

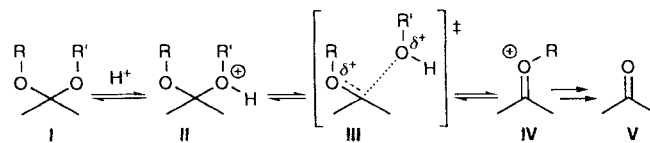
- [8] J. C. Hanvey, N. J. Peffer, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Brukenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, 258, 1481–1485.
- [9] C. B. Reese, *Tetrahedron* **1978**, 34, 3143–3179.
- [10] E. Uhlmann, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 1688–1703.
- [11] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 426–427; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 436–437; Y. Hayakawa, M. Hirose, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5551–5555.
- [12] R. G. Shea, P. Ng, N. Bischofberger, *Nucleic Acid Res. Future Dev. Proc. Symp.* **1990**, 18, 4859–4866; T. L. Trapane, R. I. Hogrefe, M. A. Reynolds, L.-S. Kan, P. O. P. Ts'O, *Biochemistry* **1996**, 35, 5495–5508.
- [13] B. Ganem, Y.-T. Li, J. D. Henion, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1445–1448.

## Katalytische Antikörper als Sonden für die Evolution von Enzymen: Modellierung einer frühen Glycosidase\*\*

Doron Shabat, Subhash C. Sinha\*, Jean-Louis Reymond\* und Ehud Keinan\*

Enzyme weisen eine bemerkenswerte katalytische Wirksamkeit auf, weil ihre Funktion auf mehreren gut abgestimmten Prinzipien beruht. Dies ist ein Ergebnis der Evolution und der natürlichen Auslese. Man kann sich fragen, wie die katalytische Wirksamkeit bei den frühen Enzymen entstanden ist. Um diese Frage beantworten zu können, muß man wissen, welche dieser Prinzipien bei einem heutigen Enzym unabhängig von den übrigen die Katalyse auslösen können. Katalytische, maßgeschneiderte Antikörper<sup>[1]</sup> bieten eine einzigartige Möglichkeit, *experimentell* Hypothesen über frühe Enzyme zu prüfen. Bei katalytischen Antikörpern lassen sich die einzelnen Parameter der Katalyse viel leichter getrennt untersuchen als bei den hochentwickelten Enzymen, bei denen sie gleichzeitig wirken. So lieferten die Untersuchungen von Schultz et al. einen Einblick in die Evolution der katalytischen Fähigkeiten von Proteinen<sup>[2]</sup>. Wegen der Bedeutung von Kohlenhydraten in den frühen Stadien der Evolution ist die Entstehung der Glycosidase-Aktivität von besonderem Interesse. Wir berichten hier über die von Antikörpern katalysierte Hydrolyse nichtaktivierter cyclischer Ketale. Diese Reaktion ist eng mit der Spaltung der glycosidischen Bindung verwandt<sup>[3]</sup>. Die katalytischen Antikörper können deshalb als mechanistische Analoga der Glycosidasen betrachtet werden. Bei diesen Antikörpern spielen die allgemeine Säurekatalyse und/oder Spannungseffekte nur eine untergeordnete Rolle, während sie für die Aktivität der heutigen Glycosidasen von zentraler Bedeutung sind<sup>[4]</sup>. Die einfache Ladungskomplementarität erweist sich als der wichtigste Faktor für die katalytische Aktivität der Antikörper.

