 | nM | 643,82 | 3,08 |
| CHEMBL214410 | Binding affinity to human MC1R | = | 4,3 | nM | 644,78 | 2,16 |
| CHEMBL13910 | In vitro effective concentration towards human Melanocortin 1 receptor (MC1R) in SPA-based cAMP assay in melanoma cells | = | 0,19 | nM | 649,78 | 4,23 |
| CHEMBL211419 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 4,7 | nM | 652,79 | 1,79 |
| CHEMBL377465 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 1,3 | nM | 652,79 | 1,79 |
| CHEMBL379508 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 0,65 | nM | 652,79 | 1,79 |

| | | | | | | |
|---------------|--|---|-----|----|--------|-------|
| CHEMBL365278 | Displacement of [125I]NDP-MSH from HEK293 cells expressing human melanocortin-1 receptor at 10 uM | = | 42 | nM | 654,22 | 5,89 |
| CHEMBL1682208 | Agonist activity at human MC1 receptor expressed in BHK cells assessed as stimulation of agonist-induced cAMP accumulation | = | 12 | nM | 671,83 | 2,68 |
| CHEMBL378293 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 13 | nM | 681,78 | 0,31 |
| CHEMBL50056 | Displacement of europium labeled NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 35 | nM | 685,78 | -0,34 |
| CHEMBL407825 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 7,5 | nM | 699,8 | 0,33 |
| CHEMBL316038 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 7 | nM | 701,78 | -1,01 |
| CHEMBL211699 | Binding affinity to human MC1R | = | 13 | nM | 710,83 | 0,49 |
| CHEMBL329586 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 3,5 | nM | 711,81 | 0,42 |
| CHEMBL313377 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 7 | nM | 713,83 | 0,79 |
| CHEMBL264306 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 4,5 | nM | 713,83 | 0,79 |

| | | | | | | |
|--------------|---|---|------|----|--------|-------|
| CHEMBL328117 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 7 | nM | 714,77 | -1,19 |
| CHEMBL315258 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 9,5 | nM | 715,8 | -0,6 |
| CHEMBL406276 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 2 | nM | 727,86 | 1,24 |
| CHEMBL315356 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 5 | nM | 727,86 | 1,21 |
| CHEMBL88537 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 13,7 | nM | 729,83 | -0,44 |
| CHEMBL327450 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 9 | nM | 731,87 | 0,15 |
| CHEMBL212614 | Binding affinity to human MC1R | = | 0,4 | nM | 736,86 | 0,72 |
| CHEMBL215833 | Binding affinity to human MC1R | = | 2 | nM | 745,84 | 0,41 |
| CHEMBL316259 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 6,8 | nM | 747,85 | 1,33 |
| CHEMBL86573 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 6,5 | nM | 753,77 | 0,79 |
| CHEMBL384774 | Binding affinity to human MC1R | = | 2 | nM | 754,85 | 0,92 |
| CHEMBL78565 | Agonist potency for human Melanocortin 1 receptor | = | 10 | nM | 756,9 | 0,46 |

| | | | | | | |
|---------------|--|---|-------|----|--------|-------|
| CHEMBL89004 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 2 | nM | 761,87 | 1,36 |
| CHEMBL379054 | Binding affinity to human MC1R | = | 1 | nM | 762,9 | 2,44 |
| CHEMBL349298 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 10 | nM | 770,88 | -0,15 |
| CHEMBL412358 | Agonist potency for human Melanocortin 1 receptor | = | 1 | nM | 770,88 | 0,04 |
| CHEMBL29582 | Agonist activity in HEK293 cells transfected with human MC1R by cAMP accumulation | = | 10 | nM | 770,88 | -0,15 |
| CHEMBL432565 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 0,5 | nM | 775,9 | 1,82 |
| CHEMBL2112919 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 4 | nM | 776,91 | -0,49 |
| CHEMBL385000 | Binding affinity to human MC1R | = | 14 | nM | 780,89 | 2,65 |
| CHEMBL2112920 | Agonist activity in HEK293 cells transfected with human MC1R by cAMP accumulation | = | 14 | nM | 781,9 | 0,46 |
| CHEMBL311750 | Agonist potency for human Melanocortin 1 receptor | = | 15 | nM | 781,91 | 0,6 |
| CHEMBL569693 | Agonistic activity against human MC1R | = | 0,01 | nM | 788,94 | 2,32 |
| CHEMBL431801 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 0,009 | nM | 789,93 | 2,28 |
| CHEMBL1923662 | Displacement of Eu-NDP-alphaMSH from human MC1 receptor expressed in human HCT116 cells after 1.5 hrs by time-resolved fluorescence analysis | = | 0,17 | nM | 789,93 | 2,14 |

| | | | | | | |
|---------------|---|---|------|----|--------|-------|
| CHEMBL312998 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 8 | nM | 791,9 | 1,03 |
| CHEMBL92481 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 9,5 | nM | 796,32 | 2,03 |
| CHEMBL2112917 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 1 | nM | 800,73 | 0,88 |
| CHEMBL345234 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 0,4 | nM | 800,91 | -0,17 |
| CHEMBL348511 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 20 | nM | 805,33 | 0,51 |
| CHEMBL419307 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 2 | nM | 812,32 | 1,83 |
| CHEMBL2112918 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 0,1 | nM | 814,93 | 0,18 |
| CHEMBL91957 | In vitro agonist potency was evaluated in HEK293 cells transfected with human melanocortin receptor (hMC1R) | = | 33,3 | nM | 818,34 | 1,7 |
| CHEMBL2371218 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 48 | nM | 820,94 | 0,76 |
| CHEMBL2371220 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 30 | nM | 820,94 | 0,76 |

| | | | | | | |
|---------------|--|---|-------|----|--------|-------|
| CHEMBL183733 | Agonistic activity against human Melanocortin 1 receptor | = | 13 | nM | 832,95 | 0,76 |
| CHEMBL2371219 | Effective concentration against hMC1R using HEK293 cells was determined by measuring the cAMP accumulation | = | 10 | nM | 839,77 | 1,18 |
| CHEMBL1923663 | Displacement of Eu-NDP-alphaMSH from human MC1 receptor expressed in human HCT116 cells after 1.5 hrs by time-resolved fluorescence analysis | = | 1,8 | nM | 846,98 | 1,08 |
| CHEMBL365019 | Agonistic activity against human Melanocortin 1 receptor | = | 23 | nM | 862,41 | 4,38 |
| CHEMBL363271 | Agonistic activity against human Melanocortin 1 receptor | = | 41 | nM | 884,37 | 4,33 |
| CHEMBL504986 | Agonist activity at human melanocortin 1 receptor expressed in HEK293 cells assessed as cAMP accumulation | = | 2 | nM | 893,97 | 0,64 |
| CHEMBL384720 | Agonistic activity against human Melanocortin 1 receptor | = | 0,009 | nM | 937,1 | 3,38 |
| CHEMBL24892 | Agonist activity at human melanocortin receptor (hMC1R). | = | 0,4 | nM | 953,1 | -0,14 |
| CHEMBL2371903 | Agonist activity at human melanocortin receptor (hMC1R). | = | 3 | nM | 961,12 | 1,47 |
| CHEMBL266665 | Agonistic activity against human Melanocortin 1 receptor | = | 0,05 | nM | 965,11 | 2,84 |
| CHEMBL319752 | Decrease in frog skin reflectivity (metabotropic activity). | = | 1 | nM | 967,15 | -2,3 |
| CHEMBL320459 | Decrease in frog skin reflectivity (metabotropic activity). | = | 3,33 | nM | 967,15 | -2,3 |
| CHEMBL2371902 | Agonist activity at human melanocortin receptor (hMC1R). | = | 5 | nM | 975,15 | 1,79 |
| CHEMBL410217 | Effective concentration for intracellular cAMP accumulation in L-cells expressing Melanocortin 1 receptor | = | 13,4 | nM | 982,1 | -2,18 |

| | | | | | | |
|---------------|--|---|----|----|--------|------|
| CHEMBL1775066 | Agonist activity at human MC1R expressed in HEK293 cells assessed as increase in intracellular cAMP accumulation | = | 26 | nM | 992,14 | -0,5 |
|---------------|--|---|----|----|--------|------|

Tab. 12 Liste von 98 Agonisten am MC1R

Als Kennzeichen sind angegeben die ChEMBL-ID, die Beschreibung des Assays aus der jeweiligen Publikation, mit dem die Moleküle getestet wurden, die EC50 in nM, das Molekulargewicht in g/mol und der logP.

