

Struktur und Funktion der Ganglioside [*]

VON H. WIEGANDT [**]

Dem Andenken an Richard Kuhn gewidmet

Ganglioside, Bestandteile des Gehirns und anderer Organe, sind aus Sphingosin, Fettsäure, Hexosen und Sialinsäure zusammengesetzt. Die Arten der Ganglioside unterscheiden sich voneinander durch die Fettsäurekomponente und den Zuckerrest. Das Kohlenhydratgerüst der mengenmäßig überwiegenden Hirnganglioside ist die Ganglio-N-tetraose, ein Tetrasaccharid, das in diesen Gangliosiden mit einem oder mehreren Molekülen Sialinsäure verknüpft ist. Der Oligosaccharidteil ist Träger serologischer Eigenschaften. – Die Ganglioside sind charakteristische Lipidbausteine einiger neuronaler Membranen des Zentralnervensystems; sie konnten am synaptischen Apparat der Nervenzellen der Hirnrinde lokalisiert werden. Der Ort ihres Vorkommens und eine Reihe physiologischer Wirkungen weisen auf eine Beteiligung bei der Erregungsleitung hin. Entdeckt wurden sie im Gehirn von Geisteskranken, und man vermutet, daß die pathologische Speicherung durch genetisch bedingten Ausfall am Auf- oder Abbau beteiligter Enzyme ausgelöst wird. Ganglioside werden aus den Einzelbausteinen durch acceptorspezifische Transferasen gebildet.

1. Einleitung

Als 1935 Klenk^[1] aus dem Hirn von Patienten mit familiärer amaurotischer Idiotie und Niemann-Pick-scher Krankheit eine Speichersubstanz isolierte und näher charakterisierte, begann die Erforschung einer neuen Klasse saurer, stark kohlenhydrathaltiger Lipide, auf deren Existenz schon Landsteiner und Levene^[2] sowie Thierfelder und Walz^[3] auf Grund der charakteristischen Farbstoffbildung dieser Verbindungen mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd oder mit Orcin hingewiesen hatten. 1938 fand Blix^[4], daß diese

Lipide regelmäßig auch im normalen Hirn vorkommen. Klenk vermutete eine Lokalisation der „Substanz X“ in den Ganglienzellen und benannte sie demnach Ganglioside^[5].

Die Identifizierung der Ganglioside als Sphingolipide^[*] und die Bestimmung ihrer Bausteine geht zurück auf die grundlegenden Arbeiten Klenks und seiner Mitarbeiter. Die Ganglioside bestehen aus Sphingosin (1) [(2*S*:3*R*)-2-Amino-*trans*-4-octadecen-1,3-diol], Fettsäure, Hexosen und einer Sialinsäure, d.h. einer *N*- oder *O*-acylierten Neuraminsäure (2)

[*] Doz. Dr. H. Wiegandt

Physiologisch-chemisches Institut der Universität
355 Marburg, Deutschhausstraße 1–2

[**] Abkürzungen: Glc = Glucose, Gal = Galaktose, GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin, GalNAc = *N*-Acetylgalaktosamin, NANS = *N*-Acetylneuraminsäure, NGNS = *N*-Glykolyneuraminsäure, Lact = Lactose, Sph = Sphingosin, Cer = Ceramid. Abkürzungen für Oligosaccharide s. Tabelle 1; Nomenklatur s. Abschnitt 3.1. und [6].

[1] E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 235, 24 (1935).

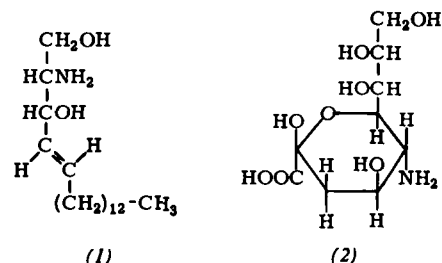
[2] K. Landsteiner u. P. A. Levene, J. Immunology 10, 731 (1925).

[3] H. Thierfelder u. E. Walz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 166, 217 (1927).

[4] G. Blix, Scand. Arch. Physiol. 80, 466 (1938).

[5] E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 273, 76 (1942).

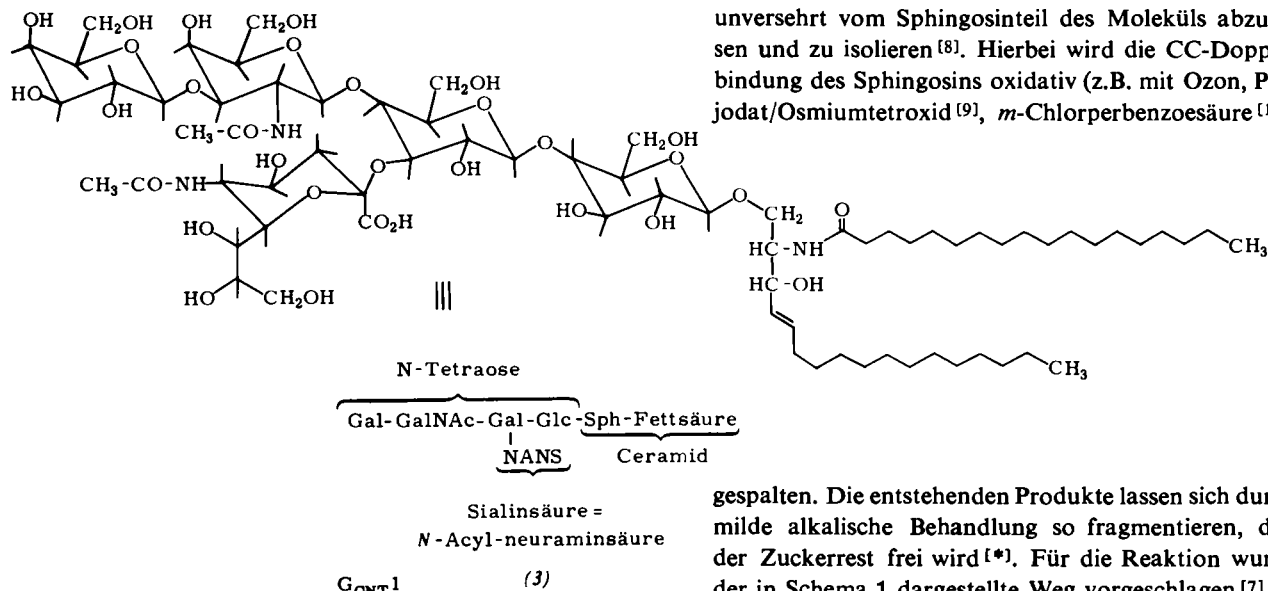
[*] Unter Sphingolipiden versteht man Fettstoffe, die Sphingosin als Grundkomponente enthalten.



(5-Amino-3,5-didesoxy-D-glycero-β-D-galaktonulosonsäure), meist N-Acetyl- oder N-Glykolylnuraminsäure (NANS bzw. NGNS).

2. Struktur der Ganglioside

Die Isolierung und vor allem die Reindarstellung der Ganglioside gelang mit chromatographischen Methoden. Wir versuchten, zunächst die chemische Struktur des aus Hirn isolierten Gangliosids G_{GNT1} (3) [*] aufzuklären. Es stand in genügender Menge rein zur



misch mehrerer noch an das Ceramid gebundener sowie freier Zucker.

Beim Abbau der Ganglioside mit Eisessig/Acetanhydrid und katalytischen Mengen konzentrierter Schwefelsäure [6] wird dagegen nur teilweise Sialinsäure aus dem Gangliosid abgespalten, dagegen wird das Ceramid abgelöst; es treten freie Oligosaccharide auf, in denen die Bindung zur Sialinsäure erhalten geblieben ist.