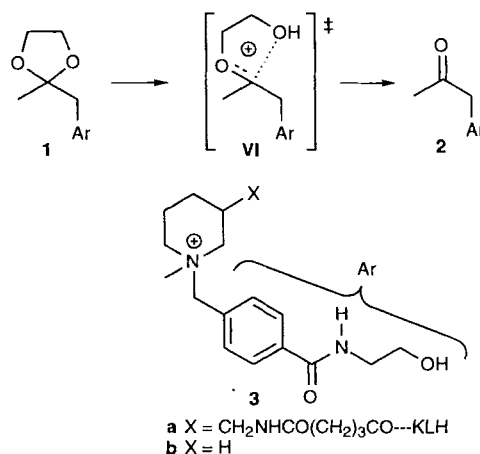
Bei der Hydrolyse von Ketalen **I** wird zunächst ein Sauerstoffatom protoniert und anschließend eine C-O-Bindung heterolytisch gespalten, was zu dem Ion **IV** als Intermediat und letztlich zur Carbonylverbindung **V** führt (Schema 1). Im Falle von



Schema 1. Mechanismus der Hydrolyse eines Ketals unter sauren Bedingungen.

Ketalen und Acetalen mit einer aktivierten Abgangsgruppe (z. B. R' = Aryl) ist der erste Schritt der geschwindigkeitsbestimmende; ihre Hydrolyse läßt sich mit schwachen Säuren katalysieren (allgemeine Säurekatalyse)<sup>[5, 6]</sup>. Im Unterschied dazu handelt es sich im Falle nichtaktivierter Ketale (z. B. R' = Alkyl)<sup>[7]</sup> bei der O-protonierten Verbindung **II** um ein verhältnismäßig stabiles Intermediat, das in einer Vorgleichgewichtsreaktion entsteht. Damit ist die Spaltung der C-O-Bindung (über den Übergangszustand **III**) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Hydrolyse nichtaktivierter Ketale oder Acetale kann deshalb nicht durch schwache Säuren katalysiert werden, sondern hängt nur vom pH-Wert ab (spezifische Säurekatalyse). Dieses Reaktivitätsmuster gilt auch für die Hydrolyse der glycosidischen Bindung und ist beim Entwurf eines Biokatalysators eine besondere Herausforderung, weil eine schwache Säure allein nicht ausreicht, um die Reaktion einzuleiten.

Das Dioxolan **1**<sup>[8]</sup> wird in wäßrig-saurem Medium zum Keton **2** und Ethylenglycol hydrolysiert. Obwohl die Hydrolysegeschwindigkeit vom pH-Wert abhängt, ist sie vollkommen unempfindlich gegenüber der Art des Puffers und dessen Konzentration. Wie aus dem inversen Lösungsmittel-Isotopeneffekt ( $k_H/k_D = 0.4$ ) ersichtlich, liegt bei dieser Reaktion spezifische Säurekatalyse vor; dabei ist die Spaltung der C-O-Bindung im protonierten Intermediat **II** zum Ion **IV** geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Bei diesem Schritt weitet sich der protonierte Dioxolanring auf und die positive Ladung bewegt sich vom austretenden Sauerstoffatom zum verbleibenden. Damit ist das Piperidinium-Kation **3** ein Analogon zum Übergangszustand **VI** (Schema 2): Das positiv geladene Stickstoffzentrum in **3** ent-



Schema 2. Übergangszustand **VI** und Analogon **3** zum Übergangszustand für die Hydrolyse des Ketals **1** zum Keton **2**.

spricht dem entstehenden Zentrum im Ion **IV**, der sechsgliedrige Piperidiniumring dem aufgeweiteten Fünfring von **VI**.

Wir prüften 46 gegen **3a** gerichtete monoklonale Antikörper<sup>[6a]</sup> auf katalytische Wirksamkeit in der Hydrolyse von **1**. Zwei von ihnen, die Antikörper 14D9 und 20B11<sup>[9]</sup>, katalysieren die Reaktion. In beiden Fällen gehorchte die Katalyse der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 1) und ließ sich durch das

[\*] Prof. J.-L. Reymond, Prof. E. Keinan, S. C. Sinha  
Department of Molecular Biology and Skaggs Institute of Chemical Biology  
The Scripps Research Institute  
10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Telefax: Int. + 619/784-7313  
E-mail: Keinan@Scripps.edu

Prof. E. Keinan, D. Shabat  
Department of Chemistry, Technion – Israel Institute of Technology  
Technion City, Haifa 32000 (Israel)

[\*\*] J.-L. R. dankt den US National Institutes of Health (GM 49736). E. K. dankt der US-Israel Binational Science Foundation und PharMore Biotechnologies für finanzielle Unterstützung.