7.3.2 Pharmakophore der Cluster 2 bis 9

In den Abbildungen 49 bis 56 werden die dreidimensionalen Darstellungen der Pharmakophore der Cluster 2 – 9 gezeigt. Wie bereits in Abbildung 36 erwähnt, stellen die Sphären chemische Features dar. Grün bedeutet ein Vorhandensein eines Wasserstoffbrückendonors, rot das eines –akzeptors, gelb zeigt einen hydrophoben Bereich an und ein blauer Ring ein aromatisches System. Vektorpfeile zeigen zusätzlich die Richtung eines Donors oder Akzeptors an.

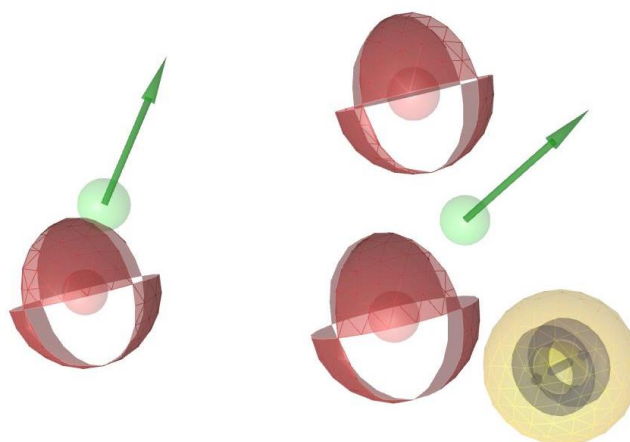


Abb. 49 Pharmakophor von Cluster 2

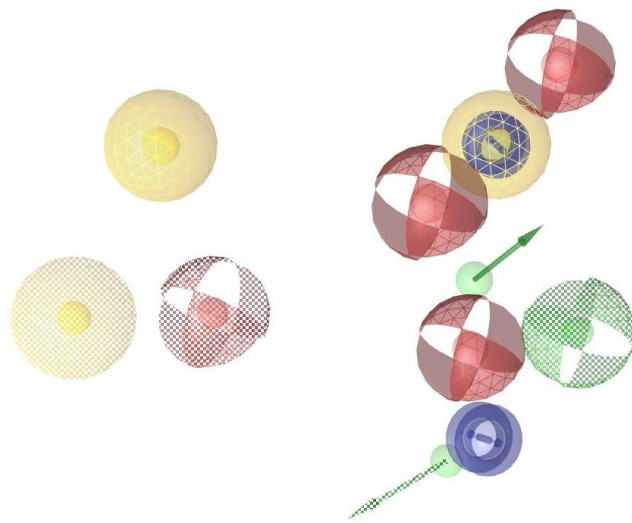


Abb. 50 Pharmacophor von Cluster 3

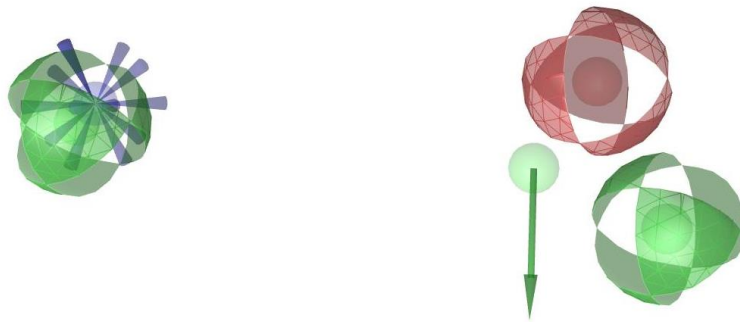


Abb. 51 Pharmacophor von Cluster 4

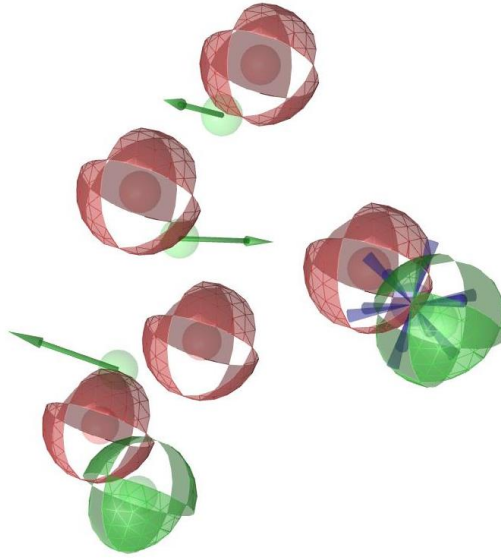


Abb. 52 Pharmakophor von Cluster 5

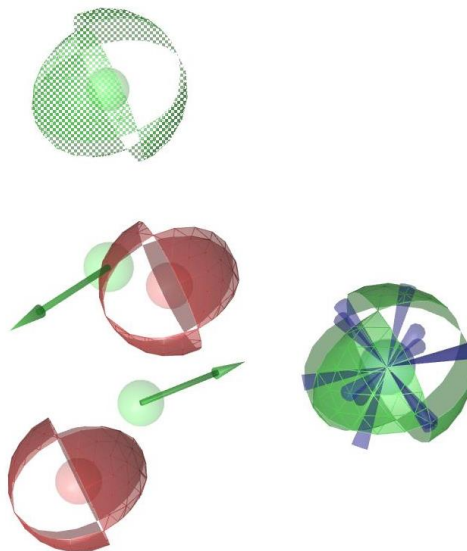


Abb. 53 Pharmakophor von Cluster 6

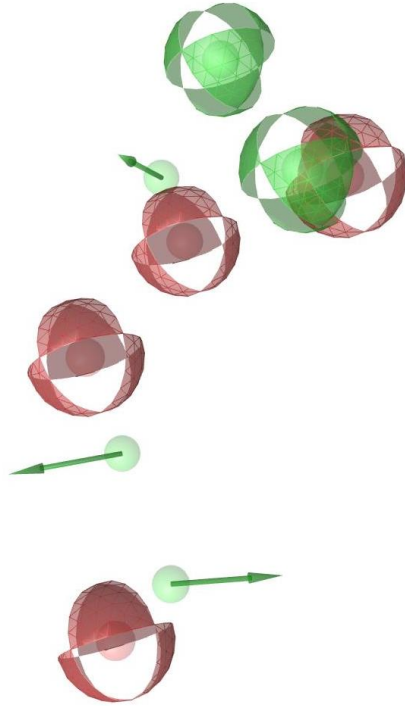


Abb. 54 Pharmakophor von Cluster 7

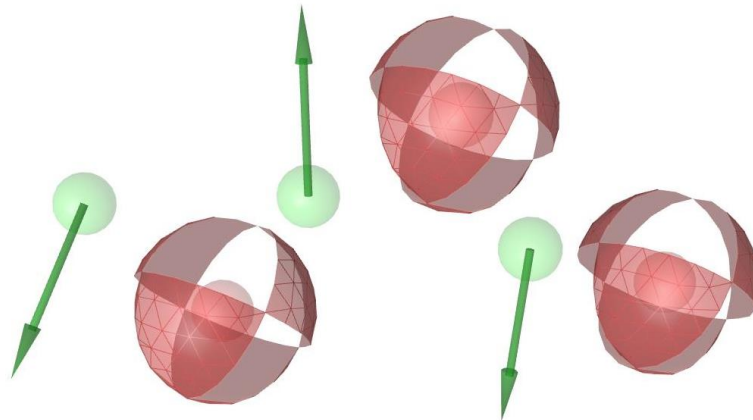


Abb. 55 Pharmakophor von Cluster 8

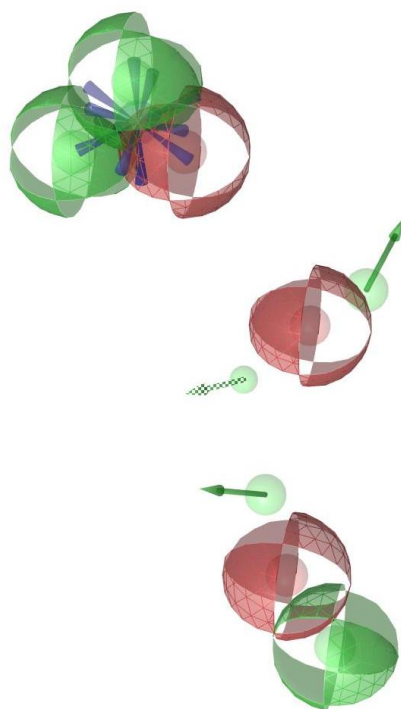


Abb. 56 Pharmakophor von Cluster 9

7.3.3 Antagonisten am MC1R und deren Pharmakophor

In Tabelle 13 werden die drei Verbindungen gezeigt, die für die Berechnung eines Pharmakophors von Antagonisten am MC1R verwendet wurden.

| Compound ID | Assay Description | Activity Operator | Activity Value | Activity Units | Molecular Weight | AlogP |
|--------------|---|-------------------|----------------|----------------|------------------|-------|
| CHEMBL373821 | Displacement of [125I]NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 1,3 | nM | 334,45 | 3,66 |