Einen großen Fortschritt bei der Strukturaufklärung der Ganglioside – und auch anderer Glykosphingolipide – brachte die Einführung einer neuen Reaktionsfolge [6], die es erlaubte, den gesamten Zuckerrest unversehrt vom Sphingosinteil des Moleküls abzulösen und zu isolieren [8]. Hierbei wird die CC-Doppelbindung des Sphingosins oxidativ (z.B. mit Ozon, Perjodat/Osmiumtetroxid [9], *m*-Chlorperbenzoesäure [10])

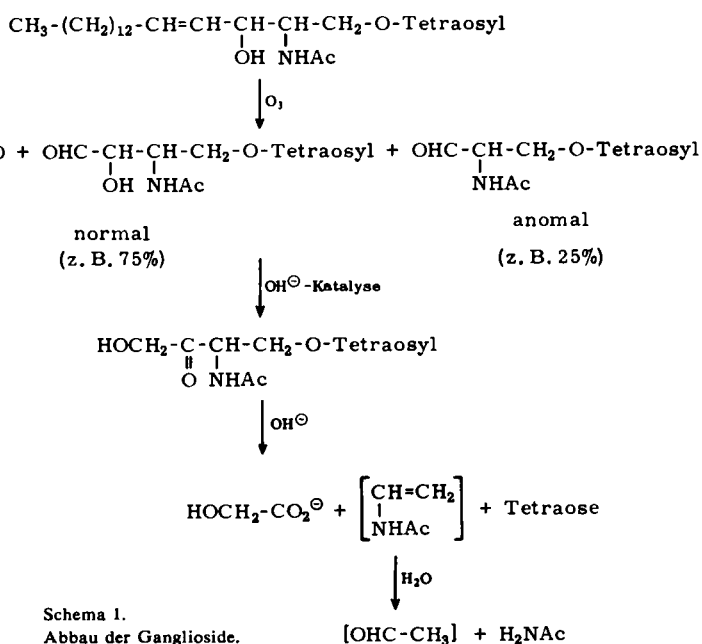
gespalten. Die entstehenden Produkte lassen sich durch milde alkalische Behandlung so fragmentieren, daß der Zuckerrest frei wird [1*]. Für die Reaktion wurde der in Schema 1 dargestellte Weg vorgeschlagen [7].

Verfügung. Eine quantitative Bestimmung der Einzelbausteine nach der Totalhydrolyse ergab ein molekulares Verhältnis von 1 Sphingosin: 1 Fettsäure:

1 Glucose: 2 Galaktose: 1 N-Acetylgalaktosamin: 1 N-Acetylneuraminsäure. Die Bindung des Zuckers zur N-Acetylneuraminsäure wird durch Neuraminidase (Neuraminat-glyko-Hydrolase EC 3.2.1.18) verschiedener Herkunft nicht angegriffen. Das Gangliosid G_{GNT1} verliert beim Erwärmen mit verdünnter Mineralsäure seine Sialinsäure, und man erhält ein Ceramidtetrasaccharid. (Die Kombination aus einem Molekül Fettsäure und einer Sphingosinbase heißt Ceramid.) Nach Permethylierung dieses Produktes und anschließender Totalhydrolyse kann man 3-O-Methylsphingosin nachweisen.

Die Ganglioside zeigen das für andere Glykosphingolipide (vgl. z.B. Tabelle 2) typische Aufbauprinzip: Eine Sphingosinbase mit freier Hydroxygruppe an C-3 trägt an der 2-Aminogruppe amidartig gebunden ein Molekül Fettsäure. Mit der Hydroxygruppe an C-1 des Ceramids ist Kohlenhydrat glykosidisch verknüpft. Die für die Ganglioside charakteristische Sialinsäure ist ketosidisch mit dem Zuckerrest verbunden. Im stärker sauren Milieu wird das Des-NANS- G_{GNT1} [*] weiter gespalten, und es resultiert ein Ge-

[*] Nomenklatur vgl. [6] und Abschnitt 3.1.



Schema 1.
Abbau der Ganglioside.

- [6] R. Kuhn u. H. Wiegandt, Chem. Ber. 96, 866 (1963).
- [7] H. Wiegandt, Vortrag auf dem VII. internat. Congress Biochemistry (Tokyo) 1967.
- [8] H. Wiegandt u. G. Baschang, Z. Naturforsch. 20b, 164 (1965).
- [9] S. Hakamori, J. Lipid Res. 7, 789 (1966).
- [10] H. Wiegandt, unveröffentlicht.
- [*] Bei Verwendung von OsO_4/JO_4 oder *m*-Chlorperbenzoesäure muß der Kohlenhydratteil erst durch Peracetylierung geschützt werden. Bei der alkalischen Fragmentierung werden dann auch die O-Acetylgruppen wieder abgespalten.

Aus dem neuraminidase-resistenten Gangliosid G_{GNT1} wurde so der sialinsäurehaltige Zuckerrest gewonnen. Abspaltung der *N*-Acetylneuraminsäure (NANS) durch vorsichtige saure Hydrolyse (0,1 N H_2SO_4 , 80°C) führte zum Grundzucker, der Ganglio-*N*-tetraose. Durch weitere Partialhydrolyse (0,1 N H_2SO_4 , 100°C) konnten daraus die beiden Trisaccharide (GNT I und GNT II) (vgl. Tabelle 1) sowie die drei möglichen Disaccharide (GNB I, GNB II, Lact) isoliert und charakterisiert werden.

Die bisher gefundenen stickstoffhaltigen Tetrasaccharide lassen sich durch ihre unterschiedliche Laufgeschwindigkeit auf dem Papierchromatogramm leicht voneinander unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit zu ihrer Charakterisierung im Mikromaßstab besteht in der vergleichenden papierchromatographischen Darstellung eines „fingerprints“ ihrer Produkte bei der Partialhydrolyse oder dem alkalischen Abbau [19].

Ganglio-*N*-tetraose [GNT, (4)] sowie G_{GNT1} wurden mit Perjodat gespalten und die aldehydischen Bruchstücke anschließend mit NaBH_4 reduziert. Der Vergleich der Ergebnisse bewies, daß die enzymatisch nicht abspaltbare Sialinsäure (hier NANS) an C-3 des zweiten Zuckerrestes der GNT sitzt.

3. Bestandteile der Ganglioside und deren Bestimmung

Die Mannigfaltigkeit der Ganglioside beruht hauptsächlich auf der Unterschiedlichkeit ihrer Kohlenhydrateile. Die Kettenlängen der Sphingosinbase und der Fettsäure können allerdings auch variieren. Alle bisher rein dargestellten Ganglioside sind nur bezüglich ihres Zuckerrestes einheitlich. Dieser Zuckerrest bedingt im wesentlichen die Unterschiede im chromatographischen, chemischen sowie physiologischen Verhalten.

Solche chromatographisch reinen Ganglioside aus Menschen- oder Rinderhirn enthalten als Base neben dem Sphingosin (1) ein Homologes mit einer Kohlenstoffkette von 20 anstatt 18 C-Atomen [11]. Ungefähr 10 % des gesamten Sphingosinanteils sind gesättigt, besitzen also nicht die CC-Doppelbindung des Sphingosins [12]. Das Mengenverhältnis der C_{18} - zur C_{20} -Verbindung verschiebt sich mit dem Alter. *Svennerholm* fand [13], daß im foetalen Hirn vorwiegend C_{18} -Sphingosin vorkommt, während beim Erwachsenen das C_{20} -Homologe stark überwiegt. Bei den Gangliosiden aus Milz wurde hauptsächlich die C_{18} -Base gefunden [14].

Auch die an das Sphingosin gebundenen Fettsäuren sind verschieden. Je nach Herkunft der Ganglioside ist im Gemisch meist eine Fettsäure in besonders hoher Konzentration enthalten. (z.B. im Hirn Stearinsäure, in der Milz Lignocerin-säure).

Als Grundbausteine des neutralen Oligosaccharids der Ganglioside wurden bisher Glucose, Galaktose, *N*-Acetyl-glucosamin, *N*-Acetyl-galaktosamin und Fu-