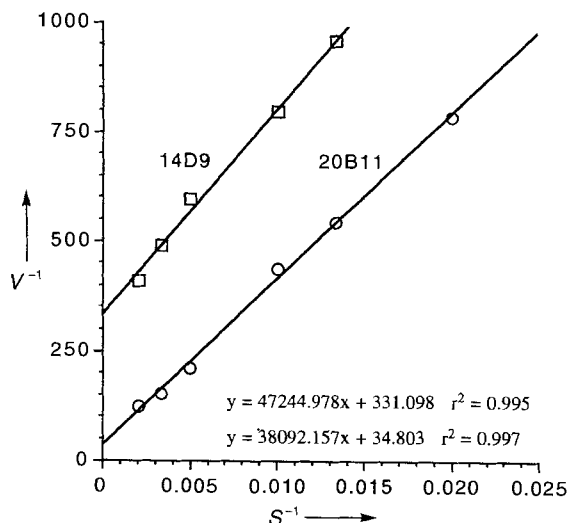


Abb. 1. Lineweaver-Burk-Diagramme der Hydrolyse des Ketals **1**, die von den Antikörpern 14D9 (Quadrat) und 20B11 (Kreise) katalysiert wird; Reaktionsbedingungen siehe Lit. [10];  $V$  = Hydrolysegeschwindigkeit (in  $\mu\text{M h}^{-1}$ ),  $S$  = Konzentration des Substrats (in  $\mu\text{M}$ ).

Hapten **3b** vollständig inhibieren. Dies beweist, daß die katalytischen Reaktionen an den Bindungsstellen dieser Antikörper ablaufen<sup>[10]</sup>.

Bei den meisten Glycosidasen spielt die räumliche Komplementarität zum Übergangszustand eine Schlüsselrolle bei der Katalyse, weil diese Komplementarität eine Spannung im Substrat bewirkt<sup>[11]</sup>. Wir versuchten, eine ähnliche selektive Erkennung des aufgeweiteten Dioxolanrings im Übergangszustand **VI** zu erzielen, indem wir für die Induktion der Antikörper ein Sechsring-Analogon zum Übergangszustand verwendeten. Um die Wirkung dieser räumlichen Komplementarität auf die Katalyse abschätzen zu können, untersuchten wir die sechs- und siebengliedrigen Ketal-Analoga des Substrats **1**, das Dioxan **4** und das Dioxepan **5**.

Beide Antikörper katalysieren die Hydrolyse von **4**. Im Vergleich zur Hydrolyse von **1** war allerdings die katalytische Wirksamkeit vermindert (Tabelle 1); dies galt sowohl für die Ge-

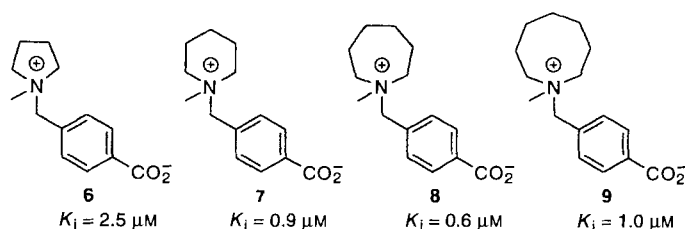
Tabelle 1. Kinetische Daten der von Antikörpern katalysierten Hydrolyse der Ketale **1**, **4** und **5** ( $K_m$  und  $K_{TS}$  in  $\mu\text{M}$ ).