| CHEMBL218748 | Displacement of [125I]NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 2,2 | nM | 334,45 | 3,66 |
| CHEMBL435923 | Displacement of [125I]NDP-alpha-MSH from human MC1R expressed in HEK293 cells | = | 4 | nM | 387,52 | 4,41 |

Tab. 13 Liste von 3 Antagonisten am MC1R

Als Kennzeichen sind angegeben die ChEMBL-ID, eine Beschreibung des Assays aus der jeweiligen Publikation, mit dem die Moleküle getestet wurden, die IC50 in nM, das Molekulargewicht in g/mol und der logP.

Abbildung 57 zeigt die dreidimensionalen Darstellungen der Pharmakophors, der mit drei publizierten Antagonisten am MC1R berechnet wurde. Wie bereits in Abbildung 35 erwähnt, stellen die Sphären chemische Features dar. Grün bedeutet ein Vorhandensein eines Wasserstoffbrückendonors, rot das eines –akzeptors, gelb zeigt einen hydrophoben Bereich an und ein blauer Ring ein aromatisches System. Vektorpfeile zeigen zusätzlich die Richtung eines Donors oder Akzeptors an.

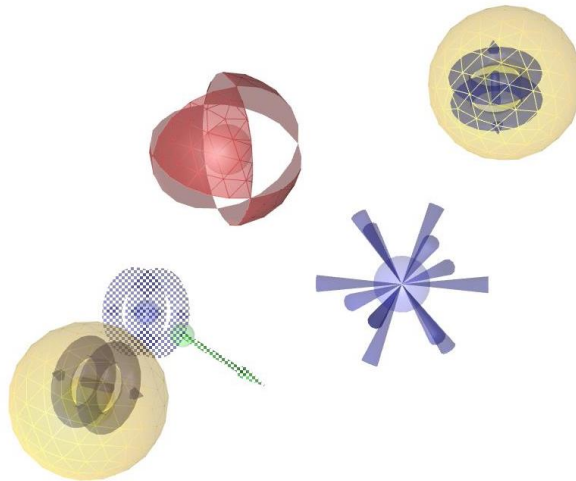


Abb. 57 Pharmakophor von drei Antagonisten am MC1R

7.3.4 Alignments der Cluster 2 bis 9 mit HFRW

In den Abbildungen 58 bis 65 sind die Alignments von HFRW und den Clustern 2 bis 9 dargestellt. Wie bei Abbildung 38 beschrieben, sind die chemischen Features analog zur dreidimensionalen Illustration ausgeführt. Rot bzw. die Bezeichnung „HBA“ bedeutet das Vorhandensein eines Wasserstoffbrückenakzeptors und grün bzw. „HBD“, das eines Wasserstoffbrückendonors. Vektorpfeile geben die Richtung der Donoren oder Akzeptoren an, eine schwarze Verstärkung des Pfeils gibt eine stärkere Interaktion an als die punktierte Darstellung. Mit gelb wird ein hydrophober Bereich angezeigt.