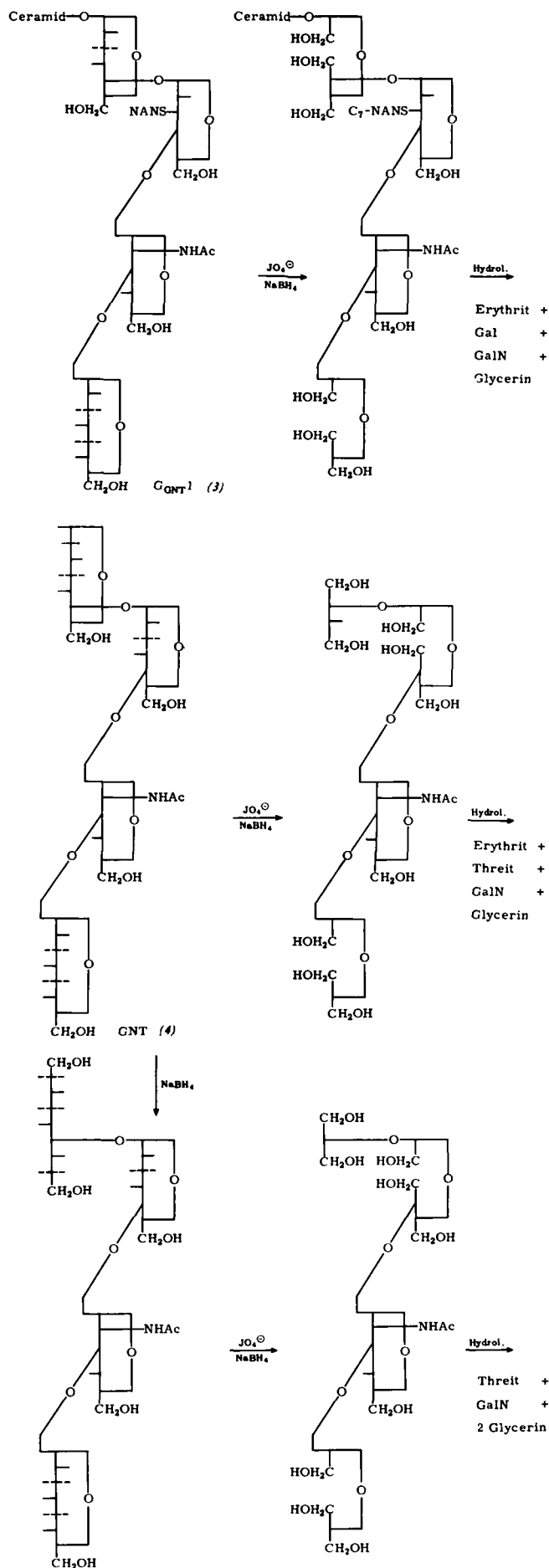
[11a] N. Z. Stanacer u. E. Chargaff, *Biochim. biophysica Acta* 59, 733 (1962).

[11b] N. Z. Stanacer u. E. Chargaff, *Biochim. biophysica Acta* 98, 168 (1965); K. Sambasivarao u. R. H. McCluer, *Federat. Proc.* 22, 300 (1963).

[12] K. A. Karlsson, *Acta chem. scand.* 18, 565 (1964).

[13] L. Svennerholm, *Biochem. J.* 98, 20P (1966).

[14] J. Menkes, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 15, 551 (1964).



cose festgestellt. Der mit dem Ceramidteil der Ganglioside verknüpfte neutrale Zucker enthält maximal vier dieser Moleküle als Tetrasaccharid (Ganglio-*N*-tetraose der Hirnganglioside und Lacto-*N*-neo-tetraose aus Rindererythrocyten- oder Milzgangliosid^[15]). Aber auch Ganglioside mit Mono-, Di- und Trisacchariden sind isoliert worden.

Ganglioside aus Menschenerythrocyten und Menschenmilz enthalten hauptsächlich *N*-Acetylneuraminsäure (NANS). Dagegen besteht die Sialinsäure der Ganglioside aus Erythrocyten und Milz von Affen^[16], Rindern und Pferden neben NANS überwiegend aus *N*-Glykolyneuraminsäure (NGNS).

Die Ganglioside können ein oder mehrere Moleküle Sialinsäure tragen^[17]. Dabei sind entweder einzelne oder mehrere miteinander in 2 → 8-Stellung verknüpfte Sialinsäuremoleküle am Zucker der Ganglioside gebunden^[18]. Sind Sialinsäuren ketosidisch in 8-Stellung mit einem weiteren Sialinsäuremolekül verknüpft, so wird besonders leicht eine innere Esterbindung gebildet. Die entstehenden Lactone sind sehr labil und werden leicht hydrolytisch gespalten; sie ließen sich durch Titrationsversuche, Hydroxamsäurereaktion und Verhalten bei der Papierelektrophorese nachweisen.

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Ganglioside und der aus ihnen gewonnenen sialinsäurehaltigen Oligosaccharide wird von der Stellung der Sialinsäure am Zuckerrest stark beeinflusst. Im Falle der Verknüpfung zweier Moleküle Sialinsäure miteinander wirkt bei der Papierelektrophorese bei verschiedenen pH-Werten anscheinend nur ein Molekül stark sauer^[19].

Von den α- und β-Ketosiden der Sialinsäuren werden nur die α-Anomeren von Neuraminidase angegriffen^[20]. Da bei allen bisher bekannt gewordenen Gangliosiden prinzipiell alle Sialinsäuremolekeln durch dieses Enzym abspaltbar sind — in einigen Fällen zwar erst nach Aufhebung einer Hinderung^[21] — kann man schließen, daß die Sialinsäure hier immer in α-ketosidischer Bindung vorliegt. Die Hinderung kann aufgehoben werden, indem man z.B. bei GGNT1 (durch partielle saure Methanolyse oder partielle Acetolyse) Galaktose und *N*-Acetylgalaktosamin vom Ende des Zuckerteils des Moleküls abspaltet und dann das resultierende GLact1 mit Neuraminidase behandelt.

Die Ganglioside werden meistens durch colorimetrische Bestimmung der Sialinsäure mit Orcin (*Bials* Reagens^[22]), *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (*Ehrlichs* Reagens^[23]), Thiobarbitursäure^[24], Diphenylamin^[25] oder 3,5-Diaminobenzoesäure^[26] nachgewiesen. Die Sialinsäuren sind relativ starke

Säuren mit pK-Werten zwischen 2 und 3. Ganglioside können daher acidimetrisch titriert werden.

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Sphingosinbasen wurden die folgenden Wege eingeschlagen: Nach hydrolytischer Spaltung des Glykosphingolipids und Isolierung (1 *N* methanolische H₂SO₄, Extrahieren mit Äther bei pH > 7) wurde die Base entweder in freier Form oder als 2,4-Dinitrophenylderivat chromatographisch identifiziert^[27]. Die Sphingosine können auch nach Trimethylsilylierung gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch charakterisiert^[28] oder nach oxidativer Spaltung ihrer CC-Doppelbindung mit Ozon, Perjodat/Osmiumtetroxid bzw. Perjodat/Permanganat und Gaschromatographie der entstehenden Aldehyde bzw. Fettsäuren (als Methylester) bestimmt werden^[11b, 29].

Die Fettsäuren werden nach saurer Methanolyse der Ganglioside gaschromatographisch in Form ihrer Methylester analysiert.

3.1. Nomenklatur der Ganglioside^[30]

Wir verwenden zur Kennzeichnung der Oligosaccharide Trivial- oder Halbtrivialnamen^[30]. „N“ bei einer Oligosaccharidbezeichnung bedeutet den stickstoffhaltigen Zucker. Die von einem Tetrasaccharid ableitbaren Tri- und Disaccharide werden mit I, II usw. voneinander unterschieden; dabei erhält die Bezeichnung I der Zucker, der sich am nichtreduzierenden Ende des Tetrasaccharids befand (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. Abkürzungen für Oligosaccharide.

Oligosaccharid	Kurzformel	Abkürzung
Ganglio- <i>N</i> -tetraose	Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)Gal(β1,4)Glc	GNT
Ganglio- <i>N</i> -triose I	Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)Gal	GNT I
Ganglio- <i>N</i> -triose II	GalNAc(β1,4)Gal(β1,4)Glc	GNT II
Ganglio- <i>N</i> -biose I	Gal(β1,3)GalNAc	GNB I
Ganglio- <i>N</i> -biose II	GalNAc(β1,4)Gal	GNB II
Lacto- <i>N</i> -tetraose	Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc	LNT
Lacto- <i>N</i> -neotetraose	Gal(β1,4)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc	LNNT
Lacto- <i>N</i> -neotriose I	Gal(β1,4)GlcNAc(β1,3)Gal	LNNT I
Lacto- <i>N</i> -triose II	GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc	LNTr II
Lacto- <i>N</i> -neobiose I	Gal(β1,4)GlcNAc	LNnB I
Lacto- <i>N</i> -biose II	GlcNAc(β1,3)Gal	LNB II
Globo- <i>N</i> -tetraose	GalNAc(β1,3)Gal(β1,4)Gal(β1,4)Glc	GloNT

In den Kurzbezeichnungen steht G für Gangliosid. Der Index (z.B. GGNT) bezeichnet das sialinsäurefreie Oligosaccharid. Die beigefügte arabische Ziffer gibt die Anzahl der Sialinsäuremoleküle an. Handelt es sich bei Gangliosiden um Sialinsäure-Stellungsisomere, so wird zur Unterscheidung a, b usw. zur Zahl hinzugesetzt (z.B. GGNT2a und GGNT2b). Ist die in einem Gangliosid vorkommende Sialinsäure nicht NANS, sondern NGNS, so wird der Gangliosidbezeichnung (NGNS) beigefügt.

