

Spezifische Wechselwirkungen. Intermolekulare Kräfte, sterische Erfordernisse und Molekülgröße

Von Zeno Simon^[*]

Spezifische Wechselwirkungen oder Erkennungsprozesse haben in vielen Bereichen der Chemie und der Biologie große Bedeutung; Beispiele sind die Enzym-Substrat- und die Antigen-Antikörper-Reaktion. Um quantitative Aussagen zu erhalten, muß der Einfluß der sterischen Anpassung, der intermolekularen Kräfte und der Molekülgröße diskutiert werden. Die Überlegungen sollten insbesondere die Schaffung neuer Arzneimittel erleichtern.

1. Einführung

Mit dem Problem der Spezifität ist wahrscheinlich zuerst der Analytiker konfrontiert worden, der ein Reagens für die Fällung eines bestimmten Kations aus einer Mischung suchte. Für den Biochemiker und besonders für den medizinischen Chemiker wurde die Spezifität seit *Emil Fischers*^[1] „Schlüssel-Schloß“-Theorie der Enzym-Substrat-Wechselwirkung, *Paul Ehrlichs* Suche nach „magischen Kugeln“, mit denen man Bakterien töten kann, ohne den Organismus zu schädigen, und der Untersuchung von Immunreaktionen^[2] zu einem alltäglichen Problem.

Das Problem der Spezifität oder Wiedererkennung ergibt sich aus der Tatsache, daß ein Molekül A_0 – es sei im Folgenden „Erkenner“ genannt – sich nur mit einem bestimmten molekularen „Effektor“ B_0 vereinigt oder nur diesen ausfällt, und zwar auch in Gegenwart einer bisweilen sehr großen Zahl N von möglichen Effektoren B_i . Beispielsweise erkennt ein Antikörper normalerweise nur die determinanten Gruppen des Antigens, das seine Bildung hervorgerufen hat, nicht aber die antigenen Determinanten der körpereigenen Proteine. Ebenso katalysiert ein Enzym auch bei Anwesenheit mehrerer ähnlicher Moleküle nur die Reaktion eines bestimmten Moleküls, nämlich seines Substrats.

Aus solchen spezifischen Wechselwirkungen ist auf eine hohe Affinität von A_0 zu B_0 zu schließen, während die Affinität zu den falschen Partnern B_i genügend herabgesetzt sein muß. Diese Vorstellung lag den ersten Versuchen zugrunde, spezifische Reagentien zu erhalten. Bereits 1907 beschrieb *Arrhenius* Immunreaktionen als chemische Gleichgewichte^[3]. Danach wurden die Voraussetzungen für die sterische Anpassung und die Art der beteiligten Kräfte systematisch untersucht, und zwar überwiegend von Chemikern, die sich mit Immunreaktionen (vgl. z. B. ^[4]) und mit Katalysatoren^[5] beschäftigten. Viele Experimente wurden darüber hinaus auf den Gebieten Medizinische Chemie, Enzymologie und Analytische Chemie durchgeführt. Einige Ergebnisse dieser Arbeiten sind Chemotherapeutika, Katalysatoren für industrielle Anwendungen und Komplexbildner für analytische Zwecke.

Die Zusammenhänge zwischen Molekülgröße und Spezifität sind in diesen Arbeiten vielleicht weniger klar erkannt worden. Die ältesten analytischen Reagentien – das Sulfid-Ion (S^{2-}) und das Carbonat-Ion (CO_3^{2-}) – haben niedrige Molekulargewichte und bilden Niederschläge mit etwa der Hälfte der einigen Hundert bekannten Kationen; zur Abtrennung eines

bestimmten Kations sind mehrere aufeinanderfolgende Trennschritte erforderlich. Äthylendiamintetraessigsäure, *Paul Ehrlichs* Salvarsan und die Sulfonamide haben Molekulargewichte von einigen Hundert. Antibiotica erreichen Molekulargewichte von etwa 1000, während Repressoren wie der Lac-Repressor, der sich spezifisch an eine bestimmte Nucleotid-Sequenz im *E.-coli*-Genom anlagert^[6], Proteine mit hohem Molekulargewicht sind (s. dazu Abb. 1).

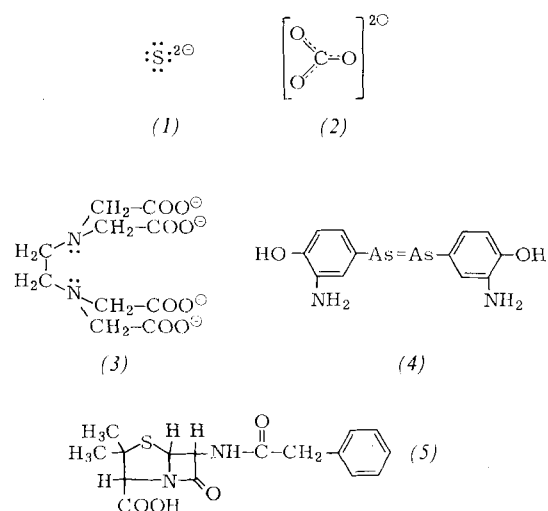


Abb. 1. Ionen und Moleküle verschiedener Größe und Spezifität: Sulfid-Ion (1), Carbonat-Ion (2), Äthylendiamintetraacetat-Ion (3), Salvarsan (4), Penicillin G (5).

Es wurde erst in den letzten Jahren versucht, die spezifischen Wechselwirkungen quantitativ zu erfassen, d. h. die Spezifität mit Affinitätsunterschieden und dem Molekulargewicht zu korrelieren. So brachten *Volkenshtein* und *Eliashevich*^[7] die Wahrscheinlichkeit des Einbaus falscher Basen bei der DNA-Replikation und -Transkription mit Affinitätsunterschieden in Verbindung. Beziehungen zwischen der Spezifität und dem Molekulargewicht wurden von *Thomas*^[8a] sowie von *Conaughy* und *McCarthy*^[8b] im Zusammenhang mit Konkurrenzversuchen bei der DNA-RNA-Hybridisierung diskutiert, und wir konnten die Spezifität von Wechselwirkungen zwischen biologischen Makromolekülen quantitativ charakterisieren^[9].

Hier wird versucht, einen allgemeinen Überblick über das Problem der spezifischen Wechselwirkung zu geben. Es sollen quantitative Angaben zur Spezifität sowie die Beziehung zwischen Spezifität einerseits und strukturellen Erfordernissen und Molekulargewicht andererseits erörtert werden. Darüber hinaus werden Zusammenhänge überprüft, die sich bei einigen chemischen und molekularbiologischen Prozessen ergeben ha-

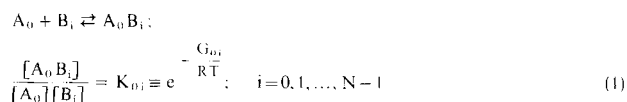
[*] Prof. Dr. Z. Simon
Catedra Chimie, Universitatea Timişoara
Bd. V. Părvan 4, Timişoara 5 (Rumänien)

ben. Außerdem wird die Möglichkeit diskutiert, die Struktur von Verbindungen mit bestimmter biologischer Wirkung vorherzusagen.

2. Quantitative Angaben zur Spezifität der Wechselwirkungen

An einen Erkennungsprozeß werden folgende Anforderungen gestellt^[9a, 9b]: Der „Erkenner“ A_0 muß imstande sein, in Gegenwart von N Molekülararten B_0, B_1, \dots, B_{N-1} , die in verschiedenen Konzentrationen vorliegen, nur mit einer bestimmten Molekülarart, nämlich dem „richtigen“ Effektor B_0 , einen Komplex zu bilden oder diesen auszufällen. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Erkennung soll einen Schwellenwert p_f nicht überschreiten. Die Zahl N von möglichen Effektoren, unter denen A_0 den richtigen erkennt, und die Wahrscheinlichkeit p_f einer falschen Erkennung bestimmen die Spezifität des Erkennungsprozesses.

Angenommen, das „Erkennen“ bestehe in der Bildung eines 1:1-Komplexes aus A_0 und B_0 durch eine einfache chemische Gleichgewichtsreaktion. Das kann der Fall sein bei kationenbindenden Substanzen wie Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder bei enzymatischen Reaktionen, bei denen ein aktivierter Komplex aus Enzym (A_0) und Substrat (B_0) entsteht (im Sinn der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit). Die Reaktionen und Gleichgewichte sind in diesem Fall



Die Wahrscheinlichkeit p_f einer falschen Erkennung wird durch den Quotienten

$$p_f = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} [A_0 B_i]}{[A_0 B_0] + \sum_{i=1}^{N-1} [A_0 B_i]} = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} [B_i] K_{0i}}{[B_0] K_{00} + \sum_{i=1}^{N-1} [B_i] K_{0i}} \quad (2)$$

wiedergegeben. Wenn die Konzentrationen aller Moleküle B_i wesentlich höher sind als die des Erkenners A_0 , können die in den $A_0 B_i$ -Komplexen gebundenen Mengen an B_i vernachlässigt werden, und zwar auch B_0 , und die B_i -Konzentrationen in Gl. (2) stimmen praktisch mit der B_i -Gesamtkonzentration überein. Die Spezifität des Erkennungsprozesses ist umso größer, je größer die Quotienten K_{00}/K_{0i} aus den Bindungskonstanten für die richtigen bzw. falschen Partner sind, d. h. je größer der Unterschied

$$\Delta G_i \equiv G_{0i} - G_{00} \quad (3)$$

zwischen der Affinität $-G_{00}$ von A_0 zum richtigen Partner B_0 und den Affinitäten $-G_{0i}$ zu den falschen Partnern ist. Die Genauigkeit eines solchen Erkennungsprozesses nimmt normalerweise ab, d. h., p_f steigt, wenn die Gesamtmenge an B_i (und speziell B_0) vergleichbar mit der Menge des Erkenners A_0 oder geringer als diese ist^[10]. Im Extremfall, wenn die Menge an A_0 größer ist als alle B_i -Mengen zusammen und wenn alle Bindungskonstanten K_{0i} groß genug sind, liegen praktisch die gesamten B_i -Mengen als $A_0 B_i$ -Komplexe vor,

und die Fehlerwahrscheinlichkeit p_f erreicht einen Wert von nahezu 1.