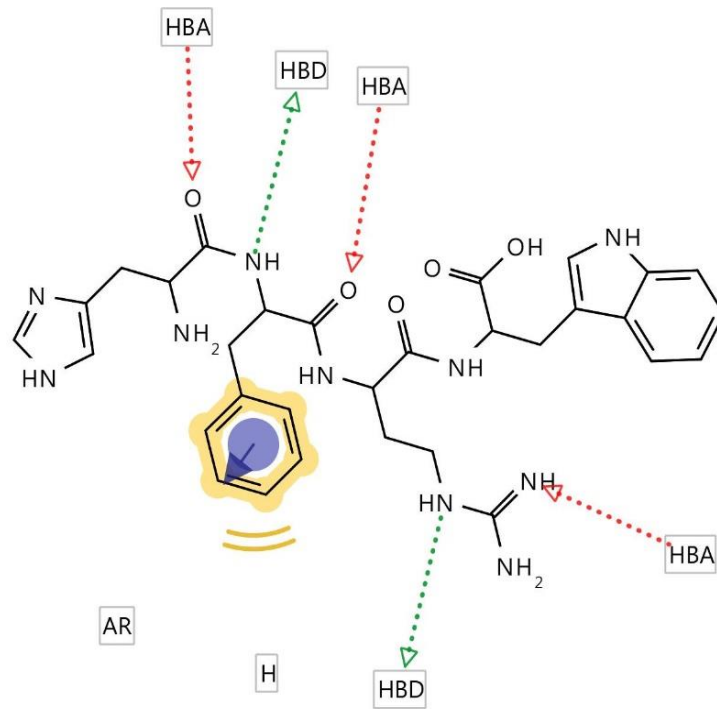


Abb. 58 Alignment von HFRW und Cluster 2

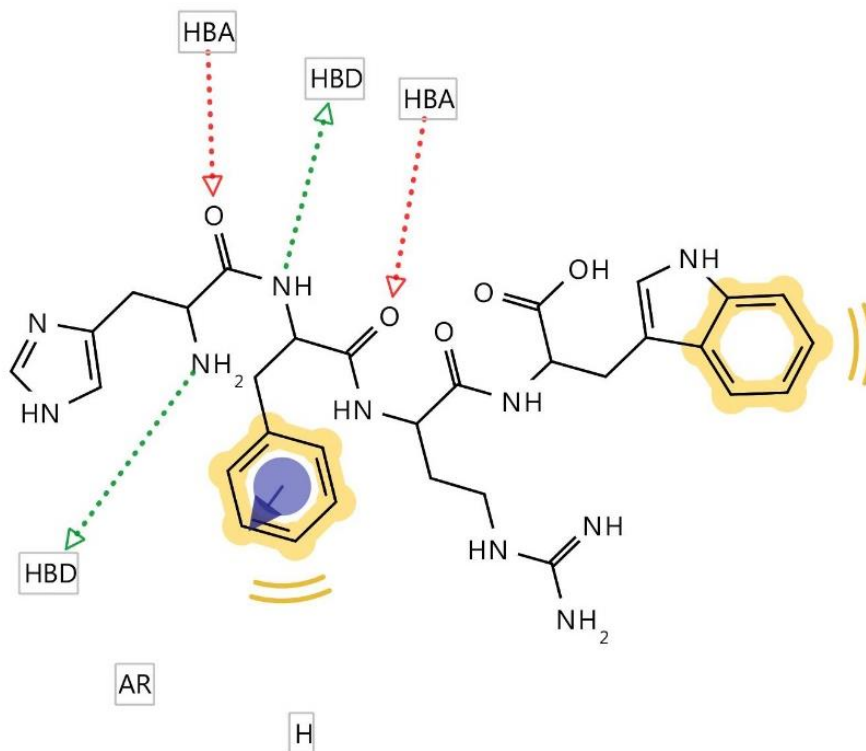


Abb. 59 Alignment von HFRW und Cluster 3

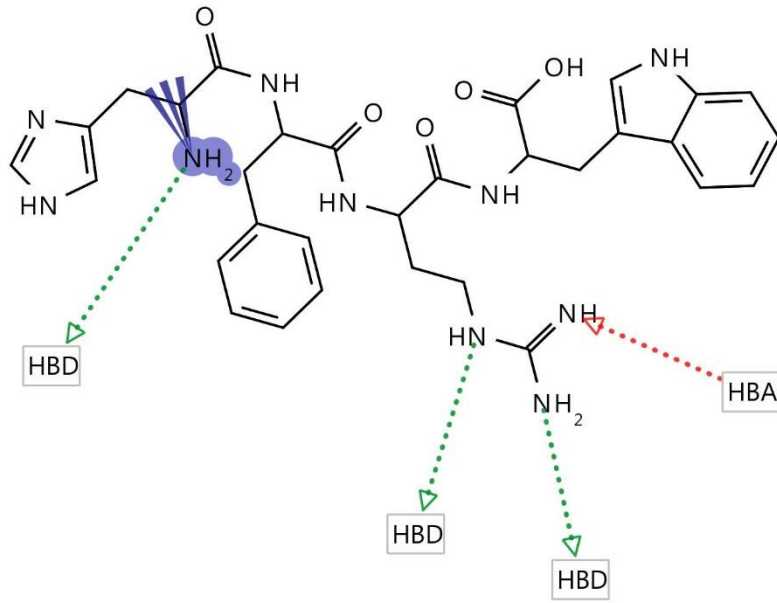


Abb. 60 Alignment von HFRW und Cluster 4

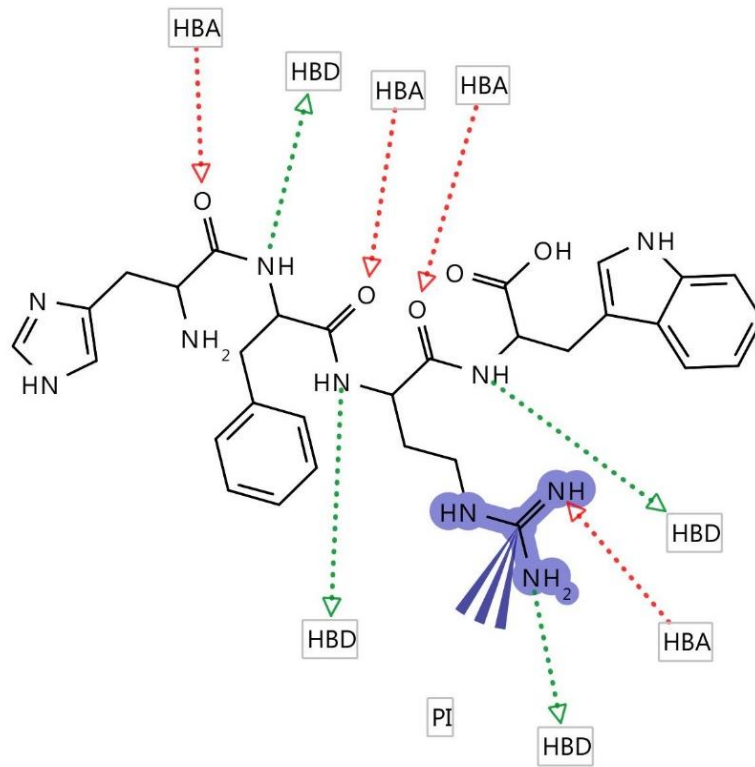


Abb. 61 Alignment von HFRW und Cluster 5

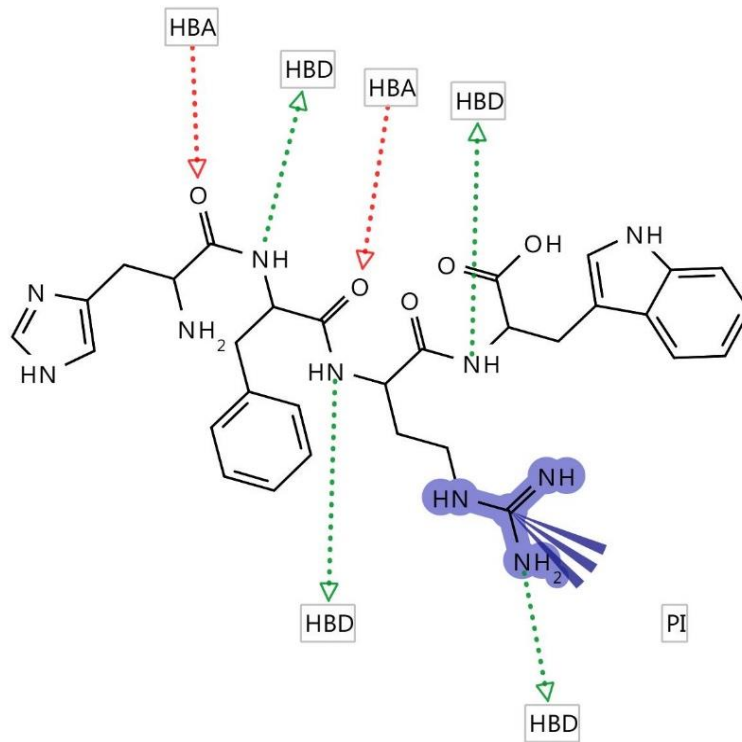


Abb. 62 Alignment von HFRW und Cluster 6

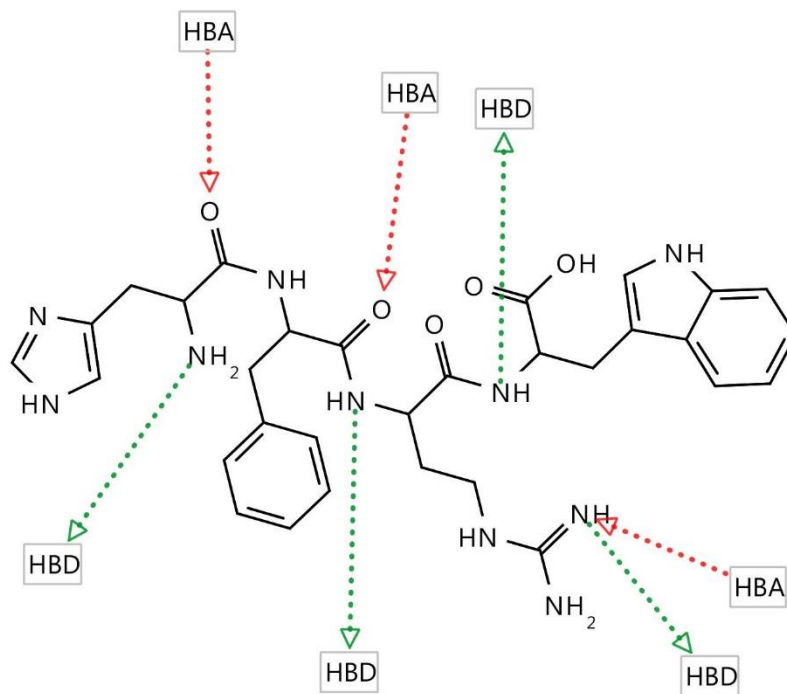


Abb. 63 Alignment von HFRW und Cluster 7

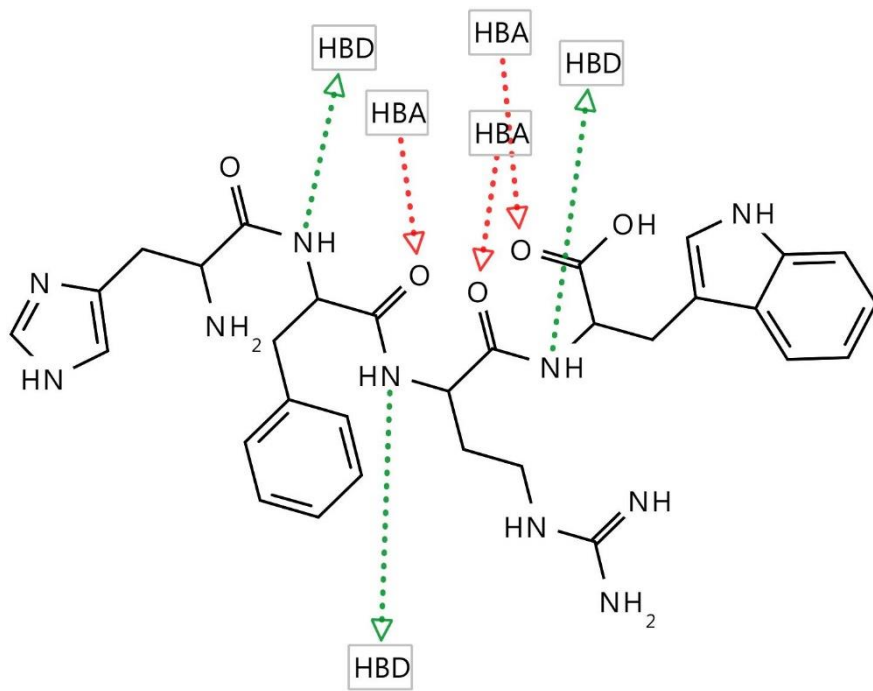


Abb. 64 Alignment von HFRW und Cluster 8

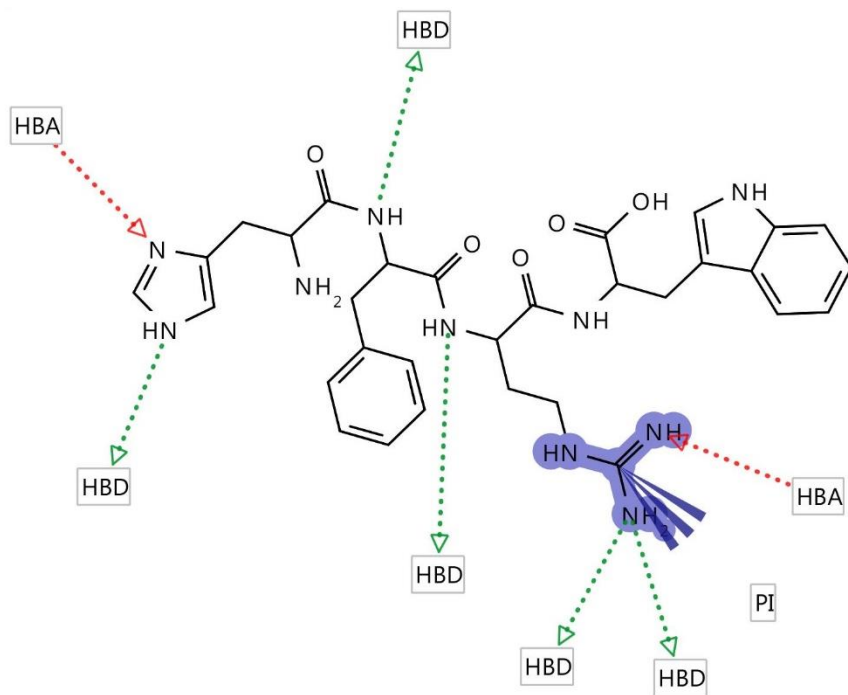


Abb. 65 Alignment von HFRW und Cluster 9

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| α -MSH | α -Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| β -MSH | β -Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| γ -MSH | γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonucleinsäure |
| CDCl ₃ | Deuteriochloroform |
| D ₂ O | deutერიertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| G _{sα} | α -Untereinheit eines G _s -Proteins |
| KNIME | Konstanz Information Miner |
| HFRW | Histidin-Phenylalanin-Arginin-Tryptophan (His-Phe-Arg-Trp) |
| HPLC | high pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) |
| MC1R | Melanocortin-1-Rezeptor |
| MC2R | Melanocortin-2-Rezeptor |
| MC3R | Melanocortin-3-Rezeptor |
| MC4R | Melanocortin-4-Rezeptor |
| MC5R | Melanocortin-5-Rezeptor |
| MHz | Megahertz |
| MS | Massenspektrometrie |
| n = | Anzahl an Experimenten |

| | |
|---------|---|
| NDP-MSH | [Nle ⁴ , D-Phe ⁷]- α -Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| NMR | nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz) |
| p = | Signifikanzwert |
| PBS | phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| rpm | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| Tab. | Tabelle |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| WHO | World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation) |

9 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| <i>Abb. 1 Aufbau der menschlichen Haut und ihrer drei Schichten</i> | 6 |