4. Vorkommen der Ganglioside

Quantitative Bestimmungen der Ganglioside ergaben folgende Werte^[30, 31] (prozentualer Anteil an den Gesamtlipiden):

Hirn, Mensch, 1 Tag alt	7,46 %
Hirn, Mensch, adult	3,49 %
graue Substanz, Mensch, adult	8,65 %
weiße Substanz, Mensch, adult	4,16 %

[27] C. Michalec, Biochim. biophysica Acta 116, 400 (1966); C. Michalec, J. chromatogr. 24, 228 (1966); C. Michalec u. Z. Kolman, Clin. chim. Acta 13, 529 (1966); B. Weiss u. R. L. Stiller, J. Lipid Res. 6, 159 (1965).

[28] M. Popovic, Biochim. biophysica Acta 125, 178 (1966); K.A. Karlsson u. G. A. L. Holm, Acta chem. scand. 19, 2423, 2425 (1965).

[15] R. Kuhn u. H. Wiegandt, Z. Naturforsch. 19b, 80 (1964).

[16] G. Uhlenbruck u. J. Schmitt, Naturwissenschaften 52, 163 (1965).

[17] R. Kuhn u. H. Wiegandt gemeinsam mit H. Egge, Angew. Chem. 73, 580 (1961).

[18] R. Kuhn u. H. Wiegandt, Z. Naturforsch. 18b, 541 (1963).

[19] H. Wiegandt, Habilitationsschrift, Universität Marburg 1966.

[20] P. Meindl u. H. Tubby, Mh. Chem. 96, 802, 816 (1965); R. Kuhn u. H. Lutz, Chem. Ber. 99, 611 (1966); H. Faillard, G. Kirchner u. M. Blohm, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 347, 87 (1966).

[21] R. Ledeen u. K. Salsman, Biochemistry 4, 48, 2225 (1965).

[22] L. Svennerholm, Ark. Kemi 10, 577 (1957); Biochim. biophysica Acta 24, 604 (1957).

[23] J. Werner u. L. Odin, Acta Soc. Med. Upsaliensis 57, 230 (1952).

[24] L. Warren, J. biol. Chemistry 234, 1971 (1959); D. Aminoff, Biochem. J. 81, 384 (1961); G. B. Paerels u. J. Schut, ibid. 96, 787 (1965).

[25] A. Mukai Tohoko, J. exp. Medicine 77, 128, 223 (1962); Z. Dische, Mikrochemie 8, 4 (1930); A. Saifer u. S. Gerstenfeld, Jr., J. Lab. clin. Med. 50, 17 (1957).

[26] H. H. Hess u. E. Rolde, J. biol. Chemistry 239, 3215 (1964).

Wenn die weiße Hirnsubstanz in Myelin und Mikrosomen^[32] getrennt wird, lassen sich die Ganglioside hauptsächlich in den Mikrosomen nachweisen (Gangliosid-Gehalt: 0,4 % des Trockengewichts). Die Konzentration der Ganglioside in der grauen Substanz des Frontalhirns sowie des Nucleus caudatus (große Ganglien des Stammhirns) beträgt etwa 1,2–1,6 % des Trockengewichts (0,4 % Lipid-NANS). Das entspricht einem ungefähren Gangliosid-NANS-Gehalt von ca. $10,4 \times 10^{-12}$ g pro Ganglienzelle^[33].

In hoher Konzentration sind Ganglioside auch in der Milz vorhanden (z.B. 3,3 % der Gesamtlipide der Menschenmilz^[31]). Während wir für die Hirnganglioside bei den untersuchten Arten (Mensch, Rind, Kaninchen, Ratte, Igel, Huhn, Krebs (Augenstiele)^[10]) bisher qualitativ stets das gleiche Gangliosidmuster gefunden haben, so bestehen hinsichtlich der Ganglioside der Milz starke artbedingte Unterschiede. Dies beobachteten wir auch bei allen anderen bisher untersuchten Gangliosiden des visceralen Systems.

Außerdem konnten Ganglioside in Erythrocyten, Leukocyten, Serum, Nieren, Nebennieren, Placenta, Milch, Gefäßwandungen, Darm und Lunge nachgewiesen werden.

5. Chemische und physikalische Eigenschaften der Ganglioside

Die Ganglioside sind farblose, kristallisierende Substanzen, die unter Zersetzung schmelzen (z.B. G_{GNT1} : Fp 189–190 °C (Zers.)). Sie sind in unpolaren Lösungsmitteln unlöslich, ihre Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln (Wasser, Alkohole usw.) steigt mit der Größe ihres Zuckerrestes und ihrem Gehalt an Sialinsäure. Die Ganglioside bilden in wäßrigen Lösungen Mizellen vom ungefähren Molekulargewicht 200000–250000^[34]. In Dimethylformamid oder Tetrahydrofuran dagegen sind die Ganglioside mit Molekulargewichten zwischen 1000 und 3000 molekular gelöst^[35].

Ganglioside lassen sich als Lipidfilm auf Wasser spreiten. Der minimale Raumbedarf der Gangliosidmoleküle an der Luft/Wasser-Zwischenphase eines solchen Filmes beträgt bei 30 dyn/cm^[*] für G_{GNT1} 63 Å²/Molekül und für ein Disialo-gangliosid (G_{GNT2a})

[29] H. P. Schwarz, J. Kosteck, A. Marmolejo u. C. Sarappa, J. Neurochem. 14, 91 (1967).

[30] H. Wiegand, Ergn. Physiol. biol. Chem. exp. Pharmacol. 57, 190 (1966).

[31] A. N. Siakotos u. G. Rouser, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 42, 913 (1965).

[32] E. F. Soto, L. Seminario de Bohner u. M. Delcarmen Calvino, J. Neurochem. 13, 989 (1966).

[33] R. Landolt, H. Heuss u. C. Thalheimer, J. Neurochem. 13, 1331 (1966).

[34] E. G. Trams u. L. J. Lauter, Biochim. biophysica Acta 60, 350 (1962); D. B. Gammack, Biochem. J. 88, 373 (1963).

[35] E. Klenk u. W. Gielen, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 283 (1960); R. E. Howard u. R. M. Burton, Biochem. biophysica Acta 84, 435 (1964).

[*] Höhere Drucke bedingen eine übermäßige Instabilität des Gangliosidfilms.

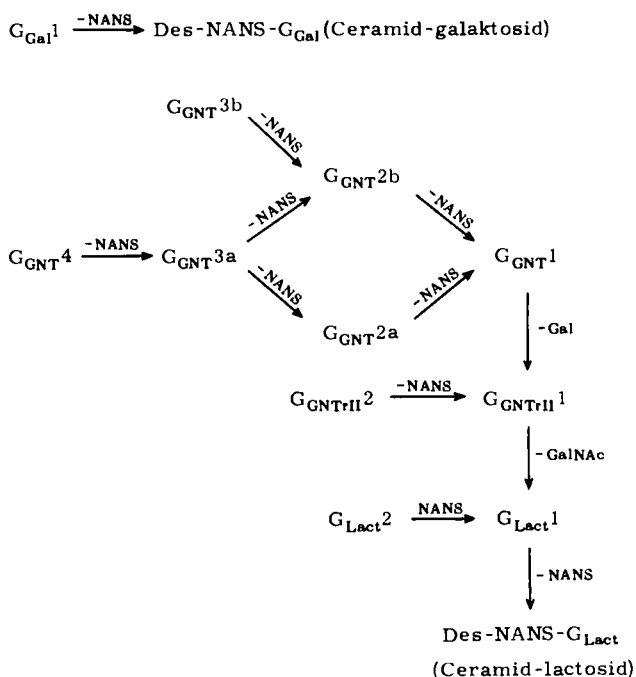
95 Å²/Molekül^[36]. Im Vergleich dazu benötigt ein Sphingomyelin, das aus Sphingosin und Phosphorylcholin besteht und als Fettsäurekomponente hauptsächlich Stearinsäure enthält, pro Molekül eine Fläche von 40 Å².

Auf Grund der Vorstellung, daß psychoaktive Drogen und Lokalanästhetika die physikochemischen Eigenschaften biologischer Membranen verändern, untersuchte Van Deenen^[37] als Modellsysteme Gangliosidfilme auf Wasser, unter welche die genannten Pharmazeutika subjiert wurden. Diese durchdringen in sehr verschiedenem Maße die Gangliosidfilme und verändern dabei deren Oberflächenspannung.

