

## Die Grundstruktur der Glykoproteine und ihr enzymatischer Abbau\*

Von ALFRED GOTTSCHALK

Max-Planck-Institut für Virusforschung, 74 Tübingen (BRD)

### Summary

Covalent carbohydrate-protein compounds are widely distributed in animals, both in vertebrates and invertebrates. Recently their occurrence in plants has been shown. The fundamental structure of all members of this group is the same. They have as a core a polypeptide chain or chains; to the functional groups of the side-chains of constituent amino acids are linked covalently carbohydrate chains. According to the composition and structure of the carbohydrate chain two classes of carbohydrate-protein compounds may be distinguished: Firstly, proteoglycans; their carbohydrate moiety consists of small repeating units, usually a disaccharide residue, arranged in a linear structure of mol. wt. about 20,000 to 35,000. Secondly, glycoproteins; their carbohydrate moiety contains in most cases an amino sugar (glucosamine and/or galactosamine) and one or more of the following monosaccharides: D-galactose, D-mannose, L-fucose, D-glucose, sialic acid. The carbohydrate chain is nearly always branched, of low mol. weight and so far the presence of a repeating unit has not been reported.

One of the simplest, and for this reason best understood, glycoproteins is ovine submaxillary mucoprotein (OSM). The chemistry and structure of its carbohydrate moiety, the type of linkage between carbohydrate and the polypeptide chain, its physico-chemical properties and the enzymes involved in its degradation are described.

Zucker-Eiweiß-Verbindungen sind in der Natur weit verbreitet. In tierischen Organismen, sowohl in den Vertebraten als auch in den Invertebraten, sind sie fast ausnahmslos vorhanden. In den letzten Jahren sind eindeutige Beweise erbracht worden, daß auch in den Pflanzen Glykoproteine gebildet werden. Es erscheint bedeutsam und interessant zugleich, daß in den pflanzlichen Glykoproteinen zum Teil die gleichen, zum Teil sehr ähnliche Zucker wie in den tierischen Organismen vorkommen<sup>1</sup>, und daß auch die Bindung zwischen Eiweiß und Zucker in Pflanzen und Tieren die gleiche ist<sup>2</sup>.

In tierischen Organismen sind sie als Grundsubstanz des Bindegewebes vorhanden; sie stellen die Mehrzahl der Plasmoproteine dar, und sie finden sich auch in anderen Körperflüssigkeiten. Sie sind die Hauptbestandteile der schleimigen Sekrete, denen sie eine ganz einzigartige Eigenschaft, die Zähflüssigkeit, verleihen. Sie bilden auch Bestandteile der Mosaikstruktur der Zellmembran der animalischen Zelle.

Die Zucker-Eiweiß-Verbindungen sind für die Erhaltung des Lebens unentbehrlich. In den Tieren kleiden sie die großen Höhlen aus, die mit der Außenwelt in Verbindung stehen, und versehen sie mit einem außerordentlich wirksamen Schutz. Unser Atmungssystem hat an den Zellen, die dem Lumen zugewandt sind, Cilien, d. h. kleine Flimmerhaare. Über diese bewegt sich von den kleinen Bronchien zum Rachen hin ein ununterbrochener Strom von Mucus, der in den Schleimzellen des Bronchialgewebes gebildet wird. In diesem Schleim verfangen sich Fremdkörper, Bakterien und die meisten Viren unentrinnbar, so daß für alle praktischen Zwecke die Alveolen, die das eigentliche Lungengewebe bilden, steril sind. Ein anderes Beispiel ist der kurze Schleimpfropf im collum uteri, der höchst wirkungsvoll den Uterus gegen die Flora der Scheide abschirmt. Die schleimigen Sekrete funktionieren auch als Schmiermittel für die Gelenke, sie sind Gleitmittel im Magen-Darm-Kanal, in der Vagina; sie wirken auch als Transporteure (Carriers genannt) für Vitamine, Hormone, Metalle und andere Substanzen. Sie regulieren den Wassergehalt der Gewebe und die Diffusion der Metaboliten im extrazellulären Raum. Auch spielen sie eine Rolle als Rezeptoren an Zelloberflächen, als zellspezifische Antigene, und sind wahrscheinlich für viele andere Funktionen verantwortlich, die wir zur Zeit noch nicht kennen.