| <i>Abb. 2 Schematische Darstellung der Mechanismen, die zur Hautbräunung führen.</i> | 15 |
| <i>Abb. 3 Chemische Struktur von α-MSH</i> | 21 |
| <i>Abb. 4 Kalibrationsgerade für die Bestimmung der Harzbeladung anhand der Absorption einer Probe bei 301 nm</i> | 35 |
| <i>Abb. 5 Chromatogramm der Analyse von einem Tetrapeptid (HfRW) ohne Trifluoressigsäurezusatz in den Laufmitteln</i> | 38 |
| <i>Abb. 6 Chromatogramm der Analyse von einem Tetrapeptid (HfRW) mit Trifluoressigsäurezusatz in den Laufmitteln</i> | 39 |
| <i>Abb. 7 Tripeptidvorlage nach Herpin et al. 2002</i> | 49 |
| <i>Abb. 8 Mögliche Alkylierungsstellen am Histidin</i> | 50 |
| <i>Abb. 9 Syntheschema für die Generierung von O-Methyl- bzw. O-Ethyl-Boc-L-Tyrosin</i> | 51 |
| <i>Abb. 10 Geplanter Syntheseweg vom Bis-(2-chlorethyl)-amin zum geschützten Phenylpiperidinketonderivat</i> | 53 |
| <i>Abb. 11 Alternativer Syntheseweg von Phenylpiperidincarbonsäure zum geschützten Phenylpiperidinketonderivat</i> | 54 |
| <i>Abb. 12 Übersicht über die one-pot-Syntheseversuche</i> | 55 |
| <i>Abb. 13 Übersicht zu den zweistufigen Syntheseversuchen</i> | 58 |
| <i>Abb. 14 Syntheschema von Methode 8</i> | 60 |
| <i>Abb. 15 Syntheschema von Methode 9</i> | 60 |
| <i>Abb. 16 ¹H-NMR-Spektrum von (Tert-butyl)-4-[Methoxy(Methyl)carbamoyl]-4-Phenyl-Piperidinsäureamid</i> | 62 |
| <i>Abb. 17 ¹³C-NMR-Spektrum von (Tert-butyl)-4-[Methoxy(Methyl)carbamoyl]-4-Phenyl-Piperidinsäureamid</i> | 63 |
| <i>Abb. 18 Strukturen der als MC1R-Liganden publizierten Peptide</i> | 64 |
| <i>Abb. 19 Struktur des Tetrapeptids His-Phe-Arg-Trp (HFRW)</i> | 65 |
| <i>Abb. 20 Nachweis von MC1R mRNA in Melanomzellen</i> | 67 |
| <i>Abb. 21 Nachweis von MC2R mRNA in Melanomzellen</i> | 68 |
| <i>Abb. 22 Nachweis von MC3R mRNA in Melanomzellen</i> | 69 |
| <i>Abb. 23 Nachweis von MC4R mRNA in Melanomzellen</i> | 70 |
| <i>Abb. 24 Nachweis von MC5R mRNA in Melanomzellen</i> | 71 |
| <i>Abb. 25 Vergleich der basalen und durch NDP-MSH stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 73 |