Anti- körper	<b>1</b>			<b>4</b>			<b>5</b>		
	$K_m$	$k_{cat}/k_{uncat}$	$K_{TS}$	$K_m$	$k_{cat}/k_{uncat}$	$K_{TS}$	$K_m$	$k_{cat}/k_{uncat}$	$K_{TS}$
14D9	143	113	1.3	250	43	5.8	30	4	7.8
20B11	1095	870	1.3	403	106	3.8	376	76	5.0

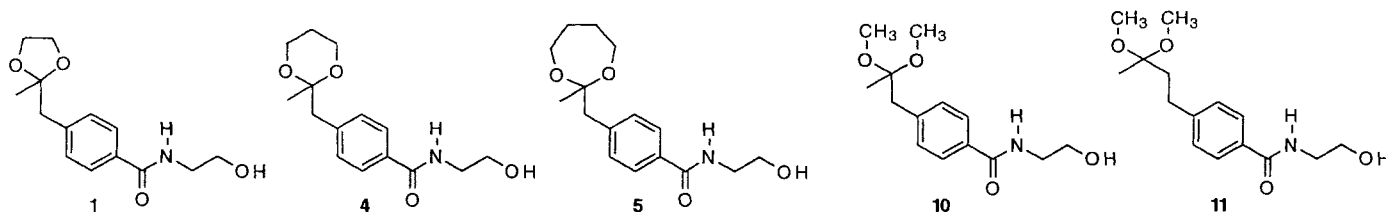
schwindigkeit ( $k_{cat}/k_{uncat}$  ist bei 14D9 um den Faktor 2.6, bei 20B11 um den Faktor 8.2 kleiner) als auch für die Bindung der Substanz im Übergangszustand ( $K_{TS}$  steigt um das 4.5fache bei 14D9 und um das 2.9fache bei 20B11). Dieser Trend setzt sich

beim siebengliedrigen Substrat **5** mit einer weiteren Abnahme von  $k_{cat}/k_{uncat}$  und einer Zunahme von  $K_{TS}$  im Vergleich zu **1** fort:  $k_{cat}/k_{uncat}$  wird um den Faktor 28 bei 14D9 und um den Faktor 12 bei 20B11 kleiner,  $K_{TS}$  steigt um das 6fache bzw. 3.8fache.

Wir wählten den Antikörper 14D9 für weitere Untersuchungen, da er bei der Katalyse ausgeprägter auf die Form des Substrats reagierte als der Antikörper 20B11. Wie gut der Antikörper 14D9 und der Piperidiniumring räumlich zueinander passen, schätzten wir ab, indem wir die kompetitive Inhibition durch Haptenhomologe zunehmender Ringgröße maßen. Um eine bequeme kinetische Analyse zu ermöglichen, wurde die Wirksamkeit der Bindung bei allen Inhibitoren dadurch vermindert, daß die 2-Hydroxyethylamid-Seitenkette in eine Carboxylatgruppe umgewandelt wurde<sup>[12]</sup>. Der Antikörper 14D9 band das Pyrrolidinium-Ion **6** ( $K_i = 2.5 \mu\text{M}$ )<sup>[12]</sup> schwächer als das Piperidinium-Ion **7** ( $K_i = 0.9 \mu\text{M}$ )<sup>[12]</sup> und unterschied kaum zwischen **7** und dessen höheren Homologen, dem Azepinium-Ion **8** ( $K_i = 0.6 \mu\text{M}$ ) und dem Ion **9** ( $K_i = 1.0 \mu\text{M}$ )<sup>[13]</sup>.