Die Zucker-Eiweiß-Verbindungen sind, so weit wir wissen, alle nach einem Grundschema gebaut: Sie haben eine Polypeptidkette, und an die funktionellen Gruppen der Seitenketten von konstituierenden Aminosäuren sind Zuckergruppen hauptvalenzartig gebunden. Je nach der Zusammensetzung und Struktur dieser Zuckergruppen kann man die Zucker-Eiweiß-Verbindungen in zwei Hauptklassen einteilen<sup>3</sup>: Die eine Klasse, auch Proteoglykane genannt, ist charakterisiert durch eine kurze, sich wiederholende Zuckereinheit, vielfach ein Disaccharid. Diese Disaccharide bestehen meist aus Hexosamin und Hexuronsäure. Das Hexosamin ist entweder sulfatiertes N-Acetylgalaktosamin, wie in den Chondroitinsulfaten, oder N-Acetylglucosamin, wie in Hyaluronsäure. Die Uronsäure ist meistens D-Glukuronsäure, doch kommt auch L-Iduronsäure vor. Etwa 50 bis 80 solcher Disaccharide sind in einer linearen Struktur angeordnet (Mol.-Gew. 20000 bis 35000) und über ein

\* Vorgetragen am Symposium über Biopolymere, veranstaltet vom Schweizerischen Chemiker-Verband, 26. bis 28. August 1970 in Bern.

<sup>1</sup> H. LIS, N. SHARON und E. KATCHALSKY, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 684.

<sup>2</sup> H. LIS, N. SHARON und E. KATCHALSKY, *Biochim. Biophys. Acta* 192 (1969) 364.

<sup>3</sup> A. GOTTSCHALK, in *Glycoproteins. Their Composition, Structure and Function* (Ed. A. GOTTSCHALK), Elsevier, Amsterdam 1966, S. 20.

Trisaccharid der Anordnung 3-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-4-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl an Serin- und Threonin-Reste des Polypeptids gebunden. Viele solcher Heteropolysaccharide sind an der Polypeptidkette(n) angeheftet.

Die andere Klasse, die eigentlichen Glykoproteine, haben keine kurzen, serienmäßig angeordneten «repeating units», und das Molekulargewicht einer Kohlehydratgruppe dieser Klasse mag sich zwischen 180 und etwa 2500 bewegen. Fast alle Zucker-Eiweiß-Verbindungen dieser Klasse haben verzweigte Kohlenhydratgruppen. Die häufigsten Zuckerkomponenten der Glykoproteine sind D-Galaktose, D-Mannose, L-Fukose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalaktosamin und Sialinsäure. D-Glucose findet sich selten in diesen Substanzen. Die Molekulargewichte der Glykoproteine schwanken innerhalb weiter Grenzen, von weniger als  $2 \times 10^4$  bis zu mehr als  $1 \times 10^6$ . Einige Glykoproteine haben nur eine Kohlenhydratgruppe, z. B. Ovalbumin, andere haben 800 oder mehr; einige haben Mono- oder Disaccharide als prosthetische Gruppen, wie z. B. Kollagen und Schaf-Submaxillaris-Glykoprotein, andere, wie z. B. die menschlichen Blutgruppensubstanzen, haben etwa 185 individuelle Kohlenhydratgruppen mit je 14 bis 16 Monosaccharidresten als Zuckerbestandteile<sup>3</sup>.

Eine große Schwierigkeit in der Strukturaufklärung der Kohlenhydratgruppen eines Glykoproteins ist darin gelegen, daß die chemische Zusammensetzung der Kohlenhydratgruppen innerhalb eines Moleküles und der Kohlenhydratgruppen verschiedener Moleküle einer Spezies nicht identisch sind. Diese Situation ist bei fast allen gründlich untersuchten Glykoproteinen festgestellt worden. Sie beruht, wie kürzlich eingehend besprochen worden ist<sup>4</sup>, auf der Tatsache, daß bei der Biosynthese der Kohlenhydratgruppen die Sequenz der Monosaccharidreste nicht durch einen Template-Mechanismus wie bei der Peptidsynthese sichergestellt ist, sondern durch Enzymspezifität geregelt wird, d. h. Spezifität der Transferasen, die den Zuckerrest von dem aktivierten Zuckernukleotid auf eine bestimmte Aminosäure des Polypeptids übertragen oder eine schon vorhandene Kohlenhydratkette verlängern oder verzweigen. Dieser Typ der Biosynthese verläuft nicht fehlerfrei. Auch finden sich oftmals, wie dies für das Kollagen und die spezifischen menschlichen Blutgruppensubstanzen erwiesen ist, unvollständig synthetisierte Kohlenhydratgruppen. Diese Heterogenität erschwert beträchtlich die Anwendung der klassischen Methoden der Strukturanalyse von Oligo- und Polysacchariden; denn die Fraktionierung durch Säulenchromatographie von kurzen Glykopeptiden, die durch proteolytische Verdauung des intakten Glykoproteins gewonnen werden, führt zu einer großen Anzahl von Gipfeln. Entsprechend dieser Vielzahl ist die Ausbeute an reiner Substanz innerhalb eines Gipfels sehr geringfügig.