| | |
|---|-----|
| <i>Abb. 26 Vergleich der durch Forskolin und NDP-MSH stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 74 |
| <i>Abb. 27 NDP-MSH stimuliert die cAMP Produktion in Gegenwart von Forskolin in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 76 |
| <i>Abb. 28 Dosis-Wirkungskurve der von NDP-MSH vermittelten cAMP-Stimulation in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 77 |
| <i>Abb. 29 Vergleich der durch Forskolin und drei synthetisierte Peptide (EEKE, EEDCK und EGGSVES) stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 78 |
| <i>Abb. 30 Vergleich der durch Forskolin und HFRW stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 79 |
| <i>Abb. 31 Strukturen der neu synthetisierten Peptide mit Variation an Position 2</i> | 81 |
| <i>Abb. 32 Vergleich der durch Forskolin und vier synthetisierte Peptide (HfRW, HFRW, HYRW, HyRW) stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 83 |
| <i>Abb. 33 Dosis-Wirkungskurve der von NDP-MSH bzw. HfRW vermittelten cAMP-Stimulation in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 84 |
| <i>Abb. 34 Strukturen der neu synthetisierten Peptide mit veränderten Aminosäuren an den Positionen 1, 3 und 4</i> | 86 |
| <i>Abb. 35 Vergleich der durch Forskolin und drei synthetisierten Peptiden (KfRW, HfKW, HfRY) stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 87 |
| <i>Abb. 36 Dreidimensionale graphische Darstellung des in silico generierten Pharmakophors von Liganden am MC1R</i> | 90 |
| <i>Abb. 37 Dreidimensionale graphische Darstellung des Alignments von HFRW und dem Pharmakophor von Cluster 1</i> | 91 |
| <i>Abb. 38 Zweidimensionale graphische Darstellung des Alignments von HFRW und dem Pharmakophor von Cluster 1</i> | 91 |
| <i>Abb. 39 Zweidimensionale Struktur von HFRW mit Kennzeichnung der möglichen Positionen für Modifikationen</i> | 93 |
| <i>Abb. 40 Strukturen der Peptide mit unnatürlichen Aminosäuren an Position 1</i> | 95 |
| <i>Abb. 41 Strukturen der Peptide mit unnatürlichen Aminosäuren an Position 3</i> | 96 |
| <i>Abb. 42 Strukturen der Peptide mit unnatürlichen Aminosäuren an Position 4</i> | 97 |
| <i>Abb. 43 Vergleich der durch Forskolin und sechs synthetisierten Peptiden stimulierten cAMP Synthese in humanen metastatischen A375 Melanomzellen</i> | 99 |
| <i>Abb. 44 Vergleich der Proliferation von humanen metastatischen A375 Melanomzellen nach der Inkubation mit 16 verschiedenen, synthetisierten Peptiden und NDP-MSH als Kontrolle über 48 Stunden</i> | 101 |

| | |
|---|------------|
| <i>Abb. 45 Kalibrationsgerade für die Bestimmung der Konzentration von HfRW in Methanol durch HPLC-Analyse.....</i> | <i>104</i> |
| <i>Abb. 46 Hornschichtprofil einer ausgewählten Tapestrippingstelle nach Inkubation mit HfRW.....</i> | <i>105</i> |
| <i>Abb. 47 Zeitabhängige Permeation von HfRW durch porcine Abdominalhaut.....</i> | <i>106</i> |
| <i>Abb. 48 Zeitabhängige Permeation von HfRW durch porcine Ohrhaut</i> | <i>107</i> |
| <i>Abb. 49 Pharmakophor von Cluster 2.....</i> | <i>165</i> |
| <i>Abb. 50 Pharmakophor von Cluster 3.....</i> | <i>166</i> |
| <i>Abb. 51 Pharmakophor von Cluster 4.....</i> | <i>166</i> |
| <i>Abb. 52 Pharmakophor von Cluster 5.....</i> | <i>167</i> |
| <i>Abb. 53 Pharmakophor von Cluster 6.....</i> | <i>167</i> |
| <i>Abb. 54 Pharmakophor von Cluster 7.....</i> | <i>168</i> |
| <i>Abb. 55 Pharmakophor von Cluster 8.....</i> | <i>168</i> |
| <i>Abb. 56 Pharmakophor von Cluster 9.....</i> | <i>169</i> |
| <i>Abb. 57 Pharmakophor von drei Antagonisten am MC1R</i> | <i>170</i> |
| <i>Abb. 58 Alignment von HFRW und Cluster 2</i> | <i>171</i> |
| <i>Abb. 59 Alignment von HFRW und Cluster 3</i> | <i>171</i> |
| <i>Abb. 60 Alignment von HFRW und Cluster 4</i> | <i>172</i> |
| <i>Abb. 61 Alignment von HFRW und Cluster 5</i> | <i>172</i> |
| <i>Abb. 62 Alignment von HFRW und Cluster 6</i> | <i>173</i> |
| <i>Abb. 63 Alignment von HFRW und Cluster 7</i> | <i>173</i> |
| <i>Abb. 64 Alignment von HFRW und Cluster 8</i> | <i>174</i> |
| <i>Abb. 65 Alignment von HFRW und Cluster 9</i> | <i>174</i> |

10 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| <i>Tab. 1 Übersicht über agonistisch am MC1R wirkende Substanzen, die bereits zugelassen sind bzw. klinische Studien durchlaufen haben</i> | 17 |
| <i>Tab. 2 Auflistung der vier HPLC-Anlagen, die für analytische und präparative Zwecke eingesetzt wurden</i> | 24 |
| <i>Tab. 3 Auflistung der verwendeten Testkits mit Angabe der Hersteller und des Verwendungszwecks</i> | 26 |
| <i>Tab. 4 DNA-Sequenzen der verwendeten Primer</i> | 26 |
| <i>Tab. 5 Auflistung der für biologische Testungen verwendeten Geräte inklusive Hersteller</i> | 28 |
| <i>Tab. 6 Übersicht zu den gemessenen NMR-Signalen nach den einzelnen Synthesversuchen</i> | 57 |
| <i>Tab. 7 Übersicht zu den gemessenen NMR-Signalen nach den beiden zweistufigen Synthesversuchen</i> | 59 |
| <i>Tab. 8 Übersicht zu den gemessenen NMR-Signalen in den Produkten der dreistufigen Synthesversuche</i> | 61 |
| <i>Tab. 9 Übersicht der Unterschiede der chemischen Verschiebungen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von vier Peptiden</i> | 82 |
| <i>Tab. 10 Übersicht zu den berechneten isoelektrischen Punkten von vier Peptiden</i> | 88 |
| <i>Tab. 11 Überblick der Alignments der neun Cluster mit HFRW</i> | 92 |
| <i>Tab. 12 Liste von 98 Agonisten am MC1R</i> | 165 |
| <i>Tab. 13 Liste von 3 Antagonisten am MC1R</i> | 169 |