Saure Lipide wie die Ganglioside haben eine starke Affinität für Erdalkalitionen. Studien der Bindung von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ an Lipidfilmen auf Wasser^[36] zeigten aber, daß bei pH = 5,5 von Gangliosiden wesentlich weniger Ca^{2+} gebunden wird als von Phospholipiden. In einem zweiphasigen System (z.B. Chloroform/Methanol/Wasser) haben die Ganglioside^[38] wie auch die Phospholipide – Triphosphoinositid, Phosphatidylserin – eine stärkere Affinität zu Ca^{2+} als zu Mg^{2+} .

6. Hirnganglioside

Im Hirn kommen hauptsächlich die folgenden Ganglioside vor: G_{GNT1} , G_{GNT2a} , G_{GNT2b} und G_{GNT3a} . Den ersten Anhalt für ihren strukturellen Zusammenhang fanden wir durch Spaltungsversuche mit Neuraminidase^[17]. Durch sukzessive enzymatische Abspaltung einzelner Sialinsäurereste ließen sich mehrere Ganglioside in G_{GNT1} überführen, dessen Sialinsäure nun nicht mehr durch das Enzym abgespalten wurde (vgl. in Schema 2 den Übergang von G_{GNT4} zu G_{GNT1}). Die Hauptganglioside des Hirns unterschieden sich demnach nur im Gehalt und/oder



Schema 2. Strukturbeziehungen der Hirnganglioside.

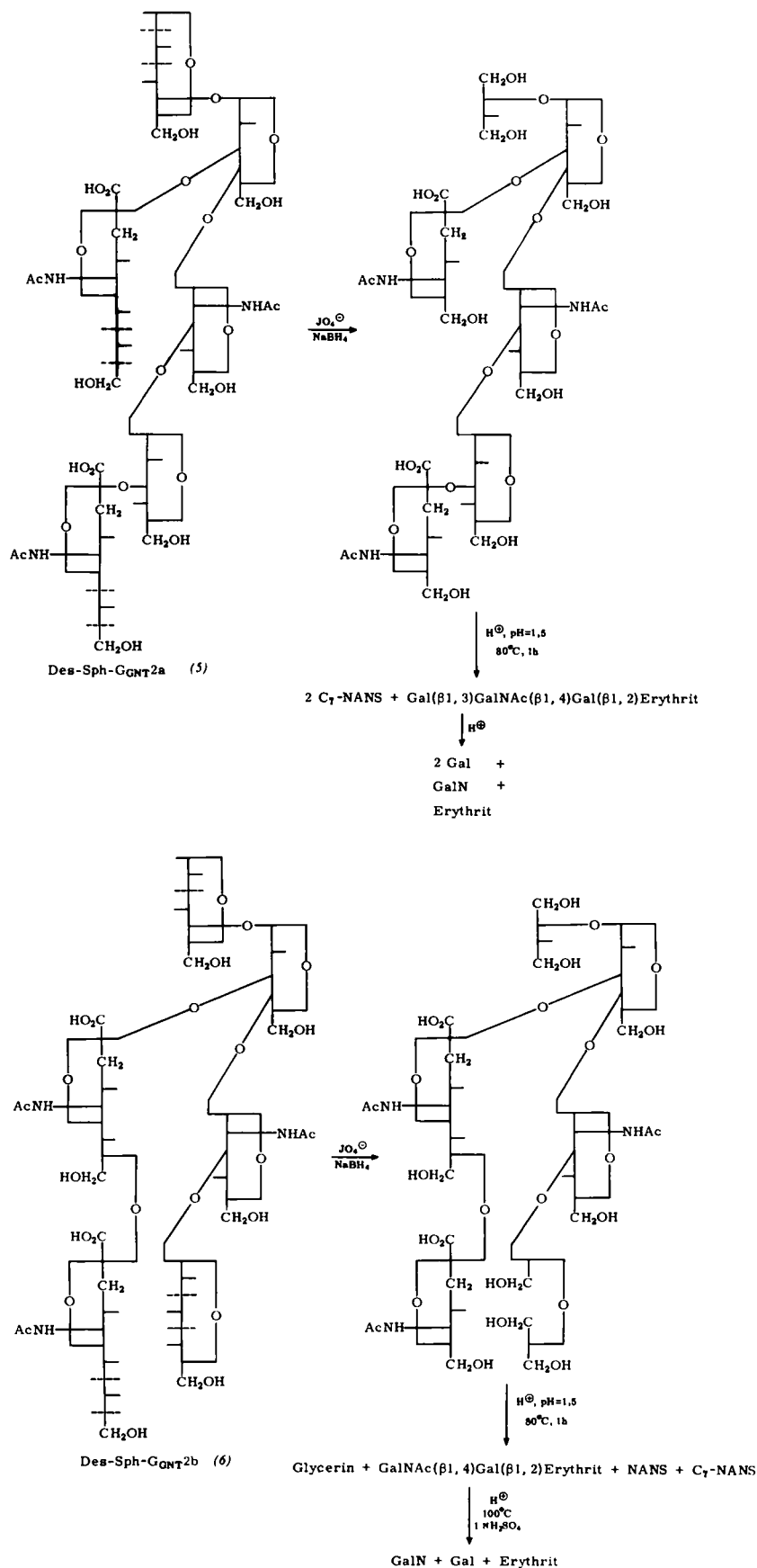
[36] H. Halser u. R. M. C. Dawson, European J. Biochem. 1, 61 (1967).

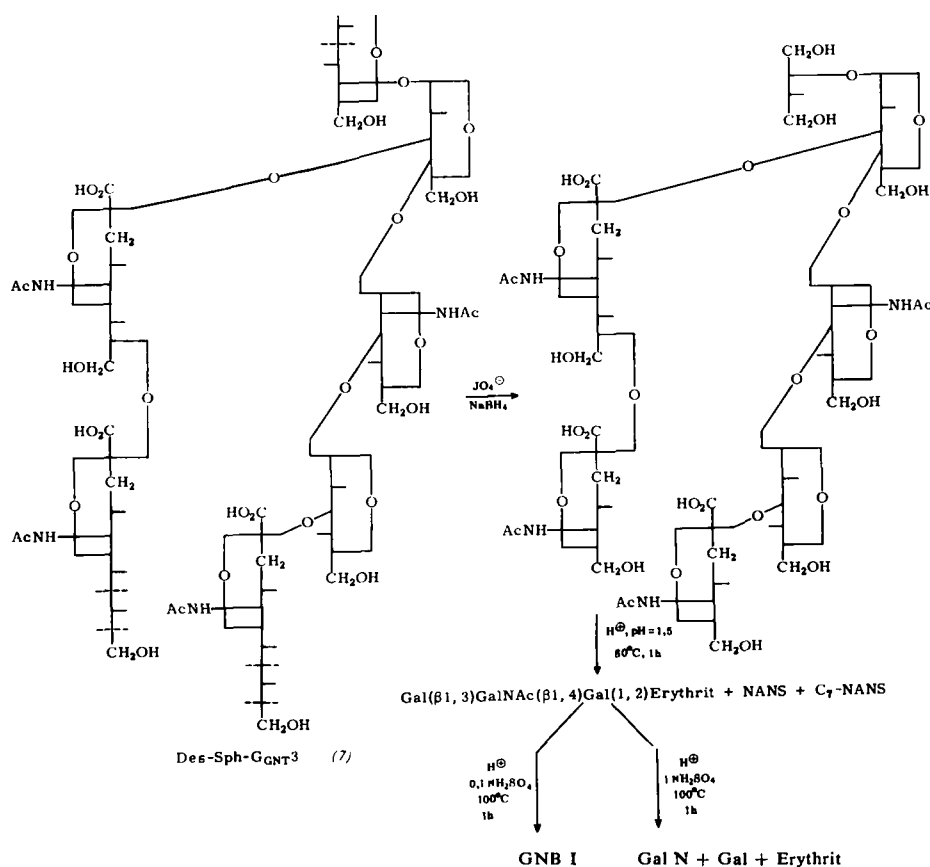
[37] J. R. A. Demel u. L. L. M. Van Deenen, Chem. Physics Lipids 1, 68 (1967).