<sup>4</sup> A. GOTTSCHALK, *Nature* 222 (1969) 452.

Mein Laboratorium hat sich während der letzten 12 Jahre mit einem Glykoprotein beschäftigt, das aus den submaxillaren Drüsen von Schafen gewonnen wird. Wir nennen es deshalb auch OSM, *ovine submaxillary mucin*. Es war kein Zufall, daß ich mich dem Studium dieses Mucins zuwandte. Sir MACFARLANE BURNET, Director of the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, in dem ich 20 Jahre lang Mitarbeiter war, hatte in den vierziger Jahren zwei bedeutsame Entdeckungen gemacht. Es ist meine persönliche Meinung, daß diese beiden Entdeckungen viel dazu beigetragen haben, daß die molekulare Struktur der Glykoproteine, ein in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts sehr vernachlässigtes Gebiet, erneut von Biochemikern und Chemikern in systematischer Weise angegangen wurde (siehe GOTTSCHALK, 1966)<sup>5</sup>. BURNET beobachtete zunächst, daß viele schleimigen Sekrete, wie Speichel, Bronchialschleim, Ovariencyst-Mucin, Submaxillaris-Mucin von Schafen, Eierklar, die durch Influenza-Viren bewirkte Agglutination von roten Blutkörperchen hemmen. Dann zeigte er, daß die biologische Aktivität der Schleimstoffe ebenso wie die Virus-bedingte Hämagglutination durch vorherige Behandlung dieser Materien mit lebenden Influenza-Viren oder mit einem in der Kulturflüssigkeit von *Vibrio cholerae* vorhandenem Enzym verlorengelht<sup>6</sup>. Die Hemmsubstanzen in den schleimigen Sekreten wurden bald als Glykoproteine<sup>7</sup> (anfänglich Mucoproteine genannt) und das Enzym im Jahre 1957 als Neuraminidase<sup>8</sup> erkannt und seine Wirkungsweise definiert. An dieser Entwicklung waren vornehmlich die Laboratorien von GUNNAR BLIX in Uppsala, von ERNST KLENK in Köln und das BURNETSche Institut in Melbourne beteiligt. Einzelheiten dieser interessanten Entwicklung sind in meiner Monographie *The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances*, Cambridge University Press, 1960, beschrieben.

Wie erwähnt, studierte mein Laboratorium hauptsächlich das in dem Sekrete der Schafs-Submaxillaris-Drüsen enthaltene Glykoprotein OSM. Dieses Glykoprotein ist der wirkungsvollste Hemmer der Influenza-Virus-Hämagglutinine; noch in einer Verdünnung von  $1:10^6$  hemmt es die Hämagglutination<sup>9</sup>. Im Laufe der Jahre haben wir das Isolier- und Reinigungsverfahren mehr und mehr verbessert, und das von uns in den letzten Jahren benutzte Verfahren hat ein Präparat ergeben, das sich in der Ultrazentrifuge, der Zonen-Elektrophorese und der Immunogel-Diffusion wie eine einzige Verbindung verhält<sup>10</sup>. Trotzdem möchten wir nicht sagen, daß unser Präparat homogen ist, da eine Verunreinigung im Umfange von etwa 1% von keinem dieser be-

<sup>5</sup> A. GOTTSCHALK, in *Glycoproteins. Their Composition, Structure and Function* (Ed. A. GOTTSCHALK), Elsevier, Amsterdam 1966, S. 1.

<sup>6</sup> F. M. BURNET, *Physiol. Rev.* 31 (1951) 131.

<sup>7</sup> J. F. MCCREA, *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 26 (1948) 355.

<sup>8</sup> A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 23 (1957) 645.

<sup>9</sup> E. R. B. GRAHAM und A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 38 (1960) 513.

<sup>10</sup> A. GOTTSCHALK, H. SCHAUER und G. UHLENBRUCK, *Z. Physiol. Chem.* 352 (1971) 117.