Wechselwirkungen zwischen A_0 und B_i können auch kooperativen Charakter haben. Im Extremfall wird A_0 ausschließlich durch B_0 ausgefällt. Dieser ist z. B. beim Ausfällen eines Kations mit einem spezifischen Reagens oder bei der Antigen-Antikörper-Präzipitation realisiert. Im einfachen Fall einer 1:1-Stöchiometrie gilt für die Löslichkeitsprodukte L , die für ein richtiges Erkennen erforderlich sind:

$$[A_0][B_0] \geq L_{00} \equiv e^{\frac{G_{00}}{RT}} \quad (4a)$$

$$[A_0][B_i] < L_{0i} \equiv e^{\frac{G_{0i}}{RT}}; \quad i = 1, 2, \dots, N-1 \quad (4b)$$

Läßt man außer acht, daß eine Mitfällung auftreten kann, so ist die Fehlerwahrscheinlichkeit p_f in diesem Fall Null. Sicherlich können sich auch $A_0 B_i$ -Komplexe mit komplizierten stöchiometrischen Verhältnissen bilden, doch ist es unwahrscheinlich, daß sich dadurch etwas Wesentliches an den Ergebnissen von Gl. (2) und (4) ändert.

Für ein hochspezifisches Erkennen ist es also erforderlich, daß einerseits der Unterschied ΔG_i zwischen der Affinität G_{00} von A_0 zum richtigen Effektor B_0 und der Affinität G_{0i} zu den falschen Effektoren groß genug ist und andererseits der Überschuß von B_0 über A_0 ausreicht. Der Erkenner A_0 muß fähig sein, aufgrund genügend großer Affinitätsdifferenzen ΔG_i einen, nämlich B_0 , aus insgesamt N anderen Effektoren B_i herauszufinden. Geringe Strukturunterschiede in den B_i -Regionen, die mit A_0 in Kontakt kommen, führen in den meisten Fällen nur zu geringen Affinitätsunterschieden ΔG_i . Deshalb müssen die Kontaktflächen zwischen A_0 und den Effektoren B_i so groß sein, daß sich im Falle der N falschen Effektoren B_i ausreichende Affinitätsunterschiede ΔG_i einstellen können. Diese Kontaktregionen auf A_0 und B_i sollen als „Erkennungsregionen“ bezeichnet werden. Man kann nun verstehen, warum eine hohe Spezifität – d. h. hohe Werte für N und ΔG_i (eventuell infolge ungünstiger B_i -Konzentrationen) und kleiner p_f -Wert – große Erkennungsregionen erfordern. Wenn sich die Erkennungsregion von A_0 bei den Wechselwirkungen mit den Molekülen B_i nicht verändern soll, muß im Molekül A_0 ein zusätzliches Teilstück vorhanden sein, welches die Erkennungsregion stabilisiert. Das Molekül A_0 darf dann also nicht nur aus seiner Erkennungsregion bestehen.

Die obigen Ausführungen betreffen Selektions- (Erkennungs-)prozesse, die in einem Schritt ablaufen. Wenn die Selektivität (Spezifität) des Erkenners gering ist, kann eine Komponente B_0 aus der Mischung (B_0, B_1, \dots, B_N) durch mehrere Selektionsschritte mit verschiedenen Selektions- (Erkennungs-)mitteln abgetrennt werden. Auf diese Weise wird die Erzanalyse nach den Methoden der klassischen analytischen Chemie ausgeführt. Scherer^[11] schlug einen ähnlichen Weg – die „Kaskadenregulation“ – für die Zellregulation vor: Zur Beschränkung der Proteinsynthese in der Zelle auf die von wenigen Genen codierten Proteine (z. B. Hämoglobin in den Erythrocyten) eignen sich 1. eine Beschränkung der Transkription durch Repressoren, 2. eine Hemmung des Durchganges der Messenger-RNA durch die Kernmembran und 3. die Auswahl einiger der im Cytoplasma vorliegenden Messenger-RNAs durch die Ribosomen.

3. Struktur und Wechselwirkungsaffinität

Nach der „Schlüssel-Schloß“-Theorie sollte eine hohe Wechselwirkungsaffinität ($-G_{00}$) sowohl eine sterische Komplementarität zwischen einem Teil der Erkenners (Schloß, A_0) und des erkannten Moleküls (Schlüssel, B_0) erfordern als auch eine Komplementarität der intermolekularen Kräfte zwischen den Atomen von A_0 und B_0 , die direkt miteinander in Kontakt kommen. Wenn das Erkennen nicht nur Komplexbildung, sondern auch Reaktion (Katalyse, enzymatische Reaktionen) bedeutet, d. h. G_{00} die freie Enthalpie der geringsten Aktivierung ist, sollte die Neigung von B_0 zu reagieren, d. h. seine Reaktivität, ebenfalls ein entscheidender Faktor sein. Welche Bedeutung besitzen Reaktivität, sterische Komplementarität und Komplementarität der intermolekularen Kräfte, und wie kann man diese drei Faktoren charakterisieren?

Für die Katalyse anorganischer Reaktionen ist die Reaktivität der bestimmende Faktor. Der Erkennen ist der Katalysator - ein Ion - oder bei der heterogenen Katalyse eine Gruppe von Atomen an der Oberfläche des Mikrokristalls, der nicht größer als die Elementarzelle ist^[15]. Die Ausfällung von Ionen und die Komplexbildung^[11, 21] erfordern starre Erkennungsregionen, die Verteilung zwischen Lösungsmitteln^[13] hingegen flexible Anordnungen. Aber auch hier sind die beteiligten Bereiche und Moleküle klein. Man sollte in solchen Fällen keine übermäßig große Spezifität erwarten.

Wir wollen uns hauptsächlich mit Wechselwirkungen an natürlichen Makromolekülen beschäftigen, bei denen die interessantesten Spezifitätsprobleme auftreten. Der Schlüssel-Schloß-Effekt hat auf diesem Gebiet große Bedeutung. Die großen und verhältnismäßig starren Hohlräume der Makromoleküle erfordern das Zusammenwirken mehrerer Komplementaritätseffekte.

3.1. Reaktionsparameter

Zusammenhänge zwischen den Reaktionsparametern von Substratmolekülen (B_i) und den Geschwindigkeiten enzymatischer Reaktionen werden seit Anfang der fünfziger Jahre mit der HMO-Methode untersucht^[14, 15]. Cammarata^[16] setzte die Wirkung von Arzneimitteln mit Hilfe einer Störungstheorie in Beziehung zu den Reaktionsparametern und besonders zur Elektronenverteilung an bestimmten Atomen. Diese Theorie geht davon aus, daß die Bildung eines Arzneimittel-Rezeptor-Komplexes der bestimmende Schritt bei der biologischen Reaktion auf das Arzneimittel ist. Die biologische Aktivität, ausgedrückt durch den Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante ($\lg k$) oder der Konzentration, welche die Hälfte der maximalen biologischen Wirkung hervorruft, steht über lineare oder quadratische Gleichungen in guter Korrelation ($r > 0.95$) mit Parametern wie der Verteilung der π -Elektronen oder der Elektronen aller Art auf bestimmte Atome (q_i). Die Beziehung gilt jedoch nur für Reihen von Molekülen, die in sterischer und allgemeiner chemischer Hinsicht nicht zu verschieden sind. Ein typisches Beispiel ist die Geschwindigkeit ($\lg V$) der Phosphorylierung von 15 substituierten Purinnucleosiden durch Adenosin-Kinase. Diese entspricht recht gut ($r = 0.9$) der Elektronendichte f_3 an N^3 der Basen, die sich nach der halbempirischen SCF-MO-Methode von Pariser und Parr errechnen läßt. Die von Kaneti aufgestellte Korrelationsgleichung lautet^[17]:

$$\lg V = -23.9 f_3 + 2.1; \text{ für Adenosin: } V = 1$$

(5)

Diese 15 Purinnucleoside sind in Position 1, 2 und 6 substituiert, oder einige CH-Gruppen des Ringes sind durch N-Atome ersetzt. Die Korrelation $\lg V - f_3$ entfällt, wenn Veränderungen am Zucker vorgenommen werden (die f_3 nicht beeinflussen). So werden Adenylarabinsid oder 2'-Desoxyadenosin sehr langsam phosphoryliert ($V = 0.0-0.09$), ebenso wie Adenosin-Derivate mit großen Substituenten an C-2 ($V = 0.0$ für CH_3 , CH_3O , $(\text{CH}_3)_2\text{N}$, Cl , Br ; die Korrelation gilt jedoch für F und NH_2). Das ist im Einklang mit der Annahme, daß das N^3 des Purins bei der Bindung der Riboside an die Adenosin-Kinase durch Chelatbildung mitwirkt^[17].

3.2. Sterische Anpassung

Welche Bedeutung bei Enzymreaktionen die sterische Anpassung im Vergleich zur chemischen Natur der umgesetzten Gruppen hat, ergibt sich aus der Tatsache, daß auch Reaktionen ähnlicher Substrate mit derselben Chiralität katalysiert werden, wenn auch mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Hingegen reagieren die Enantiomeren normalerweise überhaupt nicht, auch nicht das Enantiomere des aktivsten Substrats. Die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung hängt nach Sela, wenn es sich bei den Antigenen um Polypeptide handelt, vermutlich stärker von der Konformation als von der Sequenz der Polypeptide ab^[18].