Das aktive Zentrum des Antikörpers 14D9 weist eine ionisierbare Gruppe, vermutlich eine Aspartat- oder Glutamat-Seitenkette auf, die zur allgemeinen Säurekatalyse fähig ist<sup>[14]</sup>. Der kinetische Lösungsmittel-Isotopeneffekt bei der 14D9-katalysierten Hydrolyse von **1** ist ein Beleg dafür, daß die Reaktion spezifisch säurekatalysiert ist ( $k_{catH}/k_{catD} = 0.4$ ) und daß die Proteinseitenkette nicht als allgemeine Säure an der Katalyse beteiligt ist. Die Seitenkette des Antikörpers könnte als eine elektrostatische Punktladung wirken, die den Übergangszustand stabilisiert<sup>[15]</sup>. Das Substrat **4** ( $K_m = 250 \mu\text{M}$ ) kann man als ein neutrales Analogon des Haptens betrachten; es band den Antikörper 14D9 ungefähr  $10^4$ mal schwächer als das Hapten **3b** ( $K_i$  ca.  $10^{-8} \text{ M}$ ). So werden die Substrate **1**, **4** und **5** im Übergangszustand der Hydrolyse, deren Affinitäten durch  $K_{TS}$  gegeben sind, ungefähr  $10^2$ mal fester gebunden als die Substrate selbst. Diese Auswirkungen auf die Bindung der Substanz im Übergangszustand und auf die des Haptens sind viel deutlicher als die Effekte durch die Änderung der Molekülgestalt. Somit hängt die Katalyse von Ketalen durch den Antikörper 14D9 vor allem von der elektrostatischen Komplementarität ab. Dies ist in Einklang mit der Tatsache, daß das Dimethylketal **10** ( $k_{cat}/k_{uncat} = 70$ ,  $K_m = 70 \mu\text{M}$ ) und sein Homologes **11** ( $k_{cat}/k_{uncat} = 430$ ,  $K_m = 230 \mu\text{M}$ )<sup>[16]</sup> ebenfalls Substrate des Antikörpers 14D9 sind<sup>[17]</sup>. Die Gestalt des Substrats spielt für die Bildung eines katalytisch wirksamen Komplexes mit dem Antikörper nur eine untergeordnete Rolle.



Durch ein sehr einfaches Design kann eine durch Antikörper katalysierte Hydrolyse nichtaktivierter Ketale ermöglicht werden. Die elektrostatische Komplementarität zum Übergangszustand löst die Katalyse aus, die Wirkung der räumlichen Komplementarität ist verhältnismäßig gering. Da die Hydrolyse nichtaktivierter Ketale mechanistisch eng mit der Spaltung der glycosidischen Bindung verwandt ist, wird durch diese Untersuchung die Hypothese experimentell gestützt, daß Glycosidasen zuerst als „elektrostatische“ Katalysatoren entstanden sind. Die räumliche Komplementarität und die allgemeine Säurekatalyse, auf denen die katalytische Wirkungsweise heutiger Glycosidasen beruht<sup>[1]</sup>, sind demnach erst im späteren Verlauf der Evolution aufgetreten.

Eingegangen am 20. Juni 1996 [Z 9247]

