

## 6. Untersuchungen über einen immunochemischen Vergleich zwischen Ring- und Pseudoringverbindungen

von J. Tomcsik, H. Schwarzweiss, Martha Trissler und H. Erlenmeyer.

(24. XI. 48.)

Wir haben in einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> auf das Problem der Ähnlichkeit hingewiesen, das aus Beobachtungen abzuleiten ist, die zeigen, dass zwischen einer Ringverbindung und einer entsprechenden „Pseudoring“-verbindung häufig in den Eigenschaften eine Verwandtschaft besteht. Diese Beziehung wird verständlich durch die Strukturähnlichkeit, die formelmässig zum Ausdruck kommt, wenn man die Seitenkette der Pseudoringverbindung unter Berücksichtigung der Valenzwinkel als Pseudoring schreibt<sup>2)</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird die Frage, ob die zwischen Ring- und Pseudoringverbindungen bestehende Ähnlichkeit sich durch immunochemische Versuche charakterisieren lässt, einer experimentellen Prüfung zugeführt.

Die Möglichkeit, durch einen immunochemischen Vergleich chemischer Verbindungen eine theoretisch begründete Ähnlichkeit experimentell zu überprüfen, wurde durch die Ergebnisse verschiedener früherer Untersuchungen<sup>3)</sup> belegt, bei denen Verbindungen, die sich nur in einem Element der gleichen Gruppen des periodischen Systems oder in isosteren Gruppen unterscheiden, auf ihre immunochemische Verwandtschaft geprüft worden waren. Die bei solchen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse haben dargetan, dass das Differenzierungsvermögen, wie es sich aus solchen immunochemischen Versuchen ableiten lässt, mit dem aus Isomorphieuntersuchungen zu gewinnenden Differenzierungsvermögen der Krystalle zu vergleichen ist<sup>4)</sup>. In diesem Sinne können immunochemische Versuche als eine wertvolle experimentelle Methode zur Bewertung von theoretisch, d. h. strukturchemisch begründeten Ähnlichkeitsbeziehungen verwendet werden.

An Verbindungen, die nach dem Ring-Pseudoring-Ähnlichkeitsprinzip zu vergleichen sind, wählten wir 6-Aminotetralin (I), p-Aminophenylpropyläther (II) und p-Aminobenzyl-äthyläther (III).

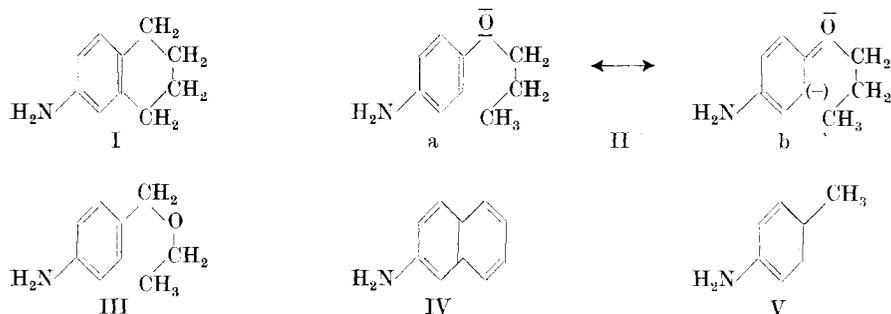
<sup>1)</sup> E. Sorkin, W. Krähenbühl und H. Erlenmeyer, *Helv.* **31**, 65 (1948).

<sup>2)</sup> Siehe z. B. E. C. Dodds, *Proc. Roy. Soc. (London)* [B] **127**, 140 (1939), *Nature* **148**, 142 (1941); C. Mentzer, *Bl.* **1946**, 271.

<sup>3)</sup> H. Erlenmeyer und E. Berger, *Biochem. Z.* **255**, 429 (1932); **252**, 22 (1932); siehe auch L. Pauling, *Chem. Eng. News* **24**, 1064 (1946); D. Pressman, J. H. Bryden und L. Pauling, *Am. Soc.* **70**, 1352 (1948).

<sup>4)</sup> H. Erlenmeyer, E. Berger und M. Leo, *Helv.* **16**, 734 (1933).

In den Pseudoringverbindungen ist hierbei gegenüber der Ringverbindung noch je eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe durch den isosteren Sauerstoff ersetzt. Als „unähnliche“ Verbindungen wurden  $\beta$ -Naphthylamin (IV) und p-Toluidin (V) mitausgewertet.