Es liegt nahe zu versuchen, die sterische Anpassung durch die chemischen Konstanten E_s von Taft^[19] zu charakterisieren; sie spiegeln aber bei einer niedermolekularen Reaktion nur einen allgemeinen Abschirm-Effekt eines Reaktionszentrums durch Substituenten wider. Ein Versuch von Dupaix, Bechet und Roucoux^[20], die Geschwindigkeiten der Chymotrypsin-katalysierten Hydrolyse von acylsubstituierten *p*-Nitrophenyl-aminosäureestern miteinander in Beziehung zu setzen, gelang nur bei 9 der 42 untersuchten Verbindungen.

Um Unterschiede bei der sterischen Anpassung mit der Verringerung der Bindungsaffinität in Beziehung zu bringen, benötigt man ein Maß für die sterischen Unterschiede. Dafür scheint bislang keine gut begründete Methode zu existieren. Man könnte so vorgehen wie Rao und Rossmann^[21] beim Vergleich der Suprasekundärstrukturen von Proteinen: Die beiden ähnlichen Strukturen werden nach einer geometrischen Technik so überlagert, daß die Summe der Quadrate der Abstände zwischen allen für äquivalent gehaltenen Atomen möglichst klein ist. Diese Summe ist das Maß für die sterische Unterschiedlichkeit.

Direkter, allerdings stärker approximativ ist die Methode der geringsten sterischen Unterschiede (*minimal steric differences*, MSD) zwischen zwei Molekülen von Simon und Szabadai^[22]. Diese Methode besteht darin, die beiden Moleküle innerhalb des Spielraums, den Bindungslängen, Bindungswinkel und freie Rotation erlauben (Variationsbreite: $\approx 0.2 \text{ \AA}$ für Bindungslängen, $\approx 20^\circ$ für Bindungswinkel), aufeinanderzulegen und die Atome der 2. Periode des Periodensystems zu zählen, die sich nicht decken. (Wasserstoffatome werden dabei vernachlässigt.) Es wurde versucht, die MSD-Werte sowohl mit der Geschwindigkeit der Hydrolyse von *N*-Acetyl-aminosäuremethylestern mit Chymotrypsin (Daten von Knowles^[23]) als auch mit der Verringerung der biologischen Aktivität infolge des Aminosäureaustauschs in Oligopeptiden mit Hormonwir-

kung (Daten aus ^[22]; 92 Beispiele) in Verbindung zu bringen. Zur Berechnung der MSD-Werte diente im ersten Fall das hypothetische Standardmolekül (6) (Abb. 2). Eine zufriedenstellende Beziehung ($r=0.93$) wurde für die Geschwindigkeit der Hydrolyse mit α -Chymotrypsin erhalten, für die sich mit Hilfe der Tanford-Hydrophobizitäten (HP)^[24] der Aminosäure-Seitenketten R ebenfalls eine Korrelation aufstellen läßt ($r=0.80$, vgl. Tabelle 1). Die besten Gleichungen für die Wechselbeziehungen sind

$$\lg V = 0.70 \text{ MSD} + 2.10; \quad s = 0.82, \quad r = 0.93, \quad n = 14 \quad [*] \quad (6a)$$

$$\lg V = 1.57 \text{ HP} - 6.3; \quad s = 1.35, \quad r = 0.80, \quad n = 14 \quad (6b)$$

Für 92 substituierte Oligopeptide ergab die Korrelation von biologischer Aktivität und MSD (bezogen auf das unveränder-

Tabelle 1. Kinetische Parameter für die Hydrolyse von *N*-Acetyl-aminosäure-methylestern mit α -Chymotrypsin. V = Geschwindigkeit der Reaktion 2. Ordnung bei niedriger Substratkonzentration; MSD = geringster sterischer Unterschied; HP = Tanford-Hydrophobizität (ΔG_i für den Übergang einer Aminosäure-Seitenkette von Wasser in Octanol). Erläuterungen s. Text.

H ₂ NCHRCOOH in AcNHCHRCOOCH ₃	lg V	MSD	HP [kcal]
Trp	0.00	3	3.00
Tyr	-0.07	3	2.97
Cyclohexyl-Ala	-0.71	4	4.0
Phe	-1.00	4	2.65
α -NH ₂ -Heptansäure	-1.71	6	3.1
Met	-2.25	7.5	1.3
α -NH ₂ -Octansäure	-2.28	5	3.8
Leu	-2.43	7	2.49
Nor-Lcu	-2.50	7	2.5
Nor-Val	-3.21	8	1.7
α -NH ₂ -Buttersäure	-4.35	9	1.1
Ala	-5.35	10	0.73
Val	-5.50	10	1.69
Gly	-8.65	11	0

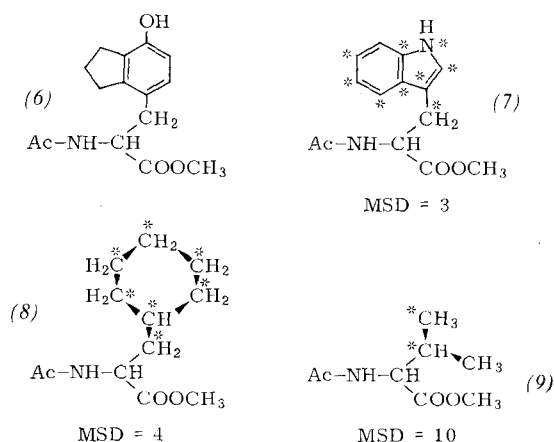
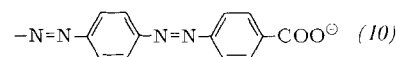


Abb. 2. „Standard“ für die Beziehungen zwischen der Geschwindigkeit der α -Chymotrypsin-Hydrolyse von *N*-Acetyl-aminosäure-methylestern und sterischen Unterschieden (MSD) dieser Moleküle sowie Beispiele für MSD-Berechnungen. Hypothetisches Standardmolekül (6). Tryptophan-Seitenkette (7), MSD=3. Der Unterschied zwischen übereinanderliegenden fünf- und sechsgliedrigen Ringen wird mit 1 angenommen. Die OH-Gruppe des Standards deckt sich mit keiner Gruppe der Tryptophan-Seitenkette. Cyclohexylalanin-Seitenkette (8); MSD=4. Es handelt sich um die drei CH₂-Gruppen des fünfgliedrigen Ringes und die OH-Gruppe des Standards. Valin-Seitenkette (9); MSD=10. Nur zwei Atome decken sich mit dem Standard. Von den mit einem Sternchen (*) markierten Atomen in (7), (8) und (9) wird angenommen, daß sie sich mit Atomen oder Gruppen des Standards (6) decken.

[*] s = Standardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, n = Anzahl der Derivate.

te Oligopeptid) $r=0.55$. Es läßt sich eine mittlere Affinitätsabnahme von etwa 0.5 kcal pro Atom der 2. Periode des Periodensystems erkennen^[22].

An dem recht spärlichen Erfolg, der mit der Beziehung zwischen biologischer Aktivität und MSD erzielt wurde, zeigt sich, daß sterische Anpassung (Komplementarität) allein nicht für eine hohe Wechselwirkungsaffinität ausreicht. Auch tritt nicht das ganze biologisch aktive Molekül in das „Schloß“ ein: Die Affinität des Antikörpers, der auf protein-gebundenes *p*-(*p*-Azophenylazo)benzoat (10) anspricht, gegenüber substi-



tuieren Benzoat-Ionen deutet darauf hin, daß eine sterische Anpassung zwar an den Benzoat-Benzolring zwingend erforderlich ist (die Affinität steigt um etwa 1 kcal/mol für *p*-Substitutionen), viel weniger jedoch an den zweiten Benzolring und an die zweite Azogruppe (^[4], dort S. 56-61). Danach scheint nur der *p*-Azobenzoatteil des Antigens in das „Schloß“ im Antikörper einzutreten.

3.3. Intermolekulare Kräfte

Die meisten Reaktionen in der lebenden Zelle finden in wäßriger Lösung bei einem pH-Wert von etwa 7 und bei Temperaturen um 30°C statt. Die Bildung eines A₀B₁-Komplexes bedeutet oft den Übergang von B₁ aus Wasser in ein stärker hydrophobes Medium. Man kann daher erwarten, daß Beziehungen zwischen der biologischen Aktivität von B₁ und der Hydrophobizität π_i bestehen, die wie folgt definiert ist:

$$\pi_i \equiv \lg P_{i,\text{oct}} \quad (7a)$$

Darin ist $P_{i,\text{oct}}$ der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen einem hydrophoben Lösungsmittel (normalerweise Octanol) und Wasser. Einige von Tanford^[24] angegebene ΔG_i -Werte sind in Tabelle 1 in der Rubrik HP zu finden.