**Stichworte:** Enzymmodelle · Katalytische Antikörper · Ketale

- [1] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, 269, 1835.
- [2] P. A. Patten, N. S. Gray, P. L. Yang, C. B. Marks, G. J. Wedemayer, J. J. Bonifacio, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Science* **1996**, 271, 1086.
- [3] a) A. J. Kirby, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1987**, 22, 283; b) M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1171; c) P. Deslongchamps, *Stereochemical Effects in Organic Chemistry (Organic Chemistry Series, Vol. 1 (Hrsg.: J. E. Baldwin))*, Pergamon, Oxford, **1989**.
- [4] Die Bindung an das Enzym verursacht im glycosidischen Substrat eine Spannung, so daß eine Katalyse durch Carbonsäuren ermöglicht wird.
- [5] a) T. H. Fife, S. H. Jaffe, R. Natarajan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7646; b) T. H. Fife, E. Anderson, *ibid.* **1971**, 93, 6610.
- [6] a) J.-L. Reymond, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1711; b) J. Yu, L. C. Hsieh, L. Kochersperger, S. Yonkovich, J. S. Stephens, M. A. Gallop, P. G. Schultz, *ibid.* **1994**, 106, 327 bzw. **1994**, 33, 339.
- [7] E. Anderson, T. H. Fife, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 7163.
- [8] Alle Ketale wurden in einer vierstufigen Synthese aus Methyl-(4-brommethyl)benzoat hergestellt: Doppelte Umsetzung mit Divinylcuprat [hergestellt aus Vinylmagnesiumbromid (2 Äquiv.) und Kupfer(I)-iodid (1 Äquiv.) in THF bei -30°C] lieferte Methyl-(4-allyl)benzoat. Wacker-Oxidation bei Raumtemperatur mit PdCl<sub>2</sub> (0.1 Äquiv.) und CuCl<sub>2</sub> (1.5 Äquiv.) in DMF/H<sub>2</sub>O (2/1) führte zu (4-Methoxycarbonyl)phenylacetone. Dessen Ketalisierung wurde unter Rückfluß in Benzol in Gegenwart des Diols (Ethylenglycol, 1,3-Dihydroxypropan, 1,4-Dihydroxybutan) und katalytischer Mengen von *p*-Toluolsulfonsäure ausgeführt. Das Dimethylketal **10** wurde durch Reaktion des entsprechenden Ketons mit Trimethylorthoformiat und Methanol in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure erhalten. Schließlich wurde der Methylster durch Erhitzen in 2-Aminoethanol in das 2-Hydroxyethylamid überführt (100°C, 2 h).
- [9] A. Koch, J.-L. Reymond, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 803.
- [10] Alle Reaktionen wurden bei 24°C mit 5 µM Antikörper und 50–2000 µM Substrat in einer kochsalzhaltigen Lösung durchgeführt, die mit 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan gepuffert war (50 mM Puffer, 50 mM NaCl, pH 6.0). Das Fortschreiten der Reaktion wurde durch HPLC (Hitachi L-6200A) verfolgt; λ = 254 nm, C18-RP-Säule (25 cm × 2.2 mm, 5 µm), Eluens 20% Acetonitril in Wasser (Retentionszeiten in Minuten: **2**: 5.2, **1**: 9.83, **4**: 9.95, **5**: 23.06).
- [11] a) B. Ganem, G. Papandreou, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8984; b) H. Suga, N. Tanimoto, A. J. Sinskey, S. Masamune, *ibid.* **1994**, 116, 11197.
- [12] G. K. Jahangiri, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11264.
- [13] Die Verbindungen **8** und **9** wurden hergestellt durch Alkylierung von Hexamethylenimin (Heptamethylenimin) mit Methyl-(4-brommethyl)benzoat und anschließende Quaternisierung mit Iodmethan sowie Verseifung mit wäßriger NaOH. Die Produkte wurden durch präparative RP-HPLC (Wasser-Acetonitril-Gradient) gereinigt und als Trifluoracetat-Salze (farblose Feststoffe) erhalten. Die Konstanten der kompetitiven Inhibierung von **8** und **9** wurden nach den Vorschriften für **6** und **7** gemessen [12].
- [14] a) J.-L. Reymond, G. K. Jahangiri, C. Stoudt, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3909; b) S. C. Sinha, E. Keinan, J.-L. Reymond, *ibid.* **1993**, 115, 4893; c) D. Shabat, H. Itzaky, J.-L. Reymond, E. Keinan, *Nature* **1995**, 374, 143.
- [15] Der Antikörper 14D9 wurde kloniert. Seine Aminosäuresequenz weist fünf Aspartat- oder Glutamatreste in den CDR-Bereichen auf: J.-L. Reymond, C. F. Barbas, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [16] S. C. Sinha, E. Keinan, J.-L. Reymond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11910.
- [17] Die Hydrolyse von **10** wurde bei 24°C, pH 7.4, die von **11** bei 0°C, pH 7.55 durchgeführt. Beide wurden in 50 mM Phosphat und 100 mM NaCl durchgeführt.