Tabelle 1. Wirkung von Alkali-Behandlung auf die Zusammensetzung von Glykopeptiden (aus oSM)

Die Versuchsergebnisse sind in Mikromol/g Glykopeptid ausgedrückt. Versuchsbedingungen: 0,5 N NaOH; 22°

Zeit	Freies N-Acetyl- galaktosamin	Ser	Thr	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Asp	Lys	Arg
0	0	1241	1164	1323	754	749	400	179	236	92	trace	trace
48	1518	562	316	1257	702	710	392	150	251	72	—	—
Änderung	+1518	-679	-848	-66	-52	-39	-8	-29	+15	-20	--	-
		-1527										

nutzten Kriterien erfaßt werden muß. Das Verfahren besteht im wesentlichen aus der wässrigen Extraktion der frischen Drüsen, Ausfällung von Beimischungen bei pH 4,5 und die Präzipitation von oSM durch Methanol (Endkonzentration 64%, v/v) bei -10°C. Das anfallende Produkt wurde weiter durch Anwendung von Hydroxylapatit (TETTAMANTI und PIGMAN<sup>11</sup>) und von Sephadex-G-200 Säulen (BHARGAVA und GOTTSCHALK<sup>12</sup>) gereinigt.

Das Molekulargewicht von oSM ist etwa  $8 \times 10^5$ , die *intrinsic viscosity* (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,6) =  $3,4 \pm 0,1$  dl/g. In Lösung verhält sich oSM wie ein statistisches Knäuel (random coil), elongiert und mit etwas Steifheit; es schließt ein beträchtliches Volumen von Lösungsmittel in sich ein; das effektive hydrodynamische Volumen des äquivalenten Ellipsoids beträgt 30 ml/g. Bei neutralem pH und niedriger Ionenstärke (< 0,1) bewirken die ionisierten Carboxylgruppen der Neuraminsäure ( $pK_a = 2,6$ ) durch gegenseitige Abstoßung eine Expansion und Rigidität des Moleküles. Bei niedrigem pH (etwa 1,7) nimmt die Viskosität infolge von Unterdrückung der Ionisation der Carboxylgruppen stark ab. Dieser Vorgang ist reversibel (GOTTSCHALK und THOMAS<sup>13</sup>; GOTTSCHALK und MCKENZIE<sup>14</sup>).

Chemisch besteht oSM aus etwa 50% Protein und 50% Kohlenhydrat. Das Kohlenhydrat ist aus fast äquimolaren Teilen von N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylneuraminsäure zusammengesetzt. Diese beiden Bestandteile sind in Disacchariden der Zusammensetzung  $\alpha$ -N-Acetylneuraminosyl (2→6)-N-Acetylgalaktosamin angeordnet (siehe Abb. 1) und etwa 800 solcher Disaccharide sind an die Polypeptidkette(n) geheftet.

In meinem Laboratorium und unabhängig davon in dem Laboratorium von Dr. JOLLÈS, Paris, wurde gezeigt, daß N-Acetylgalaktosamin O-glykosidisch an die Hydroxylgruppen Serin und Threonin gebunden ist. Wir behandelten NANA-freie Glykopeptide vom Mol.-Gew. ungefähr 660, die wir durch Pronase-Abbau von oSM erhielten, mit 0,5 M NaOH bei 0°C und bei 22°C für

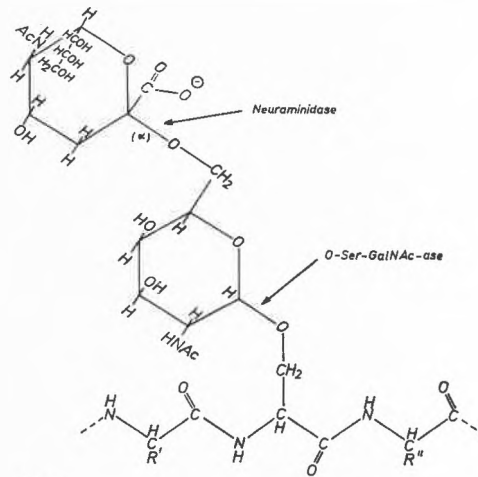


Abb. 1

verschieden lange Zeit<sup>15</sup>. Bei 0°C wurden 900 Mikromole N-Acetylgalaktosamin in 68 h in Freiheit gesetzt mit dem gleichzeitigen Verlust von 929 Mikromolen Serin und Threonin. Ein Versuch bei 22°C ist in Tabelle 1 gezeigt, die der Arbeit von CARUBELLI, BHAVANANDAN und GOTTSCHALK<sup>16</sup> entnommen ist. Wenn Serin-Peptide in ähnlicher Weise mit Alkali behandelt wurden, betrug der Verlust an Serin weniger als 10%. HARBON *et al.*<sup>17</sup> behandelten natives oSM bei pH 12,8 45 min bei 70°C. Unter diesen Bedingungen verminderte sich das gebundene Hexosamin um 83% und Serin und Threonin um 60 bzw. 78%. Für das Rinder-Submaxillaris-Drüsen-Glykoprotein erbrachte PIGMANS Laboratorium einen ähnlichen Beweis<sup>18</sup>.