Die Versuche wurden derart durchgeführt, dass aus den Verbindungen 6-Aminotetralin (I), p-Aminophenyl-propyläther (II) und p-Aminobenzyläthyläther (III) nach dem Diazotieren durch Kuppeln mit Pferdeserum Azoproteine gewonnen wurden, mit denen Kaninchen bis zur Bildung von Antikörpern immunisiert wurden. Die Prüfung erfolgte alsdann mit Antigenen, die aus 6-Aminotetralin (I), p-Aminophenyl-propyläther (II), p-Aminobenzyl-äthyläther (III),  $\beta$ -Naphthylamin (IV) und p-Toluidin (V) nach dem Diazotieren durch Kuppeln mit Hühnerserum hergestellt worden waren. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1<sup>1)</sup>.

Zusammenfassung

der nach verschiedenen Methoden durchgeführten Präzipitin-Reaktionen.

| Immunsera gegenüber:      | Hühnerserum-Azo-Antigene mit: |                             |                            |             |                       |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|-----------------------|
|                           | 6-Amino-tetralin              | p-Amino-phenyl-propyl-äther | p-Amino-benzyl-äthyl-äther | p-Tolu-idin | $\beta$ -Naph-tylamin |
| 6-Amino-tetralin .        |                               |                             | ±                          | ±           | —                     |
| p-Amino-phenylpropyläther | ±                             |                             |                            | ±           | —                     |
| p-Amino-benzyl-äthyläther | —                             |                             |                            | —           | —                     |

1) ||||| bedeutet deutliche Präzipitation bis zu 1:3200—1:6400 des Antigens, und zwar sowohl in der Misch- wie in der Ring-Präzipitin-Reaktion.

± bedeutet eine schwache Präzipitin-Reaktion mit schmaler Zone, die nur bei manchen der immunisierten Kaninchen und nicht einmal bei jeder Blutentnahme festzustellen war. Die übrigen Zeichen geben, wie es in der serologischen Technik üblich ist, die einzelnen Zwischenstufen an.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen:

1. die zu erwartende starke Reaktion:

a) des mit dem Azoprotein aus 6-Aminotetralin und Pferdeserum erzeugten Antikörpers mit dem aus 6-Aminotetralin und Hühnerserum hergestellten Antigen;

b) des mit dem Azoprotein aus p-Aminophenyl-propyläther und Pferdeserum erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminophenyl-propyläther und Hühnerserum hergestellten Antigen;

c) des mit dem Azoprotein aus p-Aminobenzyl-äthyläther und Pferdeserum erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminobenzyl-äthyläther und Hühnerserum hergestellten Antigen.

2. die deutliche Mitreaktion:

a) des mit dem Azoprotein aus 6-Aminotetralin und Pferdeserum erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminophenyl-propyläther und Hühnerserum hergestellten Antigen;

b) des mit dem Azoprotein aus p-Aminophenyl-propyläther und Pferdeserum erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminobenzyl-äthyläther und Hühnerserum hergestellten Antigen;

c) des mit dem Azoprotein aus p-Aminobenzyl-äthyläther und Pferdeserum erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminophenyl-propyläther und Hühnerserum hergestellten Antigen.

3. die Spezifität der Reaktionen durch das Ausbleiben einer deutlichen Mitreaktion aller Antikörper mit den aus  $\beta$ -Naphtylamin und p-Toluidin mit Hühnerserum hergestellten Antigenen.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die Ring-Pseudoring-Ähnlichkeit auch in gewissen Fällen zu einer im immunochemischen Experiment erkennbaren Verwandtschaft führen kann. Der Grad der Ähnlichkeit wird in solchen Fällen wohl mit der Bevorzugung der Pseudoringstruktur gegenüber den durch die freie Drehbarkeit der Bindungen in der Seitenkette gegebenen anderen Formen dieser Gruppe zusammenhängen<sup>1</sup>). Weiterhin tragen vielleicht mesomere Grenzformen (IIb), wie sie z. B. für den p-Aminophenyl-propyläther — nicht in gleichem Masse für den p-Aminobenzyl-äthyläther — anzunehmen sind, zur Stabilisierung der Pseudoringstruktur bei.