Die Hydrophobizitätskonstanten π_i lassen sich dazu verwenden, den Verteilungskoeffizienten zwischen einem gegebenen Lösungsmittel und Wasser, $P_{i,\text{solvs}}$, mit Hilfe zweier linearer Gleichungen des Typs

$$\lg P_{i,\text{solvs}} = a_{\text{solvs}} \lg P_{i,\text{oct}} + b_{\text{solvs}} \quad (7b)$$

zu errechnen. Davon wird eine Gleichung für gelöste Substanzen verwendet, die ausgesprochene Wasserstoffdonoren sind, und die andere für solche, die Wasserstoffacceptoren sind^[1,3]. Zum Beispiel können Verteilungskoeffizienten für H-Donoren bzw. H-Acceptoren in Benzol mit Gl. (7c) bzw. (7d) berechnet werden^[25]:

$$\lg P_{i,\text{bz}} = 1.019 \lg P_{i,\text{oct}} - 1.401; \quad n = 40, \quad r = 0.948, \quad s = 0.252 \quad (7c)$$

$$\lg P_{i,\text{bz}} = 1.441 \lg P_{i,\text{oct}} - 0.794; \quad n = 20, \quad r = 0.966, \quad s = 0.254 \quad (7d)$$

Diese Gleichungen sind für eine große Zahl n gelöster Stoffe angewendet worden und ergeben gute Korrelationskoeffizienten r . Die Hydrophobizität eines gegebenen Moleküls kann aus den Hydrophobizitäten π_i der Atomgruppen, die das Molekül bilden, und aus einigen Inkrementen für Verzweigung,

Ringschluß, Konjugation usw. errechnet werden^[13]. Die Hydrophobizität einer Gruppe X läßt sich aus den Unterschieden der Verteilungskonstanten für unsubstituierte Ausgangsverbindungen RH und für deren substituierte Derivative RX ermitteln:

$$\pi_X = \lg P_{RX, oct} - \lg P_{RH, oct} \quad (7e)$$

Hydrophobizitätskonstanten wurden besonders von *Hansch* et al. im extrathermodynamischen Modell benutzt, um Struktur und biologische Wirkung miteinander zu korrelieren^[26a]. Zum Beispiel läßt sich die Hemmung der Adenosin-Desaminase durch 9-Benzyladenine durch

$$-\lg I_i = 0.453 \pi_i - 1.194; n = 8, r = 0.992 \quad (8a)$$

(I = Hemmungskonstanten) wiedergeben^[26b] und die Hemmung der Hill-Reaktion durch *N*-Phenyläthylcarbamate durch

$$-\lg C_i = 0.967 \pi_i + 3.318; n = 7, r = 0.982 \quad (8b)$$

(C = Konzentrationen, die 50 % Hemmung ergeben)^[26c]. Nach dem extrathermodynamischen Modell sollten in einigen Fällen auch Terme mit π^2 , σ^2 (Hammett-Konstante) oder Reaktionsindices in Betracht gezogen werden, z.B. für die Hemmung der Malat-Dehydrogenase durch Phenole (*m*-Derivate nicht eingeschlossen)^[26d]:

$$-\lg I_i = 0.73 \sigma_i^2 - 0.65 \sigma_i - 0.77 \pi_i^2 + 2.44 \pi_i + 3.47 \quad (8c)$$

$r = 0.952$

Die Korrelationsgleichungen von *Hansch*^[26] sowie von *Cammarata* gelten nur für Klassen von Verbindungen mit ähnlicher Struktur. Das ist nicht überraschend, da die Konfiguration der Moleküle und damit die Möglichkeit einer sterischen Anpassung an das „Schloß“ nicht auf den Reaktionsparametern oder den Hydrophobizitätskonstanten beruht. Dennoch mag man fragen, ob man bei vollständiger Berücksichtigung der intermolekularen Kräfte nicht auch entsprechende Gleichungen für Verbindungen erhalten kann, die sich in der Struktur stärker unterscheiden. So beträgt die freie Energie, die erforderlich ist, um Phenylalanin ($C_6H_5CH_2$ -Seitenkette) aus aromatischen Lösungsmitteln in Wasser zu bringen, +1.8 kcal/mol (für gleiche Konzentrationen). Für den Übergang von Phenylalanin aus aliphatischen Lösungsmitteln in Wasser beträgt die freie Energie hingegen nur 0.3 kcal/mol^[27]. Aromatische Ringe sollten also aromatische Umgebungen aliphatischen vorziehen. Diese Bevorzugung ist teilweise auf einen sterischen Effekt – die Stapelung der planaren aromatischen Ringe – und teilweise darauf zurückzuführen, daß aromatische Ringe senkrecht zur Ringebene stark polarisierbar sind; die van-der-Waals-Energie für die Wechselwirkung ist proportional dem Produkt aus den beiden Polarisierbarkeiten.

Zur Charakterisierung von Aminosäure-Seitenketten schlugen wir ein System vor, welches sechs Arten intermolekularer Kräfte berücksichtigt^[28a, 28b]: 1. die Hydrophobizität (HP, Tanford-Werte); 2. den speziellen aromatischen Charakter (AR, für Phe und Tyr 1.5 kcal/mol, wie von *Némethy*^[27] für den Unterschied zwischen aromatisch-aromatischen und aromatisch-aliphatischen Wechselwirkungen angegeben; für Trp 2.5 und für His 1.0 kcal/mol); 3. das Verhalten hinsichtlich der Bindung von Wasserstoff, Protonendonator (HBD) oder

Protonenacceptor (HBA); 4. die elektrostatische Ladung bei pH=7 (EC^+ , EC^-); 5. die Eigenschaft, in Charge-transfer-Komplexen als Elektronendonator (DCT) oder -acceptor (ACT) zu dienen (nur Trp ist ein Donor, die anderen sind bei der Ladungsübertragung nicht aktiv); 6. ein deutlich ausgeprägtes Dipolmoment, das nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen wird und gegen die Peptidkette oder das andere Ende der Aminosäure-Seitenkette gerichtet ist (μ^+ , μ^- als näherungsweise Kennzeichnung ungleicher Ladungsverteilung, für Trp und Tyr).

Mit Hilfe dieser intermolekularen Kräfte wurde versucht, die Verringerung der biologischen Aktivität, die in Oligopeptiden (antigene Determinanten, Hormone; die meisten Daten entnommen aus *Sneath*^[29]) durch Austausch von Aminosäuren hervorgerufen wird, in Beziehung zu setzen zu den Summen der Veränderungen ΔHP , ΔAR usw., die sich durch den Austausch der Aminosäuren ergeben. Die im Vergleich zu den Standard-Oligopeptiden herabgesetzte biologische Aktivität A wird durch die folgende lineare optimierte Gleichung wiedergegeben^[28b]:

$$-\lg A_{calc} = 0.45 + 0.12 \Delta HP + 0.69 \Delta AR + 0.35 \Delta HB + 0.004 \Delta EC + 1.1 \Delta DCT + 0.77 \Delta \mu; n = 92, r = 0.75, s = 0.84 \quad (9)$$

$-\lg A_{exp}$ liegt zwischen 0.00 und 4.65. Die partiellen Korrelationskoeffizienten für jede der sechs Arten von intermolekularen Kräften betragen 0.26; 0.53; 0.42; 0.22; 0.25 bzw. 0.48. Alle diese Werte liegen über der Vertrauensgrenze von 95 %. Der lineare Korrelationskoeffizient r ist klein, aber die Gleichung gilt für eine große Zahl n von modifizierten Oligopeptiden. Alle Acceptorstellen sind Proteine. Berücksichtigt man die unterschiedliche Verringerung der Aktivität, die auftritt, wenn der gleiche Aminosäure-Austausch an verschiedenen Stellen des Standard-Oligopeptids oder anderer Standardverbindungen durchgeführt wird, so eignet sich diese Gleichung wahrscheinlich recht gut, um den Einfluß eines Austauschs von Aminosäuren auf die Oligopeptid-Protein-Wechselwirkungen zu beschreiben, ohne daß man sich mit den Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren in der Peptidkette befassen muß. Die Bedeutung des aromatischen Charakters (AR) und der Ladungsübertragung (DCT) fällt ebenso auf wie der Koeffizient von annähernd 0 für Veränderungen der elektrostatischen Ladung (EC) des Oligopeptids. Möglicherweise sind die ladungstragenden Gruppen der Oligopeptide immer zum wäßrigen Medium hin gerichtet, sogar in Komplexen mit Proteinen. In Tabelle 2 sind nach Gl. (9) errechnete und experimentell bestimmte $\lg A$ -Werte für Oxytocine angegeben, bei denen die Aminosäuren 3, 4 und 8 ausgetauscht worden sind (experimentelle Daten von *Sneath*^[29]).

Mit Hilfe der oben genannten intermolekularen Kräfte wurde versucht, eine Beziehung zwischen der Toxizität für Mäuse und Ratten (molare LD_{50} -Werte) und der Struktur von Organophosphor-Verbindungen des Schrader-Typs^[30a, 30b] $R^1R^2P(O)OR^3$ aufzustellen. R^3 ist die am stärksten saure Gruppe. Sie wird bei der Phosphorylierung der Acetylcholin-Esterase abgespalten, worauf wahrscheinlich die Wirkungsweise dieser Verbindungen beruht^[30c]. Modifizierte Hammett-Konstanten σ der Substituenten R^1 , R^2 und R^3 wurden ebenfalls herangezogen. Die optimierte Gleichung [ähnlich Gl. (9)] – acht einstellbare Parameter, 71 Verbindungen – ergibt einen linearen Korrelationskoeffizienten von $r=0.70$. Die

Tabelle 2. Experimentelle und berechnete Werte, $\lg A_{\text{exp}}$ [29] bzw. $\lg A_{\text{calc}}$, für die im Vergleich zu Oxytocin herabgesetzte biologische Aktivität A von Oxytocinen mit ausgetauschten Aminosäuren bei Ratten. $r=0.95$, $n=21$, $s=0.62$.