Diese Befunde wurden als das Ergebnis von  $\beta$ -Elimination von an Peptid-gebundenes Serin (Threonin) N-Acetylgalaktosamin gedeutet. Die Bildung von  $\alpha$ -Aminoacrylsäure (von O-substituiertem Serin) wurde (1) durch ihre Reduktion mittels  $\text{NaBH}_4$  zu Alanin bewiesen<sup>18</sup>; (2) durch ihre Überführung in Cysteinsäure mittels  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ <sup>17</sup> und (3) spektroskopisch durch Absorption bei 241 nm<sup>16</sup>.

<sup>11</sup> G. TETTAMANTI und W. PIGMAN, *Arch. Biochem. Biophys.* 124 (1968) 41.

<sup>12</sup> A. S. BHARGAVA und A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 127 (1966) 223.

<sup>13</sup> A. GOTTSCHALK und M. A. W. THOMAS, *Biochim. Biophys. Acta* 46 (1961) 91.

<sup>14</sup> A. GOTTSCHALK und H. A. MCKENZIE, *Biochim. Biophys. Acta* 54 (1961) 226.

<sup>15</sup> V. P. BHAVANANDAN, E. BUDECKE, R. CARUBELLI und A. GOTTSCHALK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (1964) 353.

<sup>16</sup> R. CARUBELLI, V. P. BHAVANANDAN und A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 101 (1965) 67.

<sup>17</sup> S. HARBON, G. HERMAN, B. ROSSIGNOL, P. JOLLÈS und H. CLAUSER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17 (1964) 57.

<sup>18</sup> K. TANAKA, M. BERTOLINI und W. PIGMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 (1964) 404.

Bei dieser Wellenlänge absorbiert  $\alpha$ -Aminoacrylsäure stark<sup>19</sup>. Die Produktion von  $\alpha$ -Aminocrotonsäure (aus O-substituiertem Threonin) wurde durch ihre Reduktion zu  $\alpha$ -Aminobuttersäure erwiesen<sup>20</sup>.

Der Abbau von OSM geht in den Körpergeweben allem Anschein nach in der Weise vor sich, daß gleichzeitig mit der proteolytischen Spaltung von Peptidbindungen des Eiweißes ein stufenweiser Abbau der Kohlenhydrate erfolgt. Die Neuraminidase<sup>8</sup> ist in fast allen Körpergeweben der höheren Tiere vorhanden<sup>21</sup> und spaltet nach unseren Versuchen *in vitro*<sup>10</sup> die endständige N-Acetylneuraminsäure von OSM praktisch vollkommen ab.

Vor einigen Jahren fanden wir in Zusammenarbeit mit dem Laboratorium von Prof. Dr. E. BUDDECKE, jetzt in Münster, daß ein rohes Enzym-Präparat, das aus dem Homogenate von Rindermilch durch Fraktionierung mit  $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$  gewonnen worden war, die O-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylgalaktosamin und Serin (Threonin) in NANA-freiem OSM und daraus hergestellten Glykopeptiden spaltete<sup>15</sup>. Wir nannten das für diese Spaltung verantwortliche Enzym O-Seryl-N-Acetylgalaktosaminid Glykosidase<sup>22</sup>. Dieses Enzym ist von der lange bekannten N-Acetyl- $\beta$ -D-Hexosaminidase (EC 3.2.1.30), die auch in dem Rohenzym enthalten ist, verschieden. Das letztere Enzym spaltet sowohl N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid als auch Galaktosaminid.