## Ein prototypisches Reagens für die Synthese substituierter Hydrazine\*\*

Uno Mäeorg, Leif Grehn und Ulf Ragnarsson\*

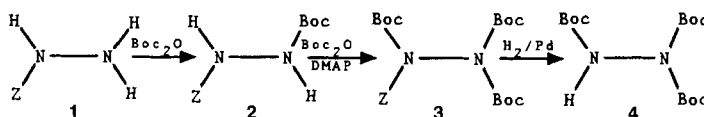
Professor Ivar Ugi zum 65. Geburtstag gewidmet

Substituierte Hydrazine sind wertvolle Vorstufen von Heterocyclen und Bestandteil vieler Pharmazeutika, Agrochemikalien, Farbstoffe und ähnlicher Produkte. Die direkte Alkylierung von Hydrazin führt gewöhnlich zu Mischungen aus mono-, di- und trisubstituierter Produkten, deren Gruppen alle am gleichen Stickstoffatom lokalisiert sind<sup>[1]</sup>, was ihre Reinigung oft schwierig macht. Zwar wurden viele andere Methoden zur Herstellung von mono- und dialkylierten Hydrazinen entwickelt<sup>[1]</sup>, doch fehlt immer noch eine einfache, allgemeine Methode. Dies bildet den Hintergrund der vorliegenden Arbeit, in der hierfür ein dreifach geschütztes prototypisches Reagens entwickelt und untersucht wurde.

Der Gedanke, acylierte Hydrazine zu alkylieren, ist nicht neu<sup>[1]</sup>, aber nur in wenigen Arbeiten wurden moderne Methoden eingesetzt<sup>[2]</sup>. Młotkowska und Zwierzak gewannen einfache Alkylhydrazine durch Alkylierung von Diphenylphosphinsäurehydrazid mit Bromiden unter Phasentransferkatalyse (PTK) in siedendem Benzol und Entschützung in siedender HCl<sup>[3a]</sup>. In einer ähnlichen Methode wurde später das dreifach geschützte Derivat Aceton-*N*-(diethoxyphosphoryl)hydrazon<sup>[3b]</sup> verwendet. Nach Einführung eines zusätzlichen Acetylierungsschrittes wurde die selektive Alkylierung am zweiten Stickstoffatom mit dem ersten Reagens möglich, wodurch nach Entfernung beider Schutzgruppen *N,N'*-dialkylierte Derivate zugänglich wurden<sup>[3c]</sup>. Analog sollten triacylierte Derivate wie **4** ähnlich alkyliert werden können wie die beiden genannten Hydrazinreagentien, wobei eine der Boc-Gruppen der Imidodicarbonatfunktion besonders säurelabil ist<sup>[4]</sup> und somit nach Entschützen die selektive Alkylierung am anderen Stickstoffatom ermöglichen sollte.

Wir haben früher die Anwendung der Boc-Schutzgruppe für Aminofunktionen erweitert<sup>[5]</sup> und dabei eine effiziente Synthese von HNBoc<sub>2</sub><sup>[5c,e]</sup> entwickelt. Diese Verbindung wurde zur Herstellung von Aminen, darunter <sup>15</sup>N-markierten, eingesetzt. Nun haben wir das Reagens **4** aus Z-Hydrazin **1**, das aus dem Hydrochlorid<sup>[6]</sup> freigesetzt wurde, hergestellt und mit Boc<sub>2</sub>O in Gegenwart von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) umgesetzt<sup>[7]</sup>. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Reaktion in zwei Schritten durchgeführt wird, d. h. unter Bildung von **2**, bevor DMAP zugegeben wird (Schema 1).

Rohes **3** wurde als Öl erhalten, das nach katalytischer Hydrogenolyse direkt kristallines **4** in einer Gesamtausbeute von 82% gab. Es ist längere Zeit stabil. Mit vielen Reagentien wird **4** unter unterschiedlichen Phasentransferbedingungen in Benzol bei Raumtemperatur rasch zu **5** alkyliert. Obwohl die Reaktionsbedingungen noch nicht optimiert wurden, machen die



Schema 1. Synthese von **4**. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl.

[\*] Dr. U. Ragnarsson, Dr. U. Mäeorg, Dr. L. Grehn  
Department of Biochemistry, University of Uppsala, Biomedical Center  
PO Box 576, S-75123 Uppsala (Schweden)  
Telefax: Int. +18552139  
E-mail: URBKI@BMC.UU.SE

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Swedish Natural Science Research Council, von der National Agency for Higher Education, vom National Board for Industrial and Technological Development und von Astra Draco AB gefördert.