Oxytocin: Cys-Tyr-Ile³-Gln⁴-Asn-Cys-Pro-Leu⁸-Gly
S — S

Austausch	$\lg A_{\text{exp}}$	$\lg A_{\text{calc}}$
Phe ³	1.25	1.51
Tyr ³	3.65	2.59
Trp ³	4.05	4.37
Leu ³	1.0	0.52
Val ³	0.9	0.60
Ser ⁴	0.3	0.64
Ala ⁴	1.1	1.25
Asn ⁴	0.6	0.46
Ile ⁸	0.2	0.52
Val ⁸	0.35	0.54
Lys ⁸	0.75	1.00
Arg ⁸	0.75	1.09
Phe ³ Lys ⁸	1.95	2.06
Phe ³ Arg ⁸	0.8	2.15
Phe ³ His ⁸	2.4	2.79
Tyr ³ Lys ⁸	4.6	3.14
Trp ³ Lys ⁸	5.0	3.92
Ser ⁴ Ile ⁸	0.5	0.71
Phe ³ Asn ⁴ Lys ⁸	2.2	2.07
Phe ³ Ala ⁴ Lys ⁸	2.95	2.86
Phe ³ Ser ⁴ Lys ⁸	2.7	2.25

Koeffizienten der Parameter für die Hydrophobizität, den aromatischen Charakter und die Wasserstoffbrückenbindungen haben etwa die gleiche absolute Größe wie in Gl. (9). Der hier erhaltene Wert für r ist ebenfalls niedrig. Trotzdem gilt die Gleichung für einen weiten Bereich unterschiedlicher chemischer Strukturen (d. h. der Substituenten R^1 , R^2 und R^3), der viel größer ist als der Bereich, in dem die Korrelationsgleichungen der von *Cammarata* und *Hansch* verwendeten Art gültig sind.

3.4. Molekülgröße

Wie bereits in Abschnitt 1 erwähnt, sollte ein Zusammenhang zwischen Spezifität und Molekülgröße bestehen. Im Folgenden wird ein Verfahren zur Abschätzung der Größe der Erkennungsregion (Kontaktregion zwischen A_0 und den Effektoren B_i) skizziert, die für einen bestimmten Spezifitätsgrad notwendig ist. Der Erkennner A_0 muß größer sein als die Erkennungsregion, um eine gewisse Starrheit dieser Region zu gewährleisten, und damit er eventuell auch andere Funktionen als nur das Erkennen wahrnehmen kann (z. B. Komplementbindung durch Antikörper).

Am einfachsten sind die Überlegungen von *Thomas*^[8a] und *McCarthy*^[8b], welche die kleinste Zahl n der Nucleotide in einem RNA-Oligonucleotid feststellen wollten, das bei Versuchen zur konkurrierenden Hybridisierung als „selbst“ oder „nicht selbst“ erkannt werden kann, und zwar von absorbierter DNA viralen, bakteriellen usw. Ursprungs. Ein solches Oligonucleotid wird daran erkannt, daß es mit DNA-Abschnitten komplementäre Basenpaare bildet. Eine DNA aus N Nucleotiden besitzt annähernd N überlappende Oligonucleotidsequenzen. Wenn die Primärsequenzen der DNA etwa statistisch verteilt sind, kann die Sequenz von n kurzen RNA-Oligonucleotiden zufällig zu einer Sequenz der absorbierten DNA komplementär sein. Wenn dieser Fall nicht eintreten soll, muß n so groß sein, daß die Zahl 4^n von möglichen „Wörtern“

aus einem „Alphabet“ mit $\alpha=4$ Buchstaben viel größer als N ist, d. h.

$$\alpha^n \gg N: \quad n > \frac{\lg N}{\lg \alpha} \quad (10)$$

Wichtig ist, daß ein „Wort“ mit einem einzigen veränderten „Buchstaben“ gegenüber dem richtigen „Wort“ (d. h. B_0) u. U. doch von A_0 erkannt wird, besonders dann, wenn die Konzentration an B_0 gering und die an falschen Effektoren B_i hoch ist. Ein stark vereinfachtes Modell, nach dem man die Zahl n im allgemeinen Fall mit Gl. (2) oder (4) berechnen kann, beruht auf folgenden Annahmen^[9]:

1. Alle Erkennungsregionen an den Effektoren B_i haben dieselbe Zahl n an monomeren Einheiten oder an Atomen. 2. Die Affinitätsabnahme ΔG_i (beim Übergang von A_0B_0 zu A_0B_i) ist proportional der Zahl v_i an Modifikationen, durch die sich die Erkennungsstelle an B_i von der an B_0 unterscheidet:

$$\Delta G_i = v_i \Delta g \quad (11)$$

(Δg ist die mittlere Affinitätsabnahme pro Modifikation). 3. Alle Effektoren B_i unterscheiden sich von B_0 durch dieselbe Zahl \bar{v} an Modifikationen innerhalb der Haftregion.

Es sei daran erinnert, daß N die Zahl der B_i -Typen ist, die vermutlich alle verschiedene Erkennungsregionen besitzen, und α die Zahl an monomeren Einheiten (oder Atomen), aus denen die B_i -Moleküle aufgebaut sind.

Aus Gl. (2) und (1) ergibt sich unter Berücksichtigung von $\Delta G_i = G_{0i} - G_{00} = \bar{v} \Delta g$ und $p_i \ll 1$

$$p_i \approx \sum_{i=1}^{N-1} \frac{[B_i] K_{0i}}{[B_0] K_{00}} = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} [B_i]}{[B_0]} e^{\frac{\bar{v} \Delta g}{RT}}; \quad \bar{v} = \frac{2.3 RT}{\Delta g} \lg \frac{[B_{\text{max}}]}{p_i [B_0]} \quad (12)$$

Damit nicht zufällig „falsche“ Erkennungen stattfinden, muß die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Erkennungsregion irgendeines der falschen B_i durch weniger als \bar{v} Substitutionen von B_0 unterscheidet, genügend klein sein. Mit Wahrscheinlichkeits- und Kombinationsrechenstechniken erhält man

$$NC_n^{\bar{v}} \cdot \bar{v} \cdot 1 \cdot \alpha^{-(n-\bar{v}-1)} \ll 1 \quad (13)$$

die für $\bar{v}=1$ mit Beziehung (10) übereinstimmt. Nach einigen weiteren Rechnungen und durch Anwendung der Stirling-Näherung für $x!$ erhält man den Näherungswert [vgl. ^[13]], für $\lg (ne/(\bar{v}-1)) \approx 1$

$$n \gtrsim \bar{v} - 1 + \frac{(\bar{v}-1) + \lg N}{\lg \alpha} \quad (14)$$

Wenn das Erkennen zu einer Präzipitation und nicht zu einer Komplexbildung führt, gelten dieselben Beziehungen, doch muß die mittlere Zahl \bar{v} der Modifikationen, durch die sich die falschen Effektoren B_i von B_0 unterscheiden müssen, nach Gl. (15) errechnet werden:

$$\bar{v} = \frac{2.3 RT}{\Delta g} \lg \frac{[B_{\text{max}}]}{[B_0]} \quad (15)$$

B_{max} ist die höchste Konzentration an B_i , bei der A_0 noch B_0 herausfinden (also die Effektoren B_i nicht fällen) kann.

4. Spezifität bei chemischen und biochemischen Prozessen

4.1. Auslösung der Antikörperbildung durch „nicht-selbst“-Antigene

Die Spezifität dieses Prozesses wurde im Zusammenhang mit der Annahme untersucht, daß die (primäre) Antikörperproduktion ausgelöst wird durch Präzipitation des fremden Antigens (B_0) auf den Haftregionen der Antikörper (A_0) die sich ihrerseits auf der Oberfläche des entsprechenden Immunocyten finden; „selbst“-antigene Determinanten (B_i) sollten daher nicht auf den Haftregionen der „selbst“-Antikörper präzipitieren^[31].

Die niedrigsten Konzentrationen an „nicht-selbst“-Antigenen ($[B_0]$ in Gl. (15)), durch die eine primäre Immunantwort ausgelöst wird, betragen etwa 10^{-6} mol/l für schwache Antigene und 10^{-10} mol/l für starke. Die maximale Konzentration an „selbst“-antigenen Determinanten $[B_{\max}]$ kann etwa 10^{-3} mol/l betragen, was der Serumglobulin-Konzentration entspricht (Diskussion siehe^[31]). Die meisten Antigen-Determinanten sind Peptide aus $\alpha = 20$ Aminosäuren. Der Austausch einer Aminosäure im peptidischen Antigen führt zu einer mittleren Affinitätsabnahme von $\Delta g = 2.0$ kcal/mol. Gleichung (15) ergibt $v \approx 2-5$ für den Konzentrationsbereich zwischen schwachen und starken Antigenen. Die maximal mögliche Zahl von „selbst“-antigenen Determinanten wäre gleich der Zahl der überlappenden kurzen Peptidsequenzen an allen Proteinen, die vom haploiden Säugetiergenom codiert werden können, d. h. $N \approx 10^9$; die wirkliche Zahl beträgt vielleicht infolge von Wiederholungen im Genom, Nichtverfügbarkeit einiger Sequenzen usw. $N \approx 10^7$. Mit $N = 10^7$, $\alpha = 20$, $v = 2-5$ ergibt Beziehung (14) eine Zahl von $n \approx 9-13$ Aminosäureresten für die Antigen-Determinanten, die von den Antikörper-Haftregionen „gefühlt“ werden müssen. Die meisten Antikörper-Haftregionen scheinen 6–12 Aminosäurereste zu enthalten^[32]. Die kleinste antigene Determinante ist Trianlin an einem Trägerprotein^[32d]; es ist aber nicht auszuschließen, daß ein etwas weiter entfernter Teil des Trägerproteins (der nicht direkt an Trianlin gebunden ist) zur Antigen-Determinante beiträgt.