[38] R. Quarles u. J. Folch-Pi, J. Neurochem. 12, 543 (1965).

der Stellung der Sialinsäure. Bei den durch Neuramini-
dase nicht spaltbaren Gangliosiden ($G_{\text{GNT}1}$ und
 $G_{\text{GNT}11}$) wird vermutlich der Zutritt des Enzyms
durch die Nähe großer Substituenten verhindert [6].
Das die Sialinsäure tragende Grundkohlenhydrat die-

ser Hauptganglioside aus Hirn ist Ganglio-*N*-tetraose
(4). Die Bestimmung der Haftstellen der NANS bei
den sialinsäurereichen GNT-Gangliosiden $G_{\text{GNT}2a}$,
 $G_{\text{GNT}2b}$ und $G_{\text{GNT}3a}$ gelang durch Perjodatoxida-
tion [18] von Des-Sph- $G_{\text{GNT}2a}$ (5), Des-Sph- $G_{\text{GNT}2b}$





(6) bzw. Des-Sph-GGNT3 (7) mit anschließender saurer Hydrolyse.

Im Gangliosid GGNT2a trägt jede der beiden Galaktofen der Ganglio-*N*-tetraose an C-3 ein Molekül NANS. Im isomeren Gangliosid GGNT2b sind die beiden Sialinsäuremoleküle durch 2 → 8-ketosidische Bindung direkt miteinander verknüpft und stehen an der 3-Position der vorderen Galaktose. Das Gangliosid GGNT3a vereinigt in sich die Bauprinzipien von GGNT2a und GGNT2b. Diese Befunde konnten jüngst durch Klenk und Mitarbeiter bestätigt werden [39].

Neben diesen Hauptkomponenten konnten wir im Hirn noch mehrere andere Ganglioside (die normalerweise dort nur in untergeordneter Menge vorkommen) nachweisen, isolieren und ihre chemische Struktur aufklären [6,40]. Das Gangliosid GGNT_{III}1 [6] (früher beschrieben als G₀) unterscheidet sich von GGNT1 nur durch das Fehlen der endständigen Galaktose. Es enthält also als Grundkohlenhydrat die Ganglio-*N*-triose II. Dieses Gangliosid wird, wohl infolge eines Enzymdefektes beim biologischen Auf- oder Abbau, bei der infantilen Form der amaurotischen Idiotie des Typs Tay-Sachs gespeichert und daher häufig auch als „Tay-Sachs-Gangliosid“ bezeichnet.

Weitere Hirnganglioside enthalten die Ganglio-*N*-triose II mit 2 NANS (GGNT_{III}2) oder Lactose mit 1 oder 2 NANS. Das kleinste Gangliosid, G_{Gal}1, enthält als Zucker nur ein Molekül Galaktose, das an C-3 mit NANS verknüpft ist. Schema 2, das auch einem Weg des biologischen Abbaus entspricht, gibt eine Übersicht über die Strukturbeziehungen der Hirnganglioside.

[39] E. Klenk, L. Hof u. L. Gorgias, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 149 (1967).

[40] R. Kuhn u. H. Wiegandt, Z. Naturforsch. 19b, 256 (1964).

7. Ganglioside der Milz und Erythrocyten

Die Ganglioside des visceralen Systems sind wesentlich weniger untersucht als die Hirnganglioside. Als Hauptkomponente bei Mensch, Pferd und Rind findet man ein G_{Lact}1. Aus Menschen- sowie Rindererythrocyten und Milz konnten wir weitere höhere Ganglioside isolieren, deren Strukturaufklärung noch aussteht. An ihrem Aufbau ist neben Galaktosamin auch Glucosamin beteiligt. Ein glucosaminhaltiges Gangliosid G_{LNT}1(NGNS) aus den roten Blutkörperchen und der Milz von Rindern trägt als Grundkohlenhydrat die bisher nur als Inhaltsstoff der Frauenmilch bekannte Lacto-*N*-neotetraose [15]. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß in parenchymatösen Organen auch Ganglioside vorkommen, die sich von den dort vorhandenen sialinsäurefreien Glykosphingolipiden (vgl. Tabelle 2) ableiten. Dafür sprechen die Existenz von G_{Lact}1 und einem weiteren, kürzlich aus Darmgewebe isolierten Gangliosid, das Sphingosin, Fettsäure, Sialinsäure, Glucose und Galaktose im Verhältnis 1:1:1:1:2 enthält [41].

Tabelle 2. Sialinsäurefreie Glykosphingolipide in Erythrocyten, Milz, Nieren usw.

GalNAc(β1,3)Gal(β1,4)	Gal(β1,4)Glc-Ceramid (Globosid) [54]
Gal —	Gal — Glc-Ceramid
	Gal — Glc-Ceramid
	Glc-Ceramid

Es stellt sich die Frage, ob der spezifische Aufbau gewisser lipid- oder auch protein-gebundener Oligosaccharide charakteristisch für bestimmte Zellstruk-

[41] W. R. Vance, C. P. Shook u. J. M. McKibbin, Biochemistry 5, 435 (1966).

turen (z.B. Zelloberflächen) ist. Die Befunde deuten darauf hin, daß ganglio-*N*-tetraose-haltige Verbindungen im wesentlichen auf das Zentralnervensystem und globo-*N*-tetraose-haltige Verbindungen auf parenchymatös-stromale Elemente beschränkt sind.

8. Speicherkrankheiten

Bei einigen seltenen Erbkrankheiten des Menschen mit autosomal rezessivem Erbgang, den Sphingolipidosen, werden Sphingolipide im Hirn und häufig auch in anderen Organen wie der Milz, den Nieren und der Leber

Tabelle 3. Sphingolipidosen [a].

Krankheit	hauptsächlich gespeicherte Substanz	fehlendes Enzym
1. Amaurotische Idiotie a) Infantile Form (Typ Tay-Sachs) b) Spätinfantile Form (biochem. Sonderform?)	GGNT _{II} I GGNT ^I	spezif. Hexosaminidase? spezif. Galaktosidase?
2. Niemann-Picksche Krankheit	Sphingomyelin	Sphingomyelinase
3. Morbus Gaucher	Cer-Glc	spezif. Glucosidase
4. Metachromatische Leukodystrophie	Cer-Gal-SO ₃ ⁻	Sulfatase
5. Fabrysche Krankheit	Cer-Glc-Gal-Gal	spezif. Galaktosidase

[a] Pathochemische Veränderungen im Bereich der Ganglioside zeigen sich nach bisherigen Untersuchungen außer bei den in Tabelle 3 aufgeführten noch bei folgenden Krankheiten: Amaurotische Idiotie, juvenile und adulte Form; Gargoylismus (Pfaundler-Hurler-Syndrom) und bei der Globoid-Zellen-Leukodystrophie (Krabbe-Syndrom).

gespeichert. Offenbar können Enzyme, die am Stoffwechsel der Sphingolipide beteiligt sind, infolge eines vererbten Defektes des sie bestimmenden Struktur-Gens nicht gebildet werden. In der Tat hat man bei

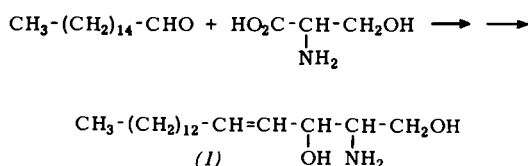
Bei einer weiteren Form der spätinfantilen System-Lipidose ist das Gangliosidspektrum derart verschoben, daß etwa 80 % aller Gangliosid-NANS im Gangliosid GGNT^I enthalten ist [43]. Normalerweise beträgt die Menge an GGNT^I-NANS nur etwa 18 % des gesamten Sialinsäuregehaltes aller Ganglioside.

Während bei der juvenilen und spätinfantilen Form der amaurotischen Idiotie ein mehr oder minder nahezu normales Gangliosidmuster gefunden wird, nimmt beim Gargoylismus, der Niemann-Pick'schen Krankheit und dem Morbus Gaucher die Menge an zwei Monosialogangliosiden zu, wahrscheinlich GGal^I und GLact^I [44].

Bei all diesen Krankheiten werden auch häufig die entsprechenden sialinsäurefreien Ceramid-oligosaccharide in erhöhter Konzentration gefunden. Mit der spezifischen Speicherung geht also bei den meisten Neurolipidosen eine Entgleisung des gesamten Glykolipidmetabolismus einher.