11 Referenzen

- 1 Herpin, T. F. *et al.* Discovery of tyrosine-based potent and selective melanocortin-1 receptor small-molecule agonists with anti-inflammatory properties. *J Med Chem* **46**, 1123-1126, doi:10.1021/jm025600i (2003).
- 2 D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* **14**, 12222-12248, doi:10.3390/ijms140612222 (2013).
- 3 Menon, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev* **54 Suppl 1**, S3-17 (2002).
- 4 Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P. *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 5 edn, 890 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999).
- 5 Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C. & Wong, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol* **25**, 92-98, doi:10.1111/exd.12832 (2016).
- 6 Baroni, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* **30**, 257-262, doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007 (2012).
- 7 Lee, T. & Friedman, A. Skin Barrier Health: Regulation and Repair of the Stratum Corneum and the Role of Over-the-Counter Skin Care. *J Drugs Dermatol* **15**, 1047-1051 (2016).
- 8 Menon, G. K., Cleary, G. W. & Lane, M. E. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm* **435**, 3-9, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.005 (2012).
- 9 Maksimovic, S. *et al.* Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* **509**, 617-621, doi:10.1038/nature13250 (2014).
- 10 Girardeau, S., Mine, S., Pigeon, H. & Asselineau, D. The Caucasian and African skin types differ morphologically and functionally in their dermal component. *Exp Dermatol* **18**, 704-711, doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00843.x (2009).
- 11 Lai-cheong, J. E. & McGrath, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Abingdon. 1995, UK ed. Print)* **41**, 317-320, doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.017 (2013).
- 12 Arda, O., Goksugur, N. & Tuzun, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol* **32**, 3-13, doi:10.1016/j.clindermatol.2013.05.021 (2014).
- 13 Buffoli, B. *et al.* The human hair: from anatomy to physiology. *Int J Dermatol* **53**, 331-341, doi:10.1111/ijd.12362 (2014).
- 14 Saito, M., Ohyama, M. & Amagai, M. Exploring the biology of the nail: An intriguing but less-investigated skin appendage. *J Dermatol Sci* **79**, 187-193, doi:10.1016/j.jdermsci.2015.04.011 (2015).

- 15 Graubner, B. *ICD-10-GM 2018 Systematisches Verzeichnis Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme*. (Deutscher Ärzte-Verlag, 2017).
- 16 Amaro-Ortiz, A., Yan, B. & D'Orazio, J. A. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules* **19**, 6202-6219, doi:10.3390/molecules19056202 (2014).
- 17 Marrot, L. & Meunier, J. R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* **58**, S139-148, doi:10.1016/j.jaad.2007.12.007 (2008).
- 18 Brenner, M. & Hearing, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* **84**, 539-549, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x (2008).
- 19 Rogers, T. *et al.* Biologically distinct subsets of nevi. *G Ital Dermatol Venereol* **151**, 365-384 (2016).
- 20 Braun, R. P., Rabinovitz, H. S., Oliviero, M., Kopf, A. W. & Saurat, J. H. Dermoscopy of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol* **52**, 109-121, doi:10.1016/j.jaad.2001.11.001 (2005).
- 21 Strungs, I. Common and uncommon variants of melanocytic naevi. *Pathology* **36**, 396-403, doi:10.1080/00313020412331283888 (2004).
- 22 Haque, T., Rahman, K. M., Thurston, D. E., Hadgraft, J. & Lane, M. E. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *Eur J Pharm Sci* **77**, 279-289, doi:10.1016/j.ejps.2015.06.013 (2015).
- 23 Simoes, M. C., Sousa, J. J. & Pais, A. A. Skin cancer and new treatment perspectives: a review. *Cancer Lett* **357**, 8-42, doi:10.1016/j.canlet.2014.11.001 (2015).
- 24 Gordon, R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs* **29**, 160-169, doi:10.1016/j.soncn.2013.06.002 (2013).
- 25 Abdel-Malek, Z. A. *et al.* Melanoma prevention strategy based on using tetrapeptide alpha-MSH analogs that protect human melanocytes from UV-induced DNA damage and cytotoxicity. *FASEB J* **20**, 1561-1563, doi:10.1096/fj.05-5655fje (2006).
- 26 Coll, A. P. & Loraine Tung, Y. C. Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* **300**, 147-151, doi:10.1016/j.mce.2008.09.007 (2009).
- 27 Cai, M. & Hruby, V. J. Design of cyclized selective melanotropins. *Biopolymers* **106**, 876-883, doi:10.1002/bip.22976 (2016).
- 28 Garcia-Borron, J. C., Sanchez-Laorden, B. L. & Jimenez-Cervantes, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* **18**, 393-410, doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00278.x (2005).

- 29 Yang, Y. K. & Harmon, C. M. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. *Obes Rev* **4**, 239-248 (2003).
- 30 Nasti, T. H. & Timares, L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol* **91**, 188-200, doi:10.1111/php.12335 (2015).
- 31 Ringholm, A. *et al.* Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair. *J Invest Dermatol* **123**, 917-923, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23444.x (2004).
- 32 Hadley, M. E. & Dorr, R. T. Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization. *Peptides* **27**, 921-930, doi:10.1016/j.peptides.2005.01.029 (2006).
- 33 Hruby, V. J., Cai, M., Cain, J., Nyberg, J. & Trivedi, D. Design of novel melanocortin receptor ligands: multiple receptors, complex pharmacology, the challenge. *Eur J Pharmacol* **660**, 88-93, doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.109 (2011).
- 34 *European Medicines Agency: EMA/668463/2014 EPAR summary for the public - Scenesse*, <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002548/WC500182310.pdf> (2014).
- 35 Clayton, A. H. *et al.* Bremelanotide for female sexual dysfunctions in premenopausal women: a randomized, placebo-controlled dose-finding trial. *Womens Health (Lond)* **12**, 325-337, doi:10.2217/whe-2016-0018 (2016).
- 36 Doi, K. *et al.* AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney Int* **73**, 1266-1274, doi:10.1038/ki.2008.97 (2008).
- 37 Bento, A. P. *et al.* The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res* **42**, D1083-1090, doi:10.1093/nar/gkt1031 (2014).
- 38 Todorovic, A. *et al.* N-terminal fatty acylated His-dPhe-Arg-Trp-NH(2) tetrapeptides: influence of fatty acid chain length on potency and selectivity at the mouse melanocortin receptors and human melanocytes. *J Med Chem* **48**, 3328-3336, doi:10.1021/jm0490843 (2005).
- 39 Koikov, L. N., Ebetino, F. H., Solinsky, M. G., Cross-Doersen, D. & Knittel, J. J. Sub-nanomolar hMC1R agonists by end-capping of the melanocortin tetrapeptide His-D-Phe-Arg-Trp-NH(2). *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 2647-2650 (2003).
- 40 Zhou, Y. *et al.* Design of MC1R Selective gamma-MSH Analogues with Canonical Amino Acids Leads to Potency and Pigmentation. *J Med Chem* **60**, 9320-9329, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01295 (2017).