Wenn körperfremde Nucleinsäuren von körpereigenen unterschieden werden sollen, die nur aus vier Monomeren bestehen, sollte sich die Zahl der Antigen-Determinanten etwa verdoppeln (d. h. $n \approx 18-25$ monomere Einheiten), oder der Organismus sollte keine Antikörper gegen Nucleinsäuren aus den vier üblichen Basen bilden. Letzteres scheint der Fall zu sein. Beziehungen zwischen Struktur und Affinität von Antikörpern und Haptenen sowie ähnlichen Molekülen wurden ausführlich von Pressman und Grossberg^[4] diskutiert. Sela^[33] untersuchte die Bedeutung der Konformation für die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. So löst das α -helicale Polypeptid (Tyr-Ala-Glu)_n die Bildung eines Antikörpers aus, der keine Kreuzreaktion mit Polylysin gibt, das an den ϵ -Aminogruppen mit dem Tripeptid Tyr-Ala-Glu acyliert ist und unter diesen Bedingungen keine Helixstruktur besitzt (Abb. 3). Die umgekehrte Nicht-Kreuzreaktion wurde ebenfalls gezeigt. Das Oligopeptid (Ala-Tyr-Glu)_n beginnt mit dem oben genannten anti- α -helicale Antikörper bei $n=7$ zu reagieren, obwohl das Peptid als solches nicht als α -Helix in Lösung vorliegt. Der Antikörper zwingt hier wahrscheinlich das Antigen in die α -helicale Konformation^[33a]. Die umgekehrte Beziehung zwischen den Net-

toladungen der immunogenen Makromoleküle und der initiierten Antikörper wurde ebenfalls von Sela^[33b] gezeigt.

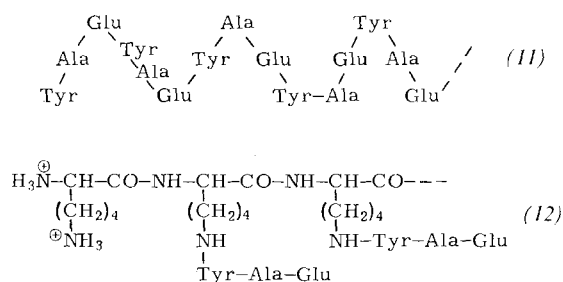


Abb. 3. α -Helicales Polypeptid (Tyr-Ala-Glu)_n (11) und das Antigen (12), welches man durch Kopplung von Tyr-Ala-Glu-Resten an die ϵ -Aminogruppen von Poly-L-lysin erhält (schematisch).

Es ließen sich auch vollsynthetische Antigene erhalten^[33c]. Für die antigene Wirkung scheint ein Mindestwert des Molekulargewichts erforderlich zu sein: Dinitrophenyl-(L-Lys)_n wirkt in Meerschweinchen erst als Antigen, wenn $n \geq 7$.

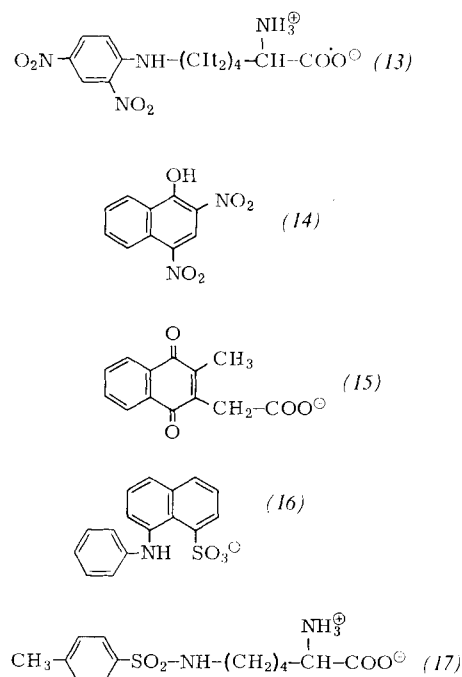


Abb. 4. Moleküle, die vom MOPC-460-Myelom-Protein gebunden werden: N^6 -(2,4-Dinitrophenyl)lysin (13), 2,4-Dinitronaphthol (14), Menadion (15). Moleküle, die nicht von diesem Protein gebunden werden: 8-Anilino-1-naphthalinsulfonat (16), N^6 -(p-Toluolsulfonyl)lysin (17).

Für oligopeptidische Haptene und ihre Derivate, die man durch Austausch von Aminosäuren erhält, ergibt sich aus der Wechselbeziehung zwischen der Verringerung der Affinität (gegen die gebildeten Antikörper) und Unterschieden in den Parametern für die intermolekularen Kräfte [im Sinn von Gl. (9)] ein Korrelationskoeffizient $r \approx -0.75$ ^[28]. Ein interessantes Beispiel für die durch intermolekulare Kräfte bestimmte Spezifität ist die Affinität der Mäuse-Myelom-Proteine MOPC-460 und MOPC-315 zu einigen kleinen Molekülen (Abb. 4). Dieses Protein bindet aromatische Nitroverbindungen und Chinone stark ($K \approx 10^{-4}$ mol/l), d. h. Moleküle, die in Charge-transfer-Komplexen den Charakter von Elektronenacceptoren (ACT) haben; es werden aber keine anderen

aromatischen Moleküle mit ähnlicher sterischer Struktur gebunden, denen diese Eigenschaft fehlt (z. B. aromatische Amine^[34a–34c]). Aus spektroskopischen Untersuchungen ergeben sich Anhaltspunkte dafür, daß die Haftregionen dieser Immunoglobuline zwei Tryptophanreste enthalten, die mit den aromatischen Nitroderivaten Charge-transfer-Komplexe bilden^[34d].

4.2. Repressor-Operator-Wechselwirkungen

Das am besten untersuchte System auf diesem Gebiet ist das Lac-Operon von *Escherichia coli*. Zwischen Repressor und Operator besteht ein einfaches Assoziationsgleichgewicht mit der Dissoziationskonstante $K \approx 10^{-13} \text{ mmol/l}$ ^[35a]. Das *E.-coli*-Chromosom besteht aus $N = 4.5 \cdot 10^6$ Basenpaaren oder aus etwa ebenso vielen überlappenden Oligonucleotidsequenzen. Ein 300facher Überschuß an *E.-coli*-DNA ohne Operator-Gen konkurriert nicht merklich mit dem Operator um den Repressor^[35b], d. h. $p_r \approx 10^{-3}$. Punktmutationen im Lac-Operator setzen die Affinität zum Repressor um den Faktor 8–1000 herab^[35d]. Die mittlere Verringerung der Affinität pro Basenpaaraustausch beträgt daher $\Delta g \approx 2.0 \text{ kcal/mol}$; aus Gl. (12) ergibt sich $\bar{n} \approx 7$. Da es $\alpha = 4$ Basenpaare gibt, verlangt Gl. (14) eine Zahl von $n \gtrsim 27$ Basenpaaren für das Lac-Operator-Gen^[36]. Eine Berechnung von Sadler und Smith^[35e], die von der Annahme einer binomischen Verteilung von Oligonucleotiden im Vergleich zum Operator-Segment ausgeht, ergibt $n = 18$ Basenpaare. Nach einer experimentellen Untersuchung von Gilbert und Maxam^[37] umfaßt das Lac-Operator-Gen etwa 27 Basenpaare. Maniatis und Ptashne^[38] geben für eine Einheit des λ -Bakteriophagen-Operator-Gens eine Länge von etwa 35 Basenpaaren an; im vollständigen Operator-Gen liegen sechs solche Einheiten vor. Die Anforderungen an die Spezifität müssen dieselben sein wie im Lac-Repressor-Operator-System; der λ -Bakteriophagen-Repressor wird von einem permanenten Gen des *E.-coli*-Genoms codiert.

Bei der Bindung des *E.-coli*-Lac-Repressors an den Operator wird die DNA nicht entspiralisiert. Aus der Abhängigkeit der Bindung von der Ionenstärke ergibt sich das Produkt elektrischer Ladungen für die Wechselwirkung der beiden Partner zu -6 Einheiten^[35c]. Die Primärstruktur des Lac-Operators wurde von Sadler und Smith^[35d, 35e] sowie von Gilbert und Maxam^[37] entschlüsselt: sie zeigt einige interessante Symmetrien. Die Sequenz der Primärstruktur des Lac-Repressors wurde von den Arbeitsgruppen von Müller-Hill und Beyreuther^[39] ermittelt. Für die spezifische Wechselwirkung der DNA-Doppelhelix des Operators und der Sequenz am Aminoende des Repressors, der vermutlich eine α -Helixstruktur besitzt, wurde ein räumliches Modell vorgeschlagen^[39], welches auf spezifischen Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäureresten und entsprechenden Resten an den Basen- und Phosphatgruppen in der tiefen Furche der DNA basiert. Nach Weber et al.^[40] zeigt jedoch ein mutierter Repressor, dessen Fähigkeit, mit dem Operator Wasserstoffbrücken zu bilden, vermindert sein sollte, keine merklich herabgesetzte Affinität. Aromatische Moleküle werden ziemlich leicht in die DNA-Doppelhelix eingelagert (intercaliert), und zwar durch Stapelung nach dem Prinzip der maximalen Überlappung^[41a]. Ethidiumbromid oder Proflavin werden leicht in die DNA-Doppelhelix aufgenommen, wobei sich diese um 12° pro Einlagerung entwindet^[41b] (Abb. 5). Polyadenin bindet Tryptophan sehr

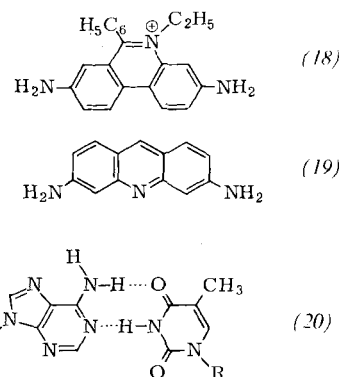


Abb. 5. Ethidium-Ion (18) und Proflavin (19) und deren Ähnlichkeit mit dem AT-Basenpaar (20) in der DNA.

gut, dessen aromatischer Ring die gleiche Größe und Gestalt hat wie der Purinring, Phenylalanin und Histidin aber weniger gut^[41c]. Poly-dAT bindet L-Lys-L-X-NH₂-Dipeptide mit steigender Affinität in der Reihe X = Leucin < Tyrosin < Phenylalanin < Tryptophan^[41d]. Aromatische Aminosäurereste des Repressors können durch Stapelung in die Doppelhelix der Operator-DNA intercaliert werden, wobei einige Anordnungen der aromatischen Ringe infolge der Orientierung ihrer Dipolmomente zu denen der benachbarten Nucleinbasen möglicherweise bevorzugt sind^[42].