9. Biologischer Auf- und Abbau der Ganglioside

Das Sphingosin (1) wird im Organismus aus Palmitaldehyd und Serin aufgebaut:



Dabei entsteht zunächst Dihydrosphingosin, das anschließend dehydriert wird. Nach neueren Untersuchungen wird jede Hexose schrittweise mit dem Rumpfmolekül verknüpft. Dabei existiert für jedes Monosaccharid eine Klasse von Transferasen, die zwar zur Übertragung das gleiche Zuckernucleotid gebrauchen, deren Acceptorspezifität jedoch unterschiedlich ist (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4. Transferasen.

Enzym	Herkunft	Acceptor	Produkt
NANS-Transferasen	<i>Escherichia coli</i>	(NANS) _n	Colominsäure
	Rattenmammaria	Lact	3'-NANS-Lact
	Ziegencolostrum	Lact	6'-NANS-Lact
	Schaf, Submaxillaris	Desialo-mucin	NANS(2 → 6)GalNAc-Protein
	Hühnchen, Embryohirn	Ceramid-Lactosid (Des-NANS-GLact)	GLact ^I
	Hühnchen, Embryohirn	GGNT ^I	GGNT ^{2a}
Galaktose-Transferasen	Rattenmammaria	Glc	Lact
	Kuhcolostrum und -gewebe	GlcNAc	N-Acetyl-lactosamin
	Kuhcolostrum und -gewebe	GlcNAc-Protein	Gal-GlcNAc-Protein
	Hühnchen-Embryohirn	GGNT _{II} I	GGNT ^I

einigen dieser Sphingolipidosen einen Mangel an Enzymen des biologischen Abbaus bestimmter Sphingolipide nachweisen können. In Tabelle 3 sind diese Krankheiten, die bevorzugt gespeicherten Lipide und (soweit bekannt) die fehlenden Enzyme aufgeführt.

Die Gangliosidveränderungen sind weitaus am stärksten bei der infantilen amaurotischen Idiotie des Typs Tay-Sachs. Hier beträgt die Menge lipidgebundener Sialinsäure das 2- bis 3-fache des Normalen. Etwa 80 % entfallen auf das gespeicherte Gangliosid GGNT_{II}I, das sonst nur in untergeordneter Menge vorkommt. Alle anderen Mono-, Di- und Trisialoganglioside, die etwa 1 % des Trockengewichtes ausmachen, zeigen normale Werte [42].

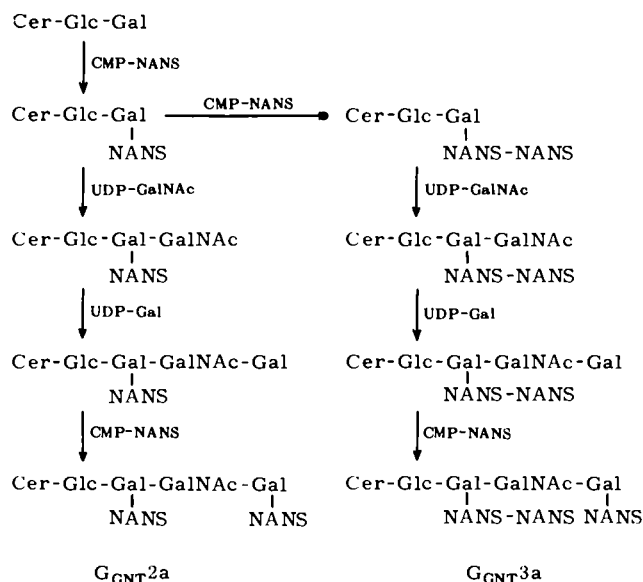
[42] A. Wagner, Klin. Wschr. 44, 398 (1966).

Den schrittweisen Aufbau der Hirnganglioside GGNT^{2a} und GGNT^{3a} zeigt Schema 3 [45].

[43] H. Jatzkewitz u. K. Sandhoff, Biochem. biophysica Acta 70, 354 (1963); H. Jatzkewitz, H. Pilz u. K. Sandhoff, J. Neurochem. 12, 135 (1965); K. Suzuki, Life Sci. 3, 1227 (1964); N. K. Gonatas u. J. Gonatas, J. Neuropathol. exp. Neurol. 24, 318 (1965).

[44] H. Goodwin u. J. N. Cummings, J. Lipid Res. 7, 337 (1966); A. Taghavy, K. Salsman u. R. Ledeen, Federat. Proc. 23, 128 Nr. 163 (1964); P. F. Borri, G. J. M. Hooghwinkel u. G. W. F. Edgar, J. Neurochem. 13, 1249 (1966).

[45] A. Aree, H. F. Maccioni, R. Caputto, Arch. Biochem. Biophysics 11, 52 (1966); J. C. Steigerwald, B. Kaufmann, S. Basu u. S. Roseman, Federat. Proc. 25, 587 Nr. 2247 (1966); S. Basu, B. Kaufmann u. S. Roseman, J. biol. Chemistry 240, PC 4115 (1965); Federat. Proc. 25, 587 Nr. 2248 (1966).



Schema 3. Biosynthese der Hirnganglioside GGNT 2a und GGNT 3a.

Auch beim biologischen Aufbau scheint die schon bei der Spaltung mit Neuraminidase gefundene sterische Hinderung [13] eine Rolle zu spielen. Die Bindung der Sialinsäure an die 3-Stellung der vorderen Galaktose von GNTr II oder GNT kommt nicht zustande, wenn bereits GalNAc mit der 4-Stellung derselben Galaktose verbunden ist.

Dasselbe gilt auch beim schrittweisen biochemischen Abbau, z.B. von Cer-Glc-Gal(NANS)-GalNAc-Gal-NANS (G_{GNT2a}).

Zuerst wird die endständige NANS abgespalten, dann die folgende Galaktose. Die nun verbleibende endständige GalNAc, die von einer Hexosaminidase nur schlecht angegriffen wird – ein Punkt, an dem der enzymatische Defekt der Tay-Sachs-Krankheit liegen könnte – muß wiederum abgespalten sein, bevor der weitere Abbau durch NANS-Entfernung usw. einsetzen kann.

10. Subzellulärlokalisierung und biologische Eigenschaften der Ganglioside

Um nähere Anhaltspunkte über die funktionelle Bedeutung der Ganglioside in der Zelle zu gewinnen, haben wir die Lokalisation dieser Lipide in der Zelle studiert. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Ganglioside Bestandteile neuronaler Membranen aus Zell-soma, Dendriten, Axonen und den synaptischen Verbindungen sind; sie befinden sich also gerade an der Stelle der Impulsübertragung von Nerv zu Nerv.

Homogenisiert man graue Hirnsubstanz besonders vorsichtig, so bleiben die vom Nerven selbst abreißen- den Nervenendigungen (Synaptosomen) teilweise erhalten. Diese Nervenendigungen – sie lassen sich durch Differential- und Dichtegradientenzentrifuga- tion weitgehend rein gewinnen^[46] (vgl. Abb. 1a) –

[46] E. De Robertis, A. Pellegrino de Iraldi, G. Rodriguez de Lores Arnaiz u. L. Salganicoff, J. Neurochem. 9, 23 (1962); V. P. Whittaker, Biochem. J. 72, 694 (1959); E. G. Gray u. V. P. Whittaker, J. Anatomy 96, 79 (1962).

bestehen im wesentlichen aus einer äußeren Membran, die kleine Mitochondrien und für Synapsen typische kleine Vesikel umschließt. Die synaptischen Vesikel enthalten die chemischen Überträgersubstanzen, die für die Erregungsübertragung von Nerv zu Nerv verantwortlich gemacht werden. Sie finden sich stark vermehrt an der direkten synaptischen Kontaktstelle, der präsynaptischen Membran. Durch Lyse in hypotonischem Milieu ^[47] platzen die Synaptosomen und entlassen ihren Inhalt; die entstehenden Bruchstücke können durch Zentrifugation getrennt werden (Abb. 1b und 1c). Verfolgt man die Verteilung der Ganglioside, so findet man sie nicht, wie anfänglich vermutet ^[48], in den synaptischen Vesikeln, sondern in Membranelementen, die nach elektronenoptischer Evidenz von der äußeren Membran der Nervenendigungen stammen. In den Mitochondrien wurden keine Ganglioside gefunden ^[49].