## Experimenteller Teil.

### Herstellung der Antisera.

1500—2000 g schwere Kaninchen wurden mit verschiedenen an Pferdeserum gekuppelten diazotierten Haptenen<sup>2</sup>) in 3—4 tägigen Intervallen intravenös gespritzt. Die bei den einzelnen Injektionen verabreichte Antigenmenge betrug 1—3 cm<sup>3</sup>. Bei den fünf mit p-Aminophenyl-propyläther- bzw. mit p-Aminobenzyl-äthyläther-Pferdeserum

<sup>1</sup>) K. S. Pitzer, J. Chem. Phys. **8**, 711 (1940); H. Kuhn, J. Chem. Phys. **15**, 843 (1947).

<sup>2</sup>) Über die Arbeitsweise siehe K. Landsteiner, J. exp. Medicine **39**, 632 (1924).

immunisierten Kaninchen waren bereits 4—5 Injektionen genügend, um gegenüber dem Haptenanteil Antikörper mit genügendem Präzipitin-Titer zu produzieren. Demgegenüber erwies sich das diazotierte 6-Aminotetralin-Pferdeserum als ein schwaches Antigen, da von den 9 mit diesem Antigen immunisierten Kaninchen nur 6 Antikörper gegenüber dem homologen, an Hühnerserum gekuppelten diazotierten Hapten produzierten und der Präzipitin-Titer auch bei den letzteren ein eher mässiger war. Die Ausdehnung der Immunisierung bis auf 14 Injektionen verbesserte das Resultat nur unwesentlich. Aus jedem Kaninchen wurden während der Immunisierung mehrere Blutentnahmen vorgenommen und geprüft.

#### Technik der Präzipitin-Reaktion.

Je 0,1 cm<sup>3</sup> des unverdünnten Immunserums wurde mit 0,4 cm<sup>3</sup> der verschiedenen Verdünnungen des an Hühnerserum gekuppelten diazotierten Haptens vermengt und das Gemisch 2 Stunden lang im 37°-Wasserbad und nachher 16—20 Stunden lang im 4°-Eisschrank gehalten. Die Präzipitation wurde sowohl vor, wie nach der Eisschrankinkubation abgelesen. Zur Kontrolle wurden jeweils auch die Ringreaktion, und ausserdem in einigen Fällen auch die mit den nicht gekuppelten Haptenen durchgeführte Hemmungsreaktion eingestellt. Die Durchführung verschiedener Reaktionen, sowie die wiederholte Ablesung war um so mehr notwendig, als, wie *Landsteiner*<sup>1)</sup> nachgewiesen hatte, die serologische Spezifität der „basischen“ — unpolare Gruppen enthaltenden — Haptene keinesfalls ausgeprägt ist und signifikante Unterschiede bei der serologischen Reaktion gegenüber ähnlichen Verbindungen nur mit einer umständlichen Technik abzuklären sind.

#### Zusammenfassung.

Es wurden synthetische Antigene aus 6-Aminotetralin, p-Aminophenyl-propyläther, p-Aminobenzyl-äthyläther,  $\beta$ -Naphtylamin und p-Toluidin durch Diazotieren und Kuppeln mit Hühnerserum, sowie aus den drei erstgenannten Verbindungen durch Diazotieren und Kuppeln mit Pferdeserum, hergestellt. Durch Immunisieren mit den aus Pferdeserum und diazotiertem 6-Aminotetralin, p-Aminophenyl-propyläther und p-Aminobenzyl-äthyläther erhaltenen Antigenen wurden Antikörper erzeugt. Diese Antikörper wurden mit den aus Hühnerserum und den erwähnten Aminen gewonnenen Antigenen geprüft, wobei einerseits die zu erwartenden starken Reaktionen der drei Immunsera jeweils mit dem homologen Antigen gefunden wurden, sodann aber ein deutliches Mitreagieren des mit dem Azoprotein aus 6-Aminotetralin erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminophenyl-propyläther hergestellten Antigen, des mit dem Azoprotein aus p-Aminophenyl-propyläther erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminobenzyl-äthyläther hergestellten Antigen und des aus p-Aminobenzyl-äthyläther erzeugten Antikörpers mit dem aus p-Aminophenyl-propyläther hergestellten Antigen zu beobachten war.

Universität Basel, Hygienische Anstalt und Anstalt für  
anorganische Chemie.

<sup>1)</sup> Siehe *K. Landsteiner*, *Serological Reactions*, Cambridge 1946.