4.3. Spezifität bei Reaktionen mit kleinen Molekülen

Der Fall der Reagentien in der anorganischen analytischen Chemie wurde bereits erwähnt. Ein typisches Reagens für Kationen ist Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA, Abb. 1). Diese kann Ca²⁺-Ionen in einer Mischung aus Alkalimetall- und Erdalkalimetall-Ionen spezifisch komplexieren und eignet sich daher für titrimetrische Bestimmungen. Die Dissoziationskonstante von [CaEDTA]²⁻ beträgt $2.58 \cdot 10^{-11} \text{ mol/l}$ und für [MgEDTA]²⁻ $2.04 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$ ^[13, 43]; daher kann erst ein hundertfacher Überschuß an Mg²⁺-Ionen mit Erfolg um dieses Komplexon konkurrieren. Verglichen mit Repressor-Operator-Wechselwirkungen ist die Spezifität gering, obwohl sie in der analytischen Chemie ausreicht.

Bei katalytischen Reaktionen ist die Substratspezifität im Vergleich zur Spezifität von Wechselwirkungen zwischen biologischen Makromolekülen ebenfalls gering. Zum Beispiel betragen die Aktivierungsenergien für die Dehydrierung einiger Alkohole bei 350°C über Al₂O₃ für Äthanol 20.2, 1-Propanol 18.3 und Isobutanol 16.4 kcal/mol^[43]. Die Spezifität des Katalysators kann höher sein. Bei der Hydrierung der Äthylen-Doppelbindung mit Rh-, Pd-, Pt- und Fe-Katalysatoren verhalten sich die Geschwindigkeiten etwa wie 1000:100:10:1, obwohl in dieser Reihe die Atomabstände in den Katalysatoren um weniger als 0.1 Å anwachsen^[43].

Strukturmerkmale, die bei enzymatischen Reaktionen die Substrat-Inhibitor-Enzym-Wechselwirkungen beeinflussen, hat Webb^[44] besprochen. Zunächst sollen die Affinität der Bindung eines Moleküls an die katalytisch wirksame Stelle des Enzyms und die Umwandlungsgeschwindigkeit des gebundenen Moleküls behandelt werden. Moleküle mit hoher Affinität und geringer Umwandlungsgeschwindigkeit sind kompetitive Hemmer. Bei der enzymatischen Abspaltung der *p*-Nitrophenylgruppe aus Aminosäure-Derivaten der Formel

durch Hydrolyse mit Chymotrypsin hat das D-Phenylalanin-Derivat die größte Bindungskonstante ($K = 3.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$; L-Phe-Derivat: $K = 4.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$) und das L-Phenylalanin-Derivat die höchste Umwandlungsgeschwindigkeit ($k_3 = 39 \text{ s}^{-1}$; D-Phe-Derivat: $k_3 = 0.18 \text{ s}^{-1}$). Die Geschwindigkeiten V der Reaktion zweiter Ordnung bei niedriger Substratkonzentration betragen $8.1 \cdot 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das L-Derivat und nur $4.8 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das D-Derivat. Für einige andere Aminosäure-Derivate findet man: $V = 3.5 \cdot 10^6$ für das Trp-Derivat, $2.5 \cdot 10^4$ für das Asn-Derivat und $3.1 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das Norvalin-Derivat^[20].

Die Spezifität enzymatischer Reaktionen ist im Vergleich zu der von Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen gering. So hemmt Jodacetat (JCH_2COO^-), welches als spezifischer Hemmer der Glycerinaldehyd-Dehydrogenase angesehen wird, darüber hinaus mindestens 55 weitere Enzyme, und dreiwertige Arsenverbindungen – spezifische Inhibitoren der Ketsäureoxidation – hemmen in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l ebenfalls 52 weitere Enzyme^[44]. Die Anforderungen an die Spezifität enzymatischer Reaktionen in der Zelle sind ebenfalls viel geringer als an die von Antigen-Antikörper- oder Repressor-Operator-Wechselwirkungen: Die Zahl kleiner Moleküle in der Zelle, unter denen ein Enzym den richtigen Partner erkennen muß, ist sicherlich nicht größer als $n = 10^3$, und ein Fehlerschwellenwert der Größe $p_f = 0.01$ dürfte auch ausreichen^[9c].

Ein sehr kleiner Fehlerschwellenwert ist für die DNA-Replikation erforderlich. Die Häufigkeit von Punktmutationen (Einbau falscher Basen) beträgt 10^{-8} bis 10^{-11} pro Basenpaar und Replikation^[45]; das DNA-Replikase-System braucht den richtigen Partner aber auch nur aus den $N = 4$ vorhandenen Desoxyribonucleotiden zu erkennen. Das Replikase-System kann leicht mit Basenanalogen wie Bromuridin oder Azaguanin getäuscht werden, die mit großer Häufigkeit in replizierende DNA eingebaut werden. Ein Fehlerschwellenwert $p_f = 10^{-8}$ bis 10^{-11} und $N = 4$ erfordert gemäß Gl. (12) einen Affinitätsunterschied von $\Delta G \approx 11\text{--}16 \text{ kcal/mol}$, der nicht nur durch Unterschiede in den Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare erklärt werden kann. Eine Erklärung für die hohe Präzision der Replikation schlugen *Kubitscheck* und *Henderson* vor^[46]: Die für die Erkennung verantwortliche Molekülregion ist größer als die Gruppen, die die komplementären Wasserstoffbrücken der Basenpaare bilden. Die Replikase sollte auch auf die Gruppen in den Positionen 5 und 6 des Pyrimidins sowie 6 und 7 des Purins ansprechen.

5. Schlußfolgerungen. Vorhersage von Strukturen mit bestimmter biologischer Aktivität

Die Suche nach Substanzen mit einer erwünschten biologischen Aktivität ist ebenso alt wie die Medizin. Die umfangreichen und systematischen Arbeiten auf diesem Gebiet waren in unserem Jahrhundert sehr erfolgreich, obwohl die theoretischen Grundlagen ziemlich spärlich gewesen sein mögen. *Ehrlich*s Salvarsan (Abb. 1) war das Ergebnis einer Überprüfung von einigen Hundert Substanzen; die Idee beruhte wahrscheinlich auf der Beobachtung, daß Bakterien durch einige Azofarbstoffe spezifisch angefärbt werden und daß die Einführung

von Arsen Substanzen toxisch macht (weitere Beispiele siehe^[47]).

Es lassen sich auch Beispiele für sehr mühevollen, aber nicht sehr erfolgreiche Untersuchungen anführen, z. B. die Prüfung der in den „Cancer Screening Data“ erfaßten Verbindungen, deren Zahl vermutlich in die Hunderttausende geht, und die nicht sehr beeindruckenden Ergebnisse der Chemotherapie des Krebses. Eine Strategie für solche Untersuchungen, auch wenn sie nur Wahrscheinlichkeitswert besitzt, ist daher in höchstem Maß erwünscht. Die bereits erwähnten Arbeiten von *Cammarata*^[16] und *Hansch*^[26] gehen in diese Richtung.

Ein Grundgedanke, der sich noch nicht sehr weit durchgesetzt zu haben scheint, ist das Erfordernis einer Mindestgröße für hochspezifische Moleküle. Arzneimittel wie Sulfonamide blockieren in Bakterien eine Reihe von Enzymen, die sich merklich von den entsprechenden Enzymen in Säugetierzellen unterscheiden; selbst wenn sich diese Arzneimittel mit einigen Proteinen in der Säugetierzelle vereinigen, so hat das in der Regel keine dramatischen biologischen Folgen. Krebs – wie es besonders in den Viren-Theorien vorgeschlagen wird – beruht auf einem Defekt im Genom, vielleicht in einigen viralen Onkogenen, die in das Genom des Wirtes eingebaut sind. Arzneimittel gegen verschiedene Krebsarten müßten daher eine Spezifität besitzen, die mit der von Repressor-Proteinen vergleichbar ist^[48]; es ist ziemlich hoffnungslos, nach einem einfachen Molekül zu suchen, welches diese Aufgabe wirklich erfüllen kann. Bei Makromolekülen erreicht die Zahl möglicher Kombinationen astronomische Werte, und es ist mit Sicherheit sehr schwierig, eine Strategie für die Forschung auf diesem Gebiet zu entwickeln.

Schwierigkeiten gibt es auch bei der planmäßigen Suche nach Strukturen mit bestimmter biologischer Aktivität auf dem Gebiet der antibakteriell wirksamen Arzneimittel, Pestizide, Pflanzenwachstumsstimulatoren usw. Gleichungen des Typs (5)–(9) können für eine gegebene Verbindungsklasse anzeigen, welche Art der Substitution (hydrophobe Gruppen, elektronenanziehende Gruppen usw.) die erwünschte biologische Aktivität begünstigt. Wenn quadratische Glieder berücksichtigt werden, kann man auch optimale Werte für die entsprechenden strukturellen Parameter angeben (optimale Hydrophobizität, optimale Elektronegativität usw.).

Eine andere Möglichkeit vorzugehen beruht auf dem Modell von *Free* und *Wilson*^[49]. In diesem Modell wird die biologische Aktivität als Summe aus Beiträgen von Molekülsegmenten angesehen, die Substituenten enthalten können. Unter Zugrundelegen einer bestimmten Mindestzahl an biologischen Aktivitäten werden die Wirkungen der Substituenten in den verschiedenen Segmenten berechnet, und man kann innerhalb der vorgegebenen Gruppe von Segmenten und Substituenten vorhersagen, welches Molekül am aktivsten sein sollte.