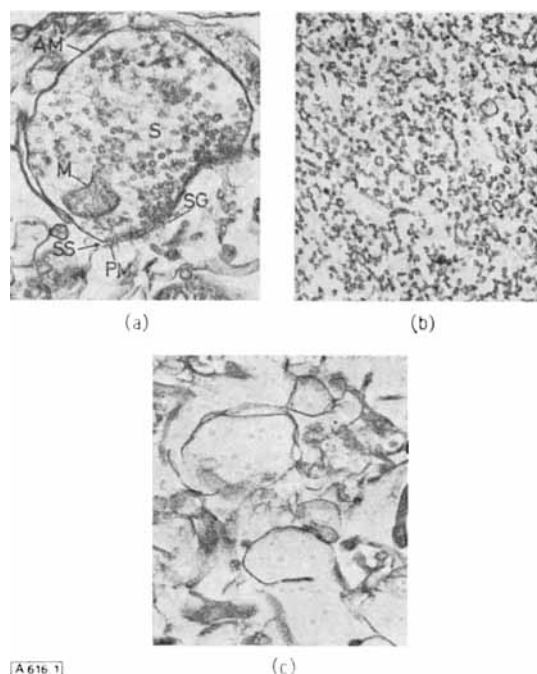


Abb. 1. (a): Elektronenmikroskopische Aufnahme einer isolierten Nervenendigung aus Rinderhirncortex (Fixierung: OsO_4 , Einbettung: Vestopal W), $\times 45000$. AM = Äußere Membran, S = synaptische Vesikel, M = Mitochondrion, SS = synaptischer Spalt, PM = postsynaptische Membran, SG = subsynaptisches Gespinst.
(b): Elektronenoptische Aufnahme isolierter synaptischer Vesikel, $\times 40000$.
(c): Elektronenoptische Aufnahme der gangliosidhaltigen Membranen aus Nervenendigungen, $\times 40000$.

Eine weitere Möglichkeit, die gangliosidhaltigen Strukturen in subzellulären Fraktionen anzureichern, besteht in der Behandlung mit Triton X 100 (Isooctylphenoxy-polyäthoxy-äthanol)^[10]. Dieses neutrale Detergens löst Ganglioside nur in untergeordnetem Maße aus den Membranen heraus.

[47] E. De Robertis, G. Rodriguez de Lores Armaiz, L. Salganicoff, A. Pellegrino de Iraldi u. L. M. Zieher, J. Neurochem. 10, 225 (1963); V. P. Whitaker, I. A. Michaelson u. R. J. A. Kirkland, Biochem. J. 90, 293 (1964).

[48] R. M. Burton, R. E. Howard, St. Baer u. J. M. Balfour, Biochem. biophysica Acta 84, 441 (1964).

[49] H. Wiegandt, J. Neurochem. 14, 671 (1967).

Suspendiert man eine Gesamtmikrosomenfraktion aus grauer Hirnsubstanz oder osmolysierte Nervenendigungen, die von ihren Mitochondrien und synaptischen Vesikeln befreit sind, in schwach alkalischem Triton X 100, so werden die mannigfaltigen Membranarten verschieden stark angegriffen. Analysen der ungelöst gebliebenen Membranelemente zeigen, daß gerade die Teilchen mit hohem Gangliosidgehalt erhalten geblieben sind.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nervenendigungen sieht man an der äußeren Seite axonaler Membranen und besonders direkt am synaptischen Spalt Strukturen, die reich an sauren Kohlenhydraten sind^[50]. Schon die Lokalisation der Ganglioside erweckt den Verdacht, daß diese amphiphilen, typisch membranbildenden Lipide, die ja auch elektrische Ladungen tragen, eine Rolle bei der Erregungsleitung der Neuronen spielen könnten. Solche Vermutungen erhalten eine Stütze durch zahlreiche Beobachtungen der physiologischen Wirkung dieser Verbindungen.

Tetanustoxin wird an Ganglioside gebunden^[51]. (Bei hoher Toxinkonzentration bindet z.B. G_{GNT}^3 etwa 0,6mol des Tetanusgiftstoffes (Mol.-Gew. ca. 70000)^[13].) Es wird vermutet, daß die Wirkung von Tetanustoxin auf einer Blockierung der Inhibitionssynapsen, d.h. Hemmung der Freisetzung von Neurotransmittersubstanzen, beruht^[52]. L. S. Wolfe beobachtete eine Parallelität zwischen der regionalen Verteilung der γ -Aminobuttersäure, der vermutlichen Überträgersubstanz an Inhibitionssynapsen, und den Gangliosiden^[53].

Für die Beteiligung der Ganglioside bei der Erregungsübertragung sprechen auch die Versuche McIlwains^[55]: Hirnschnitte, die 5 Std. in tris-gepufferter Glucose-Ringer-Lösung bei 0°C gelegen hatten, zeigten bei elektrischer Reizung keine Extraatmung mehr, während die reguläre Atmung durch die Kältebehandlung unberührt geblieben war. Zusatz von Gangliosiden zu einem solchen partiell geschädigten Präparat stellte die mögliche Extraatmung bis zu 80 % wieder her. McIlwain erklärte dieses Phänomen durch in der Kälte aus den Zellkernen austretende Histone, die an Gangliosidzentren gelangen und diese blockieren.

Ganglioside können bei Injektion in die Blutbahn die Bildung gegen sie gerichteter Antikörper anregen. Die

serologische Spezifität der Ganglioside ist in ihrem Kohlenhydratteil lokalisiert, wobei auch die Sialinsäure eine wesentliche Rolle spielt. Als Träger von Blutgruppeneigenschaften erwiesen sich die Ganglioside in $Rh_0(D)$ -Antigen-Antikörpersystemen^[54]. Die Lacto-*N*-neotetraose des Gangliosids $G_{\text{LNT}}^1(\text{NGNS})$ zeigt im serologischen Test eine Spezifität nach Art der Pneumokokken-Typ-XIV-Polysaccharide.

Ganglioside bewirken nach McIlwain^[56] weiterhin eine Abnahme der Konzentration von Natrium und Kalium im Nicht-Inulinraum. Dieser Effekt beruht auf einer Abnahme des Natrium-Raumes sowie einem Anwachsen des Kalium-Raumes mit gleichzeitiger Verringerung der Kaliumkonzentration im Kalium-Raum.

5-Hydroxytryptamin (Serotonin) ist vermutlich eine der chemischen Neurotransmittersubstanzen im Zentralnervensystem. Nach Wooley und Gommi^[57] muß der Serotoninrezeptor Sialinsäure enthalten und wahrscheinlich ein Gangliosid sein. Am Funduspräparat war nach Neuraminidasebehandlung die Serotoninempfindlichkeit aufgehoben. Eine Wiederherstellung gelang durch Zugabe von Gangliosiden, wobei sich G_{Lact}^2 als wirksamstes erwies. Dieses Gangliosid bindet das Serotonin am stärksten; wahrscheinlich entsteht ein äquimolarer Komplex^[58]. In Gegenwart von Ca^{2+} bildet sich kein Komplex zwischen Gangliosid und Serotonin, da das Ca^{2+} seinerseits vom Gangliosid noch stärker gebunden wird. Auch Reserpin bewirkt eine Freisetzung des Serotonins aus dem Komplex. Nach diesen Ergebnissen muß man annehmen, daß die Ganglioside an wichtigen Funktionen des Zentralnervensystems, vielleicht allgemein an den Membranen, beteiligt sind. Es wird Aufgabe weiterer Forschung sein, ein einheitliches Bild über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion dieser Verbindungen zu entwickeln.

Herrn Professor Dr. P. Karlson bin ich zu großem Dank für die eingehende Durchsicht des Manuskriptes verpflichtet.

Eingegangen am 3. Juli 1967 [A 616]

[50] A. Rambourg u. C. P. Leblond, J. Cell Biol. 32, 27 (1967).

[51] R. Kuhn et al., Angew. Chem. 72, 805 (1960).

[52] V. B. Brooks, D. R. Curtis u. J. C. Eccles, J. Physiology 135, 655 (1957).

[53] J. A. Lowden u. L. S. Wolfe, Canad. J. Biochem. 42, 1587 (1964).

[54] M. C. Dodd, N. J. Bigley u. V. B. Geyer, Science (Washington) 132, 1398 (1960); M. C. Dodd, N. J. Bigley, G. A. Johnson u. R. H. McCluver, Nature (London) 204, 549 (1964).

[55] H. McIlwain: The Chemical Exploration of the Brain. Elsevier, Amsterdam 1963.

[56] R. Varon u. H. McIlwain, J. Neurochem. 13, 257 (1966).

[57] D. W. Wooley u. B. W. Gommi, Nature (London) 202, 1074 (1964); Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 959 (1965); W. Gielen, Z. Naturforsch. 21b, 1007 (1966).

[58] W. Gielen, Z. Naturforsch. 21b, 1007 (1966).