- 41 Barnettson, R. S. *et al.* [Nle⁴-D-Phe⁷]-alpha-melanocyte-stimulating hormone significantly increased pigmentation and decreased UV damage in fair-skinned Caucasian volunteers. *J Invest Dermatol* **126**, 1869-1878, doi:10.1038/sj.jid.5700317 (2006).
- 42 Subedi, R. K., Oh, S. Y., Chun, M. K. & Choi, H. K. Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch Pharm Res* **33**, 339-351, doi:10.1007/s12272-010-0301-7 (2010).
- 43 Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A. & Akomeah, F. K. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv* **13**, 175-187, doi:10.1080/10717540500455975 (2006).
- 44 Yang, R. *et al.* Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv Mater* **29**, doi:10.1002/adma.201606596 (2017).
- 45 Prausnitz, M. R., Mitragotri, S. & Langer, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 115-124, doi:10.1038/nrd1304 (2004).
- 46 Ravnbak, M. H. Objective determination of Fitzpatrick skin type. *Dan Med Bull* **57**, B4153 (2010).
- 47 Dydensborg, A. B., Herring, E., Auclair, J., Tremblay, E. & Beaulieu, J. F. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G1067-1074, doi:10.1152/ajpgi.00234.2005 (2006).
- 48 Klang, V., Hoppel, M. & Valenta, C. *Infrared Densitometry for In Vitro Tape Stripping: Quantification of Porcine Corneocytes.* (2017).
- 49 Chan, W. C. & White, P. D. *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach.* (Oxford University Press, 2000).
- 50 Schober, S. *Histidinderivate für die Synthese von Oligopeptiden.* (2016).
- 51 Jain, R. & Cohen, L. A. Regiospecific alkylation of histidine and histamine at N-1 (τ). *Tetrahedron* **52**, 5363-5370, doi:[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00187-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00187-1) (1996).
- 52 Beyerman, H. C., Maat, L. & Moerman, C. A. Resolution, optical rotatory dispersion, and absolute configuration of 1,3-bis(2-piperidyl)propan-2-one (anaferine). *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **90**, 1326-1330, doi:10.1002/recl.19710901207 (1971).
- 53 Han, K.-J. & Kim, M. *Direct Synthesis of Weinreb Amides from Carboxylic Acids Using Triphosgene.* Vol. 38 (2007).
- 54 Kim, J.-G. & Jang, D.-O. *A Convenient One-Pot Method for the Synthesis of N-Methoxy-N-methyl Amides from Carboxylic Acids.* Vol. 31 (2010).
- 55 Katritzky, A. R., Yang, H., Zhang, S. & Wang, M. An efficient conversion of carboxylic acids into Weinreb amides. *Arkivoc* **2002**, 39 - 44 (2002).

- 56 Braun, M. & Waldmüller, D. Simple Three-Step Synthesis of (R)- and (S)-4-Amino-3-hydroxybutanoic Acid (GABOB) by Stereoselective Aldol Addition. *Synthesis* **1989**, 856-858, doi:10.1055/s-1989-27410 (1989).
- 57 Nitz, T. J., Volkots, D. L., Aldous, D. J. & Oglesby, R. C. Regiospecific Synthesis of 3-Substituted 5-Alkylisoxazoles from Oxime Dianions and N-Methoxy-N-methylalkylamides. *Journal of Organic Chemistry* **59**, 5828 - 5832, doi:10.1021/jo00098a054 (1994).
- 58 De Luca, L., Giacomelli, G. & Taddei, M. An easy and convenient synthesis of Weinreb amides and hydroxamates. *J Org Chem* **66**, 2534-2537 (2001).
- 59 Niu, T. *et al.* One-Pot Transition-Metal-Free Synthesis of Weinreb Amides Directly from Carboxylic Acids. *Synthesis* **46**, 320-330, doi:10.1055/s-0033-1340317 (2014).
- 60 Stelten, J. *1H NMR Shift-Tabelle*, <http://www.ia.uni-bremen.de/nmr/Shifts/d_1hshift.html> (o.J.).
- 61 Stelten, J. *13C NMR Shift-Tabelle*, <http://www.ia.uni-bremen.de/nmr/Shifts/d_13cshiftges.html> (o.J.).
- 62 Castillo, A. M., Patiny, L. & Wist, J. Fast and accurate algorithm for the simulation of NMR spectra of large spin systems. *J Magn Reson* **209**, 123-130, doi:10.1016/j.jmr.2010.12.008 (2011).
- 63 Sureshbabu, V. V. & Hemantha, H. P. A facile synthesis of N-Fmoc protected amino/peptidyl Weinreb amides employing acid chlorides as key intermediates. *Arkivoc*, 243-249 (2008).
- 64 Katritzky, A. R., He, H. Y. & Suzuki, K. N-acylbenzotriazoles: Neutral acylating reagents for the preparation of primary, secondary, and tertiary amides. *Journal of Organic Chemistry* **65**, 8210-8213, doi:DOI 10.1021/jo000792f (2000).
- 65 Grzyb, J. A. *et al.* Carbamoylimidazolium and thiocarbamoylimidazolium salts: novel reagents for the synthesis of ureas, thioureas, carbamates, thiocarbamates and amides. *Tetrahedron* **61**, 7153-7175, doi:10.1016/j.tet.2005.05.056 (2005).
- 66 Pace, V., Castoldi, L., Alcantara, A. R. & Holzer, W. Highly efficient and environmentally benign preparation of Weinreb amides in the biphasic system 2-MeTHF/water. *RSC Advances* **3**, 10158-10162, doi:10.1039/C3RA41262H (2013).
- 67 Tang, H. C. & Chen, C. Y. Investigation of the novel lead of melanocortin 1 receptor for pigmentary disorders. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**, 254678, doi:10.1155/2014/254678 (2014).
- 68 Hunter, M. J. & Komives, E. A. Deprotection of S-acetamidomethyl cysteine-containing peptides by silver trifluoromethanesulfonate avoids the oxidation of methionines. *Anal Biochem* **228**, 173-177 (1995).

- 69 Harris, K. M., Flemer, S., Jr. & Hondal, R. J. Studies on deprotection of cysteine and selenocysteine side-chain protecting groups. *J Pept Sci* **13**, 81-93, doi:10.1002/psc.795 (2007).
- 70 Biosystems, A. Cleavage, Deprotection and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis. *Technical Bulletin*, 1-12 (1998).
- 71 Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134, doi:10.1186/1471-2105-13-134 (2012).
- 72 Rhead, B. *et al.* The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Res* **38**, D613-619, doi:10.1093/nar/gkp939 (2010).
- 73 Abdel-Malek, Z. A. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci* **58**, 434-441, doi:Doi 10.1007/Pl00000868 (2001).
- 74 Busca, R. & Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* **13**, 60-69 (2000).
- 75 Salomon, Y., Londos, C. & Rodbell, M. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* **58**, 541-548 (1974).
- 76 Salomon, Y. Cellular responsiveness to hormones and neurotransmitters: conversion of [3H]adenine to [3H]cAMP in cell monolayers, cell suspensions, and tissue slices. *Methods Enzymol* **195**, 22-28 (1991).
- 77 Szardenings, M., Muceniece, R., Mutule, I., Mutulis, F. & Wikberg, J. E. New highly specific agonistic peptides for human melanocortin MC(1) receptor. *Peptides* **21**, 239-243 (2000).
- 78 Ericson, M. D., Schnell, S. M., Freeman, K. T. & Haskell-Luevano, C. A fragment of the Escherichia coli ClpB heat-shock protein is a micromolar melanocortin 1 receptor agonist. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 5306-5308, doi:10.1016/j.bmcl.2015.09.046 (2015).
- 79 Sawyer, T. K. *et al.* 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5754-5758 (1980).
- 80 Masman, M. F. *et al.* Structure-antifungal activity relationship of His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ and analogues. *Bioorg Med Chem* **16**, 4347-4358, doi:10.1016/j.bmc.2008.02.072 (2008).
- 81 Lear, S. & Cobb, S. L. Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J Comput Aided Mol Des* **30**, 271-277, doi:10.1007/s10822-016-9902-7 (2016).
- 82 Berthold, M. R. *et al.* KNIME - the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond. *SIGKDD Explor. Newsl.* **11**, 26-31, doi:10.1145/1656274.1656280 (2009).

- 83 Klang, V., Schwarz, J. C., Hartl, A. & Valenta, C. Facilitating in vitro tape stripping: application of infrared densitometry for quantification of porcine stratum corneum proteins. *Skin Pharmacol Physiol* **24**, 256-268, doi:10.1159/000326072 (2011).
- 84 Lesniak, W. G. *et al.* Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. *Anal Biochem* **443**, 222-231, doi:10.1016/j.ab.2013.09.001 (2013).