Die O-Seryl-N-Acetylgalaktosaminidase ließ sich durch Säulenchromatographie an Sephadex G-200 unschwer von der N-Acetyl- $\beta$ -D-Hexosaminidase trennen<sup>22</sup>. Beide Enzyme sind in der Tierreihe sehr weit verbreitet. So fanden wir sie in Anthozoa, Plathelminthes, Bryozoa, Annelida, Arthropoda, Gastropoda, Tunicata und Vertebrata; von den letzteren wurden Fische, Amphibien, Vögel und Säugetiere untersucht<sup>23</sup>. Mein Laboratorium hat insbesondere die O-Seryl-N-Acetylgalaktosaminidase von *Lumbricus terrestris*<sup>24</sup> hochgradig gereinigt, so daß wir mit der sehr empfindlichen Ninhydrin-Reaktion in 24 Stunden bei 37°C und pH 4,8 keine Peptidspaltung nachweisen konnten. Kürzlich ist es uns<sup>25</sup> und unabhängig von uns WEISSMANN und HIN-

#### Enzymatic degradation of OSM

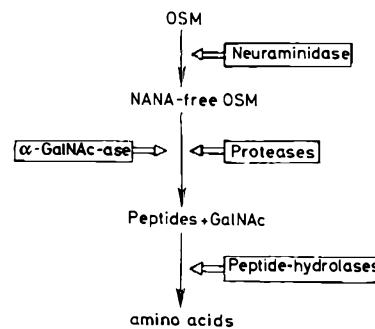


Abb. 2

RICHSSEN<sup>26</sup> gelungen, die O-Seryl-N-Acetylgalaktosaminidase eindeutig als N-Acetyl- $\alpha$ -D-Galaktosaminidase zu kennzeichnen. Das Enzym spaltet außer NANA-freiem OSM und davon hergeleiteten Glykopeptiden Phenyl- $\alpha$ -D-Galaktosaminid, aber nicht das  $\beta$ -Anomere und nicht Phenyl- $\alpha$ - oder  $\beta$ -Glucosaminid. Es spaltet nur endständiges, d.h. unsubstituiertes glykosidisch gebundenes N-Acetylgalaktosamin in  $\alpha$ -Konfiguration. Die Spezifität gegen das Aglykon ist gering. Mit Hilfe der Neuraminidase und der  $\alpha$ -N-Acetylgalaktosaminidase im Zusammenwirken mit den proteolytischen Enzymen kann OSM in seine Bausteine zerlegt werden (Abb. 2). Es ist von Interesse, daß ARONSON und DE DUVE<sup>27</sup> und MAHADEVAN und TAPPEL<sup>28</sup> den Nachweis erbracht haben, daß die am Abbau beteiligten Enzyme lysosomalen Ursprungs sind.

Wie aus dem Vorgegangenen erkennbar ist, ist OSM ein einfach gebautes, aber vollwertiges Glykoprotein. Dank seiner Einfachheit ist die molekulare Struktur von OSM, sein enzymatischer Abbau und auch seine Biosynthese weitgehend erforscht worden. Man könnte es als einen Prototyp der Glykoproteine ansehen. Ich möchte mit dem Hinweis schließen, daß wir in immunologischen Untersuchungen in den letzten zwei Jahren gefunden haben, daß sowohl die Protein- als auch die Kohlenhydratkomponente antigene Determinanten sind, und daß sich Anhaltspunkte dafür ergeben haben, daß die Aminosäure-Umgebung der an der Zuckerbindung beteiligten Serin- und Threonin-Reste ähnlich sein muß<sup>10</sup>.

<sup>19</sup> G. RILEY, J. H. TURNBALL und W. WILSON, *J. Chem. Soc.* 1957, 1373.

<sup>20</sup> K. TANAKA und W. PIGMAN, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) PC 1487.

<sup>21</sup> A. GOTTSCHALK und A. S. BHARGAVA, in *The Enzymes* (Ed. P. D. BOYER), Vol. 5, 3rd edition, Academic Press, New York, in press.

<sup>22</sup> A. S. BHARGAVA, E. BUDDECKE, E. WERRIES und A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 127 (1966) 457.

<sup>23</sup> H. SCHAUER und A. GOTTSCHALK, *Z. Naturforsch.* 22b (1967) 1030.

<sup>24</sup> H. SCHAUER und A. GOTTSCHALK, *Biochim. Biophys. Acta* 156 (1968) 304.

<sup>25</sup> E. BUDDECKE, H. SCHAUER, E. WERRIES und A. GOTTSCHALK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34 (1969) 517.

<sup>26</sup> B. WEISSMANN und D. F. HINRICHSSEN, *Biochemistry* 8 (1969) 2034.

<sup>27</sup> N. N. ARONSON und C. DE DUVE, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 4564.

<sup>28</sup> S. MAHADEVAN und A. L. TAPPEL, *Arch. Biochem. Biophys.* 128 (1968) 129.