Mehrere Arten erwünschter biologischer Wirkungen lassen sich mit einer großen Zahl von Verbindungen erreichen, die sich in ihrer chemischen Struktur oft stark unterscheiden. Um solche umfangreichen Datenreihen zur Vorhersage der günstigsten chemischen Struktur zu verwenden, müssen u. U. Computer herangezogen werden. Vorschläge von *Hiller* et al.^[50] für solche Berechnungen beruhen auf einem perzeptronischen, einem logisch-strukturellen oder einem topographischen Algorithmus. Aus Untersuchungen mit mehreren Gruppen chemischer Verbindungen ergibt sich für die Vorhersage aktiver oder nicht aktiver Verbindungen eine mittlere Zuver-

lässigkeit von 75–80 %. Ein Problem solcher Computer-Suchmethoden besteht darin, einen geeigneten „Katalog“ von Strukturparametern zu entwickeln, mit dessen Hilfe man die Verbindungen charakterisieren kann.

Zur Zeit führen die Methoden zur Vorhersage von Strukturen mit einer erwünschten biologischen Aktivität nur innerhalb von Verbindungsreihen mit ähnlicher chemischer Struktur zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Die hohen Anforderungen, die in einigen Fällen an die Spezifität gestellt werden müssen, verlangen den Einsatz von Molekülen zunehmender Größe und Komplexität – man erinnere sich z. B. an die Antibiotica des letzten Jahrzehnts. Dadurch vergrößert sich die Zahl von Verbindungen, die getestet werden sollten, ganz enorm. Die Synthese aller dieser Stoffe wäre sehr mühsam. Bessere Kenntnisse über die Strukturparameter, die für die biologische Aktivität und Spezifität verantwortlich sind, werden daher dringend benötigt.

Eingegangen am 18. März 1974 [A 22]

Übersetzt von Dr. Wolfgang Karau, Neustadt/Weinstr.

- [1] E. Fischer, Ber. Deut. Chem. Ges. 27, 2958 (1894).
- [2] P. Ehrlich: Studies on Immunity. Wiley, New York 1906.
- [3] S. Arrhenius: Immunochemistry. Macmillan, New York 1907.
- [4] D. Pressman u. A. L. Grossberg: The Structural Basis of Antibody Specificity. Benjamin, New York 1968.
- [5] A. A. Balandin: Multiplētnaia teoria kataliz (Multiplet Theory of Catalysis). M. G. U. Moskau 1963–1964.
- [6] A. D. Riggs, H. Suzuki u. A. Bourgeois, J. Mol. Biol. 48, 67 (1970).
- [7] M. V. Volkenshtein u. A. M. Eliashovich, Dokl. Akad. Nauk SSSR 136, 1216 (1961).
- [8] a) C. A. Thomas, jr., Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 5, 315 (1966); b) B. L. Conaughy u. B. J. McCarthy, Biochim. Biophys. Acta 149, 180 (1967).
- [9] a) Z. Simon, J. Theor. Biol. 9, 414 (1965); b) Rev. Roum. Biochim. 9, 337 (1972); c) Biochimie cuantică și interacții specifice (Quantum Biochemistry and Specific Interactions). Edit. Stiințifică, București 1973.
- [10] J. Ninio, Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 12, 13 (1973).
- [11] K. Scherer, Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin. Kl. Med. 1968, 259.
- [12] G. Schwarzenbach, Advan. Inorg. Chem. Radiochem. 7, 1 (1961).
- [13] A. Leo, C. Hansch u. D. Elkins, Chem. Rev. 71, 525 (1971).
- [14] B. Pullman u. A. Pullman: Quantum Biochemistry. Wiley, New York 1963.
- [15] B. Pullman, Advan. Quantum Chem. 4, 267 (1968).
- [16] A. Cammarata in R. Kier u. B. Lemont: Molecular Orbital Study in Chemical Pharmacology. Symposium. Springer, New York 1970, S. 156. und andere Beiträge dieses Symposiums.
- [17] J. Kaneti, J. Theor. Biol. 38, 169 (1973).
- [18] M. Sela, Naturwissenschaften 56, 206 (1969).
- [19] R. W. Taft, jr. in M. S. Newman: Steric Effects in Organic Chemistry. Wiley, New York 1956, S. 586.
- [20] A. Dupaix, J. J. Bechet u. C. Roucoux, Biochemistry 12, 2559, 2566 (1973).
- [21] S. T. Rao u. M. G. Rossmann, J. Mol. Biol. 76, 241 (1973).
- [22] Z. Simon u. Z. Szabadai, Studia Biophys. (Berlin) 39, 123 (1973).
- [23] J. R. Knowles, J. Theor. Biol. 9, 213 (1965).
- [24] C. Tanford, J. Amer. Chem. Soc. 84, 4240 (1962).
- [25] C. Hansch: Pomona College Medicinal Chemistry Project. Claremont, Calif. 1973.
- [26] a) C. Hansch u. T. Fujita, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1616, 5175 (1974); b) H. J. Schaffer, R. N. Johnson u. E. Oddin, J. Med. Chem. 13, 452 (1970); c) C. Hansch u. E. W. Deutsch, Biochim. Biophys. Acta 112, 381 (1966); d) R. T. Wedding, C. Hansch u. T. R. Fukuto, Arch. Biochim. Biophys. 121, 9 (1967).
- [27] G. Némethy, Angew. Chem. 79, 260 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 195 (1967).
- [28] a) Z. Simon, Rev. Roum. Biochim. 5, 319 (1968); b) Z. Szabadai u. Z. Simon, ibid. 9, 327 (1972); c) Z. Simon, Z. Szabadai u. J. Miklos, ibid. 8, 79 (1970).
- [29] P. H. A. Sneath, J. Theor. Biol. 12, 157 (1966).
- [30] a) Vilceanu, A. Chiriac, Z. Szabadai u. Z. Simon: Rev. Roum. Biochim. 10, 239 (1973); b) noch unveröffentlicht; c) R. D. O'Brien in: Chimie Organique du Phosphore. Colloques Internationales CNRS. Editions CNRS, Paris 1970, S. 353.
- [31] Z. Simon u. V. Gheție, Rev. Roum. Biochim. 8, 261 (1971).
- [32] a) M. F. Burnet: Cellular Immunology. Melbourne University Press, Melbourne 1969; b) E. L. Kabat: Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry. Holt, Rinehart and Winston, New York 1968; c) J. Fischer, J. Spragg, R. C. Talamo, J. V. Pierce, K. Suzuki, K. F. Austen u. E. Haber, Biochemistry 8, 3750 (1969); d) J. Schaechter, Nature 228, 638 (1970).
- [33] a) M. Sela, Ann. N. Y. Acad. Sci. 190, 181 (1971); b) J. B. Robbins, E. Mozes, A. Rimon u. M. Sela, Nature 213, 1013 (1967); c) M. Sela, Science 166, 1365 (1969).
- [34] a) B. M. Jaffe, E. S. Simms u. H. N. Eisen, Biochemistry 10, 1963 (1971); b) R. W. Rosenstein, R. A. Musson, M. Y. K. Armstrong, W. H. Königsherg u. F. F. Richards, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 877 (1972); c) J. H. Rockey, P. C. Montgomery, B. J. Underdown u. K. J. Dorrington, Biochemistry 11, 3172 (1972); d) J. Haimorich, H. N. Eisen, E. Hurwitz u. D. Girol, ibid. 11, 2389 (1972).
- [35] a) A. D. Riggs, H. Suzuki u. S. Bourgeois, J. Mol. Biol. 48, 67 (1970); b) A. D. Riggs, R. F. Newby u. S. Bourgeois, ibid. 51, 303 (1970); c) A. D. Riggs, S. Bourgeois u. M. Cohn, ibid. 53, 401 (1970); d) T. F. Smith u. J. R. Sadler, ibid. 59, 273 (1971); e) J. R. Sadler u. T. F. Smith, ibid. 62, 139 (1971).
- [36] Z. Simon, Studia Biophys. (Berlin) 26, 179 (1971).
- [37] W. Gilbert u. A. Maxam, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3581 (1973).
- [38] T. Maniatis u. M. Ptashne, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1531 (1973).
- [39] a) K. Adler, K. Beyreuther, E. Fanning, N. Geissler, B. Gronenborn, A. Klemm, B. Müller-Hill, M. Pfahl u. A. Schmitz, Nature 237, 322 (1972); b) K. Beyreuther, K. Adler, N. Geissler u. A. Klemm, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3576 (1973).
- [40] K. Weber, T. Platt, D. Ganem u. J. H. Miller, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3624 (1972).
- [41] a) A. M. Craig u. I. Isenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1337 (1970); b) W. Fuller u. M. J. Warring, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 805 (1971); c) M. Raczka u. M. Mandel, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1190 (1971); d) E. J. Gabay, K. Sanford, C. S. Baxter u. L. Kupecak, Biochemistry 12, 402 (1973).
- [42] Z. Simon, Studia Biophys. (Berlin) 28, 179 (1972).
- [43] Spravochnik Chimika (Chemical Tables): Edit. Khimia, Moskau 1965. Bd. 3, S. 162.
- [44] J. L. Webb: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Academic Press, New York 1963.
- [45] J. W. Drake, Nature 221, 1132 (1969).
- [46] H. E. Kubitschek u. T. R. Henderson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 512 (1966).
- [47] A. Albert: Selective Toxicity (Russ. Übers.). Izd. Inostr. Lit. Moskau 1953.
- [48] Z. Simon, Rev. Roum. Biochim. 6, 239 (1969).
- [49] S. M. Free u. J. N. Wilson, J. Med. Chem. 7, 398 (1964).
- [50] S. A. Hiller, A. B. Glaz, V. E. Holender, L. A. Rastrighyn u. A. B. Rozenblat, Khim. Farm. Zh. 11, 18 (1972).