

Chemie und Bedeutung des Kohlenhydrat-Anteils menschlicher Serum-Glykoproteine

Von Karl Heide und Hans-Gerhard Schwick^[*]

Herrn Professor Karl Winnacker zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Glykoproteine üben als Transportproteine, Inhibitoren, Enzyme, Hormone, Komplementfaktoren und Immunglobuline wichtige biologische Funktionen aus. Ihre Chemie ist durch einige Regeln gekennzeichnet. So können nur Asparagin, Threonin oder Serin die Oligosaccharid-Gruppen tragen; bei der Peptidkette stets die Gruppierung Asn-X-Thr oder Asn-X-Ser vor. Beim Molekulargewicht der Glykoproteine, ihrem Kohlenhydrat-Gehalt und den relativen Anteilen der einzelnen Zucker findet man allerdings kaum Übereinstimmungen. Die biologische Bedeutung des Kohlenhydrat-Anteils ist noch ungeklärt, doch zeichnet sich eine Vorstellung von der Rolle der leicht entfernbar Neuraminsäure ab.

1. Einleitung

Glykoproteine sind in der Natur weit verbreitet. Sie bestehen aus einem Proteinanteil und kovalent daran gebundenen Zuckern, die laut Definition keine Nucleinsäuren sein sollen. Uns interessieren hier nur die Glykoproteine des menschlichen Blutplasmas^[1-7]. Sie bilden zahlenmäßig den überwiegenden Anteil der Plasmaproteine, denn frei von Kohlenhydraten sind von den ca. 60 gut charakterisierten und in reiner Form isolierten Proteinen nur Albumin, retinol-bindendes Protein^[8] und einige Spurenproteine (Tabelle 1). Infolge des reichlichen Vorkommens des Albumins, das über 50% der Gesamtproteine ausmacht, überwiegen jedoch mengenmäßig die kohlenhydrat-freien Proteine.

Tabelle 1. Kohlenhydrat-freie Human-Serumproteine. (Das Serum enthält ca. 43% Glykoproteine und ca. 57% kohlenhydrat-freie Proteine.)

Protein	Menge im Serum [mg/100 ml]
Albumin	4400
retinol-bindendes Protein	5
C-reaktives Protein	<1
Lysozym	1
α -Amylase (B) (Speichel)	
Carboanhydrase	

2. Chemische Zusammensetzung und Struktur der Glykoproteine

2.1. Kohlenhydrat-Gehalt der Glykoproteine

Die Zuckerbausteine, die in den Glykoproteinen gefunden werden, sind *N*-Acetyl-glucosamin, *N*-Acetyl-galaktos-

amin, Galaktose, Mannose, Glucose, Fucose, *N*-Acetyl-neuraminsäure (Sialinsäure) und Xylose. Sie wurden früher nach den von uns eingehend beschriebenen Modifikationen bekannter Methoden bestimmt^[9]: Galaktose und Mannose nach der Orcin-Methode von Sörensen und Haugegaard, Hexosamin mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd nach Elson und Morgan in der Modifikation von Blix, Acetyl-neuraminsäure mit Bial-Reagens nach Klenk, Fucose mit der Cystein-Schwefelsäure-Methode von Dische und Shettles.

Neuerdings gelingt es, die Zucker mit verbesserten chromatographischen Techniken nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen^[10-13]. Glucosamin und Galaktosamin werden im Aminosäure-Analysator bestimmt^[14]. Zur Bestimmung der Neuraminsäure wird meist die Thiobarbitursäure-Methode herangezogen^[15]. Kürzlich wurde *o*-Phenanthrolin empfohlen, das mit gebundener Neuraminsäure ohne jede Vorbehandlung einen farbigen Komplex bildet^[16].

In Tabelle 2 sind die Kohlenhydrat-Gehalte einer Reihe von Human-Plasmaproteinen zusammengestellt. Für einige Plasmaproteine liegen auch detailliertere Angaben vor (Tabelle 3). In Tabelle 4 ist der Anteil der einzelnen Zuckerbausteine am Gesamtkohlenhydrat-Gehalt veranschaulicht (Ig = Immunglobulin).

Glykoproteine, über die keine so ausführlichen Analysen vorliegen, sind vor allem die Komplementsfaktoren C5^[4,7] und C9^[48] sowie die Lipoproteine. In den Lipoproteinen, die etwa 10–15% der Gesamtserumproteine ausmachen, wurden von uns 1957 erstmals Kohlenhydrate nachgewiesen^[49]. Wir fanden im β -Lipoprotein bei einem Peptidanteil von 26.5% 1.4% Hexosen, 0.2% Neuraminsäure und 0.45% Acetyl-hexosamin. α_1 -Lipoprotein hat einen Peptidanteil von 41% mit 1.3% Hexosen, 0.1% Neuraminsäure und 0.25% Acetyl-hexosamin. Diese Befunde wurden 1966 bestätigt^[50]. Von den insgesamt sechs Apolipoproteinen – das sind die Peptidketten, die das Gerüst der Lipoproteine bilden – enthalten Apo-Ser und Apo-Ala Kohlenhydrate^[51].

[*] Prof. Dr. H.-G. Schwick und Dr. K. Heide
Behringwerke AG
355 Marburg/Lahn

Tabelle 2. Kohlenhydrat-Gehalt von Human-Plasmaproteinen.

	Mol-Gew.	Hexosen [%]	Ac-Hexosamin [%]	Ac-Neuraminsäure [%]	Fucose [%]	Summe [%]	Lit.	
Präalbumin	50000	0.4	—	—	—	—	[7]	
α_1 -Antitrypsin	54000	5.0	3.6	3.4	0.2	12.2	[17]	
Prothrombin	60000	4.6 (2.8)	2.9 (3.1)	4.2 (2.3)	—	11.7	[18]	
α_1 -B-Glykoprotein	50000	4.8	4.4	3.7	0.4	13.3	[7]	
Transferrin	55700	5.4	4.7	3.2	0.8	14.1	[7, 19]	
α_1 -T-Glykoprotein	60000	5.5	4.5	3.4	0.3	13.7	[7]	
α_1 -Antichymotrypsin	68000	9.9	7.4	6.6	0.7	24.6	[17]	
9.5S- α_1 -Glykoprotein	308000	5.5	3.7	3.5	0.1	12.8	[20]	
Gc-Globulin	50800	2.0	2.0	0	0.2	4.2	[7]	
Inter- α -Trypsininhibitor	160000	3.1	3.2	2.0	0.1	8.4	[17]	
harnsäure-bindendes α_1 - α_2 -Globulin						12.1	[21]	
Antithrombin III	65000	6.2	4.1	3.1	—	13.4	[17]	
Zn- α_2 -Glykoprotein	41000	7.0	4.0	7.0	0.2	18.2	[17]	
α_2 -HS-Glykoprotein	49000	5.2	3.9	4.1	0.2	13.4	[17]	
C1-Inaktivator	104000	10.8	9.2	14.3	0.4	34.7	[17]	
histidin-reiches 3.8S- α_2 -Glykoprotein	58500	6.4	4.4	3.5	0	14.3	[22]	
Serum-Cholinesterase	348000	9.3	8.4	6.0	0.2	23.9	[23]	
Plasminogen	81000					1.45	[24]	
4S- α_2 - β_1 -Glykoprotein	60000	10.7	9.0	7.5	0.5	27.7	[25]	
8S- α_3 -Glykoprotein	220000	11.0	10.8	9.2	0.4	31.4	[26]	
β_1 C-Globulin (C3)	185000	1.8	0.48	0.45	0.16	2.73	[27]	
β_1 E-Globulin (C4)	230000	1.9	1.4	1.0	0.1	4.3	[28]	
Fibrinogen	341000	1.1	1.0	0.7	0	2.8	[7]	
Antihämophiles Globulin (F VIII)	2×10^6 (240000)		2.8					
Faktor XIII	340000	1.9	1.6	1.2	0.2	4.9	[29]	
β_2 -Glykoprotein I	40000	7.8	6.2	4.5	0.3	18.8	[7]	
C3-Aktivator	{}	60000	2.2	1.8	1.5	0.2	5.7	[30]
β_2 -Glykoprotein II		35000	2.5	2.0	5.5	0.1	10.0	[31]
IgG-Globulin	150000	1.1	1.3	0.3	0.2	2.9	[32]	
IgA-Globulin	160000 (Aggr.)	3.2	2.3	1.8	0.2	7.5	[7]	
IgM-Globulin	900000 (Aggr.)	5.4	4.4	1.3	0.7	11.8	[32]	
IgD-Globulin [mol/mol]	166000	47	36	15	0.5	11.3	[33]	
IgE-Globulin [mol/mol]	190000	53	36	18	4	11.4	[34]	

Tabelle 3. Kohlenhydrat-Anteile einiger Humanserum-Glykoproteine.

	Gal	Hexosen [%]	Glu	Ac-Hexosamin [%]	Ac-Neuraminsäure [%]	Fucose [%]	Xylose [%]	Summe [%]	Lit.
	Gal	Man	Glu	Ac-Hexosamin [%]	Ac-Neuraminsäure [%]	Fucose [%]	Xylose [%]	Summe [%]	Lit.
α_1 -Fetoprotein	0.49	0.68		0.89	1.3	+		3.36	[35, 36]
saueres α_1 -Glykoprotein	7.6	5.5		13.2	10.9	0.7	+	37.9	[1, 11]
thyroxin-bindendes Globulin	2.5	2.3	0.8	5.0 [a]	3.7	0	0.5	14.8	[37]
Coeruloplasmin	1.2	1.8		2.4	2.4	0.18		7.98	[38]
Haptoglobin	2.8	2.8		5.3	5.3	0.2		16.4	[39]
α_2 -Makroglobulin	1.36	2.07		3.94	1.80	0.26		9.43	[40, 17]
Hämopexin	3.08	3.84		7.7	6.9	0.4		21.92	[41]
Transferrin	0.74	1.85		2.0	1.3			5.89	[42]
C1q	2.62	0.87	2.53	1.35 [a]	0.31	0.13		7.81	[43, 44]
J-Kette [mol] [b]	2	3		3-4	1	1			[45]
„Secretory component“	3.12	3.95		4.36	1.9	2.26		15.59	[46]

[a] Freie Base.

[b] Die J-Kette ist eine zusätzliche Kette in IgA und IgM.

Man ist heute in der Lage, die Analysenzahlen von sehr viel mehr Glykoproteinen zu überschauen als dies früher möglich war. Hierzu haben vor allem die Arbeiten aus unseren Laboratorien über hochgereinigte, aus Nebenfraktionen der technischen Plasmafraktionierung isolierte Glykoproteine beigetragen.

Eine Betrachtung der Tabellen zeigt, daß der Kohlenhydrat-Gehalt der Plasmaproteine in einem weiten Bereich streut: Präalbumin enthält nur 0.4% Hexosen, das saure α_1 -Glykoprotein dagegen ca. 38% Gesamt-Kohlenhydrate. (Neue Analysen mit der Gaschromatographie weisen darauf hin, daß Präalbumin überhaupt keine Kohlen-

hydrate enthält^[52]; der Nachweis solch geringer Mengen an Hexosen mit der von uns angewandten Orcin-Methode ist auch problematisch.) Das saure α_1 -Glykoprotein gilt für Strukturuntersuchungen als Standard-Typ eines Serum-Glykoproteins.

Auch die Relation der Zucker zueinander ist unterschiedlich. So enthält z. B. das Gc-Globulin keine Neuraminsäure. Fucose fehlt im histidin-reichen α_2 -Glykoprotein, im Fibrinogen und im β_2 -Glykoprotein III. Im sauren α_1 -Glykoprotein ist kein Galaktosamin nachweisbar.

Das Galaktose : Mannose-Verhältnis (Tabelle 3) ist bei kohlenhydrat-reichen α_1 -Globulinen >1, beim Haptoglo-

Tabelle 4. Anteile der Zuckerbausteine am Gesamtkohlenhydrat-Gehalt.

	Hexosen [%]	Ac-Hexosamin [%]	Ac-Neuraminsäure [%]	Fucose [%]
saures α_1 -Glykoprotein	35	35	29	1.8
α_1 -Antitrypsin	41	29	28	1.6
Prothrombin	39	25	36	
α_1 B-Glykoprotein	36	33	28	
Transferrin	38	33	23	5.7
thyroxin-bindendes Globulin	35	39	23	3.1
			(Xylose)	
α_1 T-Glykoprotein	40	33	25	2.2
α_1 -Antichymotrypsin	40	30	27	2.8
9.5S- α_1 -Glykoprotein	43	29	27	0.8
α_1 -Fetoprotein	33	29	38	
Gc-Globulin	48	48	0	4.8
Inter- α -Trypsininhibitor	37	38	24	1.2
Antithrombin III	46	31	23	
Coeruloplasmin	37	30	30	2.5
Zn- α_2 -Glykoprotein	38	22	38	
α_2 -HS-Glykoprotein	39	29	31	1.5
C1-Inaktivator	31	26	38	1.1
histidin-reiches	45	31	24	0
3.8S- α_2 -Glykoprotein				
Haptoglobin	34	32	32	1.2
α_2 -Makroglobulin	36	42	19	2.8
	41.5	35	22	1.3
Serum-Cholinesterase	39	35	25	0.8
8S- α_3 -Glykoprotein	35	34	29	1.3
Hämopexin	31.5	35	31	1.8
Transferrin	44	34	22	
Fibrinogen	39	36	25	0
Faktor XIII	39	33	24.5	4.1
β_2 -Glykoprotein I	41.5	33	24	1.6
C3-Aktivator	{}	39	31.5	26
β_2 -Glykoprotein II		25	20	3.5
β_2 -Glykoprotein III		55	—	
IgG-Globulin	38	45	10	7
IgA-Globulin	43	31	24	2.7
IgM-Globulin	46	37	11	6
C1q	74	21	3.8	1.6
„Secretory component“	46	28	12	15

bin beträgt es 1 und bei einer Reihe anderer Glykoproteine ist es <1. Das Verhältnis Gesamtzucker:Hexosamin liegt im allgemeinen im Bereich von 2.9–3.4. Das Hexosen:Hexosamin-Verhältnis liegt bei 1 oder leicht darüber. Hierbei fallen die „Secretory component“ und C1q aus der Reihe. C1q zeigt auch hinsichtlich seiner Aminosäure-Zusammensetzung Besonderheiten^[43].

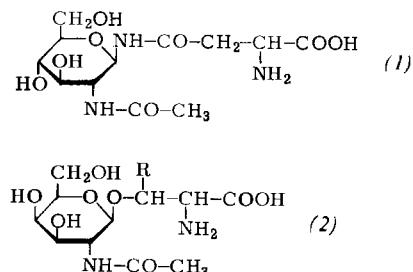
Die höchsten Neuraminsäure-Werte gehen einher mit einem besonders hohen Gesamtkohlenhydrat-Gehalt. Dies gilt für den C1-Inaktivator und das saure α_1 -Glykoprotein. β_2 -Glykoprotein III hat bei einem Gesamtkohlenhydrat-Gehalt von nur 10% den höchsten relativen Anteil an Neuraminsäure. Die Neuraminsäurereste als Träger einer negativen Ladung verleihen den Glykoproteinen eine größere elektrophoretische Beweglichkeit. Dies macht sich besonders bei den Immunglobulinen bemerkbar (Tabelle 2 und 3).

2.2. Die Kohlenhydrat-Peptid-Bindung^[1]

Die Kohlenhydrate sind in Form größerer Oligosaccharid-Einheiten mit den Peptidketten verbunden. Die Molekulargewichte dieser Zuckerkomplexe betragen beim Transferrin 2370 und beim sauren α_1 -Glykoprotein 3170. Zu Untersuchungen über die Natur der Bindung werden die Glyko-

proteine entweder mit Pronase, einer Proteinase aus *Streptomyces griseus*, oder mit einer Kombination von Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin oder Papain behandelt. Aus den Spaltansätzen lassen sich die Glykopeptide herausfraktionieren. Überschüssige Aminosäurereste werden mit Pronase oder Carboxypeptidase entfernt.

Die Aufklärung der Bindung wird dadurch erleichtert, daß die Asparagin-Kohlenhydrat-Bindung relativ stabil ist gegen Alkalien und Säuren. Verdünnten Säuren gegenüber



ist sie stabiler als die Glykosidbindungen in den Oligosaccharid-Komplexen. Es war daher möglich, aus einem Glykopeptid die Verbindung (1) zu isolieren, in der der Zuckerkomplex über die reduzierende Gruppe des *N*-Acetyl-glucosamins mit der Amidgruppe des Asparagins verbunden ist. Dieser Bindungstyp ist charakteristisch für die meisten Plasmaproteine. Neben dieser *N*-Acylglykosylamin-Bindung findet man noch die *O*-glykosidische Bindung wie in (2)^[53]. Hierbei sind die Zucker z.B. über *N*-Acetylgalaktosamin mit der Hydroxygruppe von Threonin oder Serin verbunden. Diese Bindung kommt neben der *N*-Acylglykosylamin-Bindung im Human-IgA^[54] und im Kaninchen-IgG vor^[55]. In einem Waldenström-IgM wurde ausschließlich die *N*-glykosidische Bindung gefunden^[56].

2.3. Aufbau der Oligosaccharid-Einheiten

Die Sequenz der Zuckerbausteine wird durch sukzessiven enzymatischen Abbau der Glykopeptide mit Glykosidasen ermittelt. Hierbei werden Neuramidase, β -Galaktosidase, α -Mannosidase und β -Acetyl-glucosaminidase eingesetzt^[57]. Diese Enzyme geben zugleich Hinweise über die Art der Bindung, mit der die Zuckerbausteine verknüpft sind. Weitere Aufklärung hierüber erhält man durch Perjodat-Oxidation und durch Methylierung der Glykopeptide mit anschließender Charakterisierung der Alditolacetat-Derivate der methylierten Zucker durch Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie^[58, 59]. Neuerdings wird auch die alkalische Hydrolyse mit anschließender Desaminierung mit salpetriger Säure empfohlen^[60].

Untersuchungen über die Oligosaccharid-Einheiten des IgM haben gezeigt, daß sie sich von zwei Grundtypen ableiten: einem einfach gebauten, der nur aus *N*-Acetyl-glucosamin und Mannose besteht, und einem komplexen Typ, der außerdem noch Galaktose, Fucose und Neuraminsäure enthält (Abb. 1). Sie enthalten offenbar eine gemeinsame Core. Ein im Prinzip ähnlicher Aufbau der Kohlenhydrat-

Gruppen wurde auch schon früher im sauren α_1 -Glykoprotein^[11], Fetuin, α_2 -Makroglobulin, Transferrin^[61], IgA^[54] und IgG^[62] nachgewiesen.

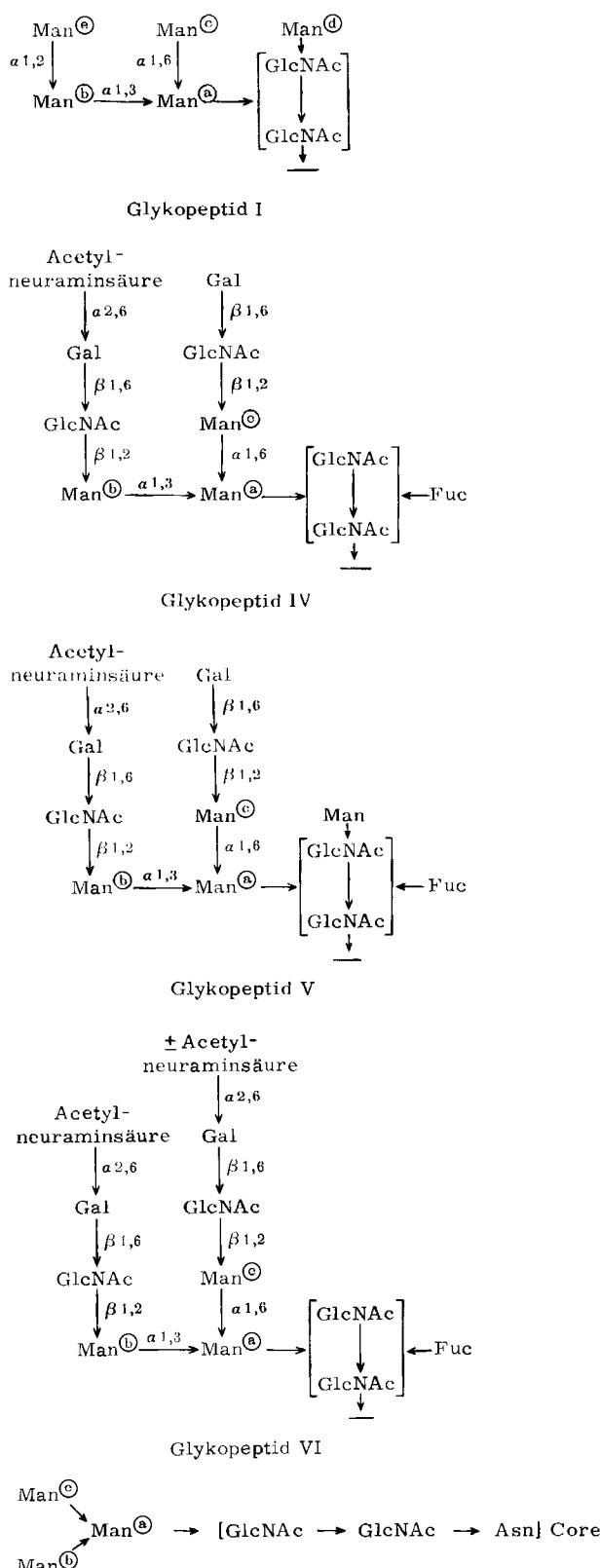


Abb. 1. Strukturvorschläge für die Glykopeptide I, IV, V und VI des Immunglobulins M (IgM) nach Hickman et al. [58]. Zur Core rechnet auch der bindende Asparaginrest.

Die Zuckerkomplexe sind also in jedem Falle über *N*-Acetyl-hexosamin mit der Peptidkette verbunden. Beim sauren α_1 -Glykoprotein soll sich nach Wagh die Kohlenhydrat-

Gruppe schon beim *N*-Acetyl-glucosamin verzweigen^[63], nach Sato erst bei der Mannose^[11]. Mannose gilt auch im Transferrin^[61] und in anderen Immunglobulinen als Verzweigungspunkt. Die Neuraminsäure, die als *N*-Acetyl-neuraminsäure vorliegt, und die Fucose sind endständig. Stellungsisomeren sind daher bei ihnen möglich. Die Neuraminsäure ist an Galaktose gebunden. Im sauren α_1 -Glykoprotein soll es jedoch auch einen bis drei schwerer abspaltbare Neuraminsäurereste geben, die mit *N*-Acetyl-glucosamin verknüpft sind^[60].

Abweichungen vom normalen Aufbau der Zuckerkomplexe wurden bei mehreren Proteinen beobachtet. Im Liquor fand man ein neuraminsäure-armes Transferin^[7, 64]. Neuraminsäure-armes, saures α_1 -Glykoprotein wurde im Serum und Urin von Patienten mit Morbus Hodgkin, psoriatischer Arthritis und Diabetes gefunden^[65, 66]. Als Erklärung wird angeführt, daß diese chronisch Kranken das Glykoprotein über lange Zeit in ungewöhnlich großen Mengen bilden und daß dabei ihre Synthese-Kapazität nachläßt. Variation der Kohlenhydrate wurde auch im Falle des Fibrinogens beschrieben^[67, 68]. Der Gerinnungsfaktor X aus Rinderplasma soll in zwei Formen vorkommen: Faktor X-I hat ein bis zwei Neuraminsäure- und ein bis zwei Hexosereste weniger als Faktor X-II bei gleicher Gerinnungsaktivität^[69].

2.4. Lokalisation der Kohlenhydrate in den Peptidketten

Die genaue Lokalisation der Kohlenhydrat-Komplexe (hier als C1, C2 usw. bezeichnet) in den Peptidketten ist bisher nur für IgM- und IgG-Globulin und das saure α_1 -Glykoprotein bekannt. Im Human-IgM befinden sich in jedem Monomeren (Molekulargewicht 180000) zehn Oligosaccharid-Einheiten^[70], also auf jeder μ -Kette fünf (Abb. 2). C1 liegt im Fd-Bereich, etwa bei Aminosäure 170, C2 in der Hinge-Region nahe der Disulfidbrücke etwa bei Position 230. C3, C4 und C5 liegen im Fc-Bereich. Die im Inneren des Moleküls gelegenen C1, C2 und C3 sind vom komplexen Typ, C4 und C5 bestehen nur aus Hexosamin und Mannose.

Diese Beobachtungen, die an den beiden Waldenström-IgM-Globulinen Ou und Di gemacht wurden, konnten

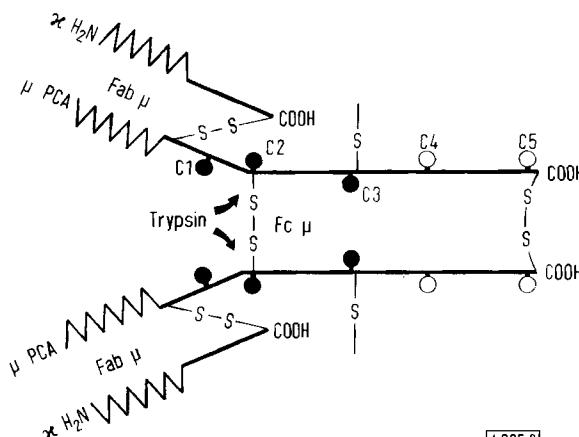


Abb. 2. Schema der Polypeptidketten-Struktur einer Monomerenheit des Human-IgM Ou mit den Positionen der Kohlenhydrat-Komplexe C1-C5 (nach [70]). PCA = 5-Oxopyrrololidincarbonyl. A 985-2

am IgM-Paraprotein Dau bestätigt werden^[71]. Die Kohlenhydrat-Zusammensetzung der fünf Oligosaccharid-Einheiten dieser drei IgM-Globuline ist aus Tabelle 5 ersichtlich. Es besteht bis auf die kursiv gedruckten Mannose-Werte recht gute Übereinstimmung. Bei diesen Untersuchungen war besonders darauf zu achten, daß die J-Kette entfernt wird, denn sie enthält ebenfalls Kohlenhydrate (s. Tabelle 3).

Tabelle 5 veranschaulicht zugleich die Mikroheterogenität der Glykoproteine. Fast alle Glykoproteine sollen die Kohlenhydrat-Einheiten in verschiedenen Stadien der Vervollständigung oder mit kleinen Modifikationen enthalten^[2, 58, 72, 73]. (Diese Mikroheterogenität am Beispiel der Waldenström-Globuline demonstrieren zu wollen, ist sicherlich nicht ganz korrekt, denn jedes Paraprotein ist einmalig – dies gilt für seine Aminosäuren und vielleicht auch für seine Kohlenhydrate.)

Das IgG enthält nur etwa ein Viertel der Kohlenhydrate (2.9 %) des IgM. Diese liegen im Falle des Kaninchen-IgG in drei Oligosaccharid-Einheiten vor^[55] (Abb. 3). C1 befindet sich im Fd-Teil jeder der beiden H-Ketten und ist

Die Tatsache, daß es neben kohlenhydrat-armen IgG-Molekülen kohlenhydrat-reichere mit mehreren Zucker-Einheiten gibt, wurde auch im Falle des Human-IgG beschrieben^[74]. Von 76 IgG-Myelomglobulinen hatten 29% einen höheren Kohlenhydrat-Gehalt. In kohlenhydrat-armen Molekülen sind die Kohlenhydrate nur im Fc-Teil lokalisiert. Ein Beispiel hierfür ist das IgG1-Globulin Eu, dessen komplette Aminosäure-Sequenz bekannt ist und dessen Kohlenhydrat-Einheit am Asparagin-297 sitzt^[75].

In Molekülen mit 2- bis 2.5-fach erhöhtem Kohlenhydrat-Gehalt kommen die Zucker außerdem noch im Fd-Teil oder in den L-Ketten vor. In Molekülen mit 3- bis 4-fach höherem Zucker-Gehalt findet man sie im Fc- und Fd-Teil und in den L-Ketten. Die kohlenhydrat-reichen IgG-Moleküle haben außerdem wesentlich mehr Acetyl-neuraminsäure: Ihr Acetyl-neuraminsäure: Fucose-Verhältnis beträgt 0.44–0.98 gegenüber 0.18–0.27 bei den kohlenhydrat-armen IgGs.

Aufgrund dieses höheren Gehaltes an Acetyl-neuraminsäure wandern die kohlenhydrat-reichen IgG-Moleküle in der Elektrophorese schneller. Solche schneller beweglichen

Tabelle 5. Kohlenhydrat-Zusammensetzung der Glykopeptide der IgM-Globuline Dau, Ou und Di; Angaben in Reste pro Molekül (nach [71]).

Dau	H-Kette [a]	C1	C2	C3	C4	C5	Summe
Fucose	2	1	1				2
Mannose	17	3	6–7	2	3	3–4	17–19
Galaktose	5	1	2	1			4
Glucosamin	10	2	3	2	1–2	2	10–11
Acetylneuraminsäure [b]	4						
Ou und Di	H-Kette [a]	C1	C2	C3	C4	C5	Summe
Fucose	2.5	1	1	1			3
Mannose	15–17	2–3	2–3	3	5	8–11	20–25
Galaktose	5–5.5	2	2	2			6
Glucosamin	12–13	3	3–5	4–5	2	2–3	14–18
Acetylneuraminsäure	4						

[a] H-Kette = schwere Kette des Immunglobulins.

[b] Aus Mangel an Substanz nicht bestimmt.

in ca. 15% der Moleküle nachweisbar. C2 liegt unsymmetrisch auf nur einer H-Kette unmittelbar neben der Disulfidbrücke in etwa 80% der Moleküle. C3 ist wiederum auf beiden H-Ketten im Fc-Bereich (in Position 67 vom Carboxy-Ende her gesehen) gebunden und scheint in allen IgG-Molekülen vorzukommen.

IgG-Globuline konnten wir früher aus hochgereinigten Normalserum-Gammaglobulinen durch präparative Zonenelektrophorese isolieren. Sie enthielten 0.47% Acetyl-neuraminsäure, während die langsamste IgG-Fraktion nur 0.18% Acetyl-neuraminsäure aufwies^[76].

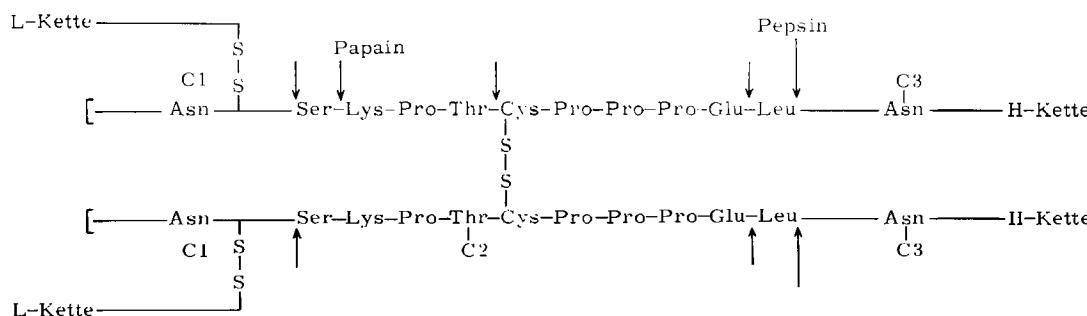


Abb. 3. Peptidketten-Struktur des Kaninchen-IgG mit den Kohlenhydrat-Einheiten C1, C2 und C3 (nach [55]).

Abel et al.^[74] schätzen, daß im IgG 91 % der Moleküle kohlenhydrat-arm und 9 % kohlenhydrat-reich sind. Der Kohlenhydrat-Gehalt von 2.9 % ist ein Durchschnittswert. Auch im IgM gibt es Moleküle mit L-Ketten-Kohlenhydraten. Bence-Jones-Globuline können demnach – je nachdem von welchem Paraprotein sie sich ableiten – auch Kohlenhydrate enthalten^[77].

Das saure α_1 -Glykoprotein ist ein Einketten-Protein mit ca. 210 Aminosäuren und fünf Oligosaccharid-Einheiten, die sich sämtlich im N-terminalen Drittel des Moleküls befinden und an Asparagin gebunden sind (Abb. 4)^[78]. Bei einigen weiteren Proteinen (Tabelle 6) ist lediglich die Anzahl der Zucker-Einheiten pro Molekül bekannt.

PCA-Ile-Pro-Leu-Cys-Ala-Asn-Leu-Val-Pro-Val-Pro
 C1
 Ile-Thr-Asn-Ala-Thr-Leu-Asp-Arg-Ile-Thr-Gly-Lys-
 Ala-Tyr-Ile-Ala-Ser-Ala-Phe-Arg-Asn-Glu-Glu-Tyr-
 C2
 Asn-Lys-Ser-Val-Gln-Glu-Ile-Gln-Ala-Thr-Phe-Phe-
 C3
 Tyr-Phe-Thr-Pro-Asn-Lys-Thr-Glu-Asp-Thr-Ile-Phe-
 Leu-Arg-Glu-Tyr-Gln-Thr-Arg-Gln-Asp-Gln-Cys-Ile-
 C4
 Tyr-Asn-Thr-Thr-Tyr-Leu-Asn-Val-Gln-Arg-Glu-Asn-
 Gly-Thr-Ile-Ser-Arg-Tyr-Thr-Ile-Ser-Arg-Tyr-Val-
 Gly-Gly-Gln-Glu-His-Val-Ala-His-Leu-Leu-Ile-Leu-
 Arg-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Met-Leu-Ala-Phe-Asp-...
 C5

Abb. 4. Ausschnitt aus der Peptidkette des sauren α_1 -Glykoproteins mit den fünf Oligosaccharid-Einheiten (nach [78]).

Human-Fibrinogen mit einem Kohlenhydrat-Gehalt von 2.8 % besitzt Zucker-Einheiten in der B β - und γ -Kette. Die A α -Kette ist frei von Kohlenhydrat^[79].

Tabelle 6. Oligosaccharid-Einheiten in Glykoproteinen.

Ketten	Einheiten/ Molekül	Lit.
saures α_1 -Glyko- protein	1	[78]
Coeruloplasmin	1 (dimer)	[38]
α_2 -Makroglobulin	10	[72]
Haptoglobin 2-1	4 β	[80, 81]
Transferrin	1 (dimer)	[42]
Fibrinogen	B β (dimer) γ (dimer)	[79]
IgG	(L, H) ₂	
IgM	(L, H) ₁₀	2 einfach } $\times 10$ 3 komplex

2.5. Einfluß der Kohlenhydrate auf das physikalisch-chemische Verhalten der Glykoproteine

Der hohe Gehalt an Neuraminsäure hat beim sauren α_1 -Glykoprotein Auswirkungen auf das physikalisch-chemische Verhalten^[82]. Vergleichende Untersuchungen mit dem nativen und dem neuraminsäure-freien Glykoprotein hinsichtlich Viskositätsgrenzzahl, Diffusions- und Reibungskoeffizient sowie Verhalten in der Ultrazentrifuge weisen

darauf hin, daß das native Molekül eine etwas ungleichmäßige Form hat. Diese Form könnte dadurch erklärt werden, daß alle Neuraminsäurereste im N-terminalen Drittel der Peptidkette lokalisiert sind und daß daher dieser Teil des Moleküls möglicherweise stärker hydratisiert ist als die übrigen Partien.

Der hohe Kohlenhydrat-Gehalt wirkt sich auch auf die Bestimmung des Molekulargewichtes aus. Bei Anwendung der Gelfiltrationsmethode mit Sephadex G-75 findet man z. B. für das saure α_1 -Glykoprotein ein Molekulargewicht von 60000 (richtiger Wert: ca. 44000)^[83]. Wendet man zur Bestimmung des Molekulargewichtes die Acrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat an, so sind die gefundenen Molekulargewichte abhängig vom Vernetzungsgrad des Gels^[84]. Diese Anomalie wird darauf zurückgeführt, daß das Dodecylsulfat von den Oligosaccharid-Einheiten weniger stark gebunden wird als vom Protein-Anteil.

Die Kohlenhydrat-Gruppen mit ihrer starken Hydratation bedingen eine erhöhte Löslichkeit der Glykoproteine. So gehören die kohlenhydrat-reichsten Serumproteine C1-Inaktivator, saures α_1 -Glykoprotein und Hämopexin zur Seromucoid-Fraktion. Diese Proteine werden durch Perchlorsäure und Trichloressigsäure nicht ausgefällt, zeigen in Lösung eine erhebliche Thermoresistenz und erfordern zur Präzipitation wesentlich größere Mengen an Fällungsmitteln^[85, 86].

Ein besonders interessantes Phänomen bieten die gefrierpunktserniedrigenden Glykoproteine des antarktischen Fisches *Trematomus borchgrevinki*. Sie bewahren das Blut vor dem Gefrieren selbst bei -1.9 °C. Es handelt sich dabei im wesentlichen um drei Glykoproteine mit Molekulargewichten von 10500, 17000 und 21500. Sie sind aus Ala-Ala-Thr-Einheiten aufgebaut. Alle Threonine sind O-glykosidisch mit Galaktosyl-N-acetyl-galaktosamin verbunden. Nach Oxidation der Hydroxygruppen des Zuckers zu Carboxygruppen geht die Aktivität verloren. Bei geringen Konzentrationen (<1 %) sind diese Glykoproteine ebenso effektiv wie Natriumchlorid. Sie bewirken somit eine Gefrierpunktserniedrigung, die etwa 100- bis 1000-mal größer ist als ihr Molekulargewicht erwarten läßt^[87, 88].

Beim Coeruloplasmin beeinflussen chemische Änderungen die Kristallform. Das native Protein bildet tetragonale, das neuraminsäure-freie dagegen hexagonale Prismen^[89].

3. Bedeutung des Kohlenhydrat-Anteils

Die Glykoproteine üben wichtige biologische Funktionen aus. Sie sind wirksam als Transportproteine, Inhibitoren, Enzyme, Hormone, Gerinnungsfaktoren, Komplementsaktoren und Antikörper. Es erhebt sich die Frage, ob der Kohlenhydrat-Anteil irgend etwas mit ihrer Funktion zu tun hat. Die Antwort ist nicht ganz einfach – wir wissen noch zu wenig. Lediglich über die Bedeutung der Neuraminsäure liegen einige Erfahrungen vor. Dieser endständige Zucker läßt sich relativ leicht durch Neuramidase abspalten^[90]. Ein hochgereinigtes Enzym aus *Vibrio cholera*, frei von Proteasen, steht für derartige Untersuchungen zur Verfügung.

3.1. Rolle der Neuraminsäure

In Tabelle 7 ist der Einfluß der Neuraminidase-Behandlung auf die biologische Aktivität wichtiger Glykoproteine zusammengestellt. Einige von ihnen, darunter die Hormone, werden inaktiviert. Die Proteinases- und Komplement-Inhibitoren werden nicht beeinflußt. Auch die Antikörper erleiden keinen Aktivitätsverlust. Die Transportproteine können weiterhin ihre Liganden binden und transportieren. So kann z. B. neuraminsäure-freies Transferrin den Reticulocyten nach wie vor Eisen zur Verfügung stellen^[91, 92]. Auch die Bindung von Cortison an Transcortin^[93] oder von Progesteron an das saure α_1 -Glykoprotein^[94] ist weiterhin möglich.

Tabelle 7. Einfluß der Neuraminidase-Behandlung auf die biologische Aktivität einiger Glykoproteine.

Inaktivierung	kein Aktivitätsverlust	
Choriongonadotropin (HCG)	Cholinesterase	α_1 -Antitrypsin
follikel-stimulierendes Hormon (FSH)	Thrombin	Antithrombin III
Erythropoetin	Hageman-Faktor	Inter- α -Inhibitor
MN-Substanz	Transcortin	α_2 -Makroglobulin
Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF)	thyroxin-bindendes Globulin	C1-Inaktivator
	Haptoglobin	
	Coeruloplasmin [a]	
	Transferrin	Antikörper
Fibrinogen		
Prothrombin		

[a] Kupfer-Bindung und Oxidase-Aktivität.

Neuraminsäure-freies Coeruloplasmin wird nach Injektion in Kaninchen in wenigen Minuten aus der Zirkulation ausgeschieden und findet sich in den Leberparenchymzellen wieder. Diese Zellen haben offenbar eine besondere

Die Abspaltung der Neuraminsäure aus Fibrinogen führt zu einer veränderten Struktur des Fibringerinnsels^[98, 99], und neuraminsäure-freies Prothrombin wird, wie wir früher fanden, in hochprozentiger Citrat-Lösung schneller in Thrombin umgewandelt^[100].

Ein Phänomen, das ebenfalls eng mit dem Neuraminsäure-Gehalt zusammenhängt, ist die Hemmung der durch Influenza-Virus verursachten Hämaggglutination. In Tabelle 8 sind eine Reihe von Serum-Glykoproteinen nach ihrer Inhibitor-Aktivität gegenüber dem Stamm B/Maryland angeordnet^[101]. Die Inhibitor-Eigenschaft geht nicht mit dem Neuraminsäure-Gehalt parallel, denn das saure α_1 -Glykoprotein mit 12% Neuraminsäure ist nur ein schwacher Inhibitor im Vergleich zum Uromucoid von *Tamm* und *Horsfall* mit nur 7% Neuraminsäure. Nach Polymerisation des sauren α_1 -Glykoproteins steigt die Inhibitor-Wirkung an. Ein genügend großes Molekulargewicht ist also wesentlich. Die Tatsache, daß die Glykoproteine gegen andere Virusstämme unterschiedliche Hemmwirkungen zeigen, weist darauf hin, daß eine besondere sterische Anordnung der Rezeptoren nötig ist. Die terminalen Neuraminsäurereste der Glykoproteine besetzen dabei die Neuraminidase-Rezeptoren der Viruspartikeln, so daß diese nicht mehr mit den Erythrocyten reagieren können^[1, 101].

3.2. Beteiligung weiterer Zuckerbausteine

Bei zwei weiteren Proteinen haben wir Hinweise, daß die Kohlenhydrate direkt für die Aktivität verantwortlich sind: Die Komplement-Komponente C9, die für die letzte Phase der Komplement-Reaktion zuständig ist, bildet mit Eisen ein Chelat^[102]. Sie kann in ihrer biologischen Aktivität durch *o*-Phenanthrolin ersetzt werden. Die Eisenbindung erfolgt in diesem Falle durch die Kohlenhydrate, denn nach Oxidation mit Kaliummetaperjodat wird C9 inaktiviert.

Tabelle 8. Serum-Glykoproteine als Inhibitoren der Influenza-Virus-Hämaggglutination (Stamm B/Md) (nach [101]).

	Inhibitor-Aktivität	Mol.-Gew.	Neuraminsäure [%]	Neuraminsäure [mol/mol]
Blutgruppensubstanz MM	100	12000000	11.5	4466
Uromucoid [a]	400	7000000	7.0	1586
IgM-Globulin	25	900000	1.8	405
Haptoglobin 1-1	25	85000	5.2	14
Fetuin (Rind)	12.5	45000	4.5	9
Hämopexin	10	80000	5.0	13
α_1 -X-Glykoprotein	6.25	60000	7.0	14
α_2 -Makroglobulin	5	820000	1.8	48
β_2 -Glykoprotein I	1.67	40000	4.5	6
saures α_1 -Glykoprotein	0.80	44000	12.1	17
Coeruloplasmin	0.80	160000	2.4	12
Zn- α_2 -Glykoprotein	0.80	41000	4.7	6
IgA-Globulin	0.80	160000	1.3	11
α_1 -Antitrypsin	0.53	54000	3.6	6
α_1 -T-Glykoprotein	0.40	60000	7.0	7

[a] Von *Tamm* und *Horsfall*.

Affinität für Galaktosereste. Entfernt man die nun endständige Galaktose mit β -Galaktosidase, so findet man wieder Halbwertszeiten, die denen des nativen Coeruloplasmins gleichkommen^[95 - 97].

viert. Daß kohlenhydrat-reiche Glykoproteine Eisen binden können, wird besonders eindrucksvoll am Beispiel des Gastroferrins^[103] demonstriert. Dieses eisenbindende Glykoprotein des Magenschleims mit einem Molekulargewicht von 12 Millionen hat eine sehr hohe Affinität für Eisen. Es bindet Eisen mit einer Konkurrenzaffinität, die 1000-mal höher ist als diejenige des transferrin.

gewicht von ca. 260000 besteht zu etwa 85% aus Kohlenhydraten. Es ist imstande, 6% seines Gewichtes an Eisen zu binden. Die Neuraminsäure spielt dabei keine Rolle. Als zweites Beispiel ist der relativ obskure „Colony stimulating factor“ für Granulocyten und Makrophagen zu nennen, der ebenfalls durch Oxidation der Kohlenhydrate inaktiviert wird^[104].

3.3. Kohlenhydrate als Hemmstoffe für biologische Reaktionen

Die Kohlenhydrate kaschieren erhebliche Teile der Oberfläche der Glykoproteine und können so proteolytische Enzyme in ihrer Wirkung behindern. Trypsin und Papain können z. B. das native saure α_1 -Glykoprotein nur schlecht spalten^[105]. Von Coeruloplasmin ist ebenfalls eine gewisse Papain-Resistenz bekannt^[106]. Schneller wandernde IgG-Globuline, die einen höheren Kohlenhydrat-Gehalt aufweisen, sind in gleicher Weise charakterisiert durch eine relative Stabilität gegenüber Hydrolyse^[107]. Das exokrine IgA, das u. a. im Darmschleim seine schützende Funktion als Coproantikörper ausübt, soll aufgrund seines Kohlenhydrat-Gehaltes von 12% eine recht hohe Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle und Verdauungsenzyme besitzen^[108, 109]. Das IgD mit einem etwa gleich hohen Kohlenhydrat-Gehalt wird dagegen außerordentlich leicht von proteolytischen Enzymen angegriffen. Seine Kohlenhydrate sollen sich im Fd- und im Fc-Teil befinden^[110]. Sie müssen so weit voneinander entfernt sein, daß die Hinge-Region für Spaltungen leicht zugänglich ist.

Das saure α_1 -Glykoprotein kann Vitamin B₁₂ binden, besitzt jedoch im nativen Zustand nur eine relativ geringe Bindungskapazität. Entfernt man die Neuraminsäure, so steigt die B₁₂-Bindung auf das Vierfache an^[111]. Durch Entfernung der Neuraminsäure soll auch die Immunogenität des sauren α_1 -Glykoproteins zunehmen. Diese Maßnahme wird zur Herstellung von Antiseren gegen dieses Protein empfohlen^[112].

Neuerdings ist die Neuraminsäure-Abspaltung in der Tumor-Immunologie interessant geworden. Hierzu werden z. B. Tumorzellen mit Neuraminidase behandelt und dem Patienten wieder mit oder ohne BCG injiziert^[113, 114]. Die Immunzellen sollen nun die freigelegten Tumor-Antigene erkennen und den Tumor mit Hilfe von Antikörpern, Komplement und der zellulären Immunität zerstören.

Die Tatsache, daß Kohlenhydrate und insbesondere die Neuraminsäure die Ausbildung einer humoralen oder zellulären Immunität behindern, ist auch für die Transplantations-Immunologie interessant. Neben den immunsuppressiven Drogen sind auch Serumproteine imstande, eine Sensibilisierung zu unterdrücken^[115]. Am bekanntesten und am meisten diskutiert ist das α -Globulin von Mowbray^[116]. Dieses Protein konnte die Antikörperförmung und die Abstoßung von Transplantaten inhibieren. Die Versuche waren schwierig zu reproduzieren, und schließlich wurde behauptet, daß die immunsuppressive Wirkung auf Ribonuclease-Aktivität beruhte. Kürzlich gelang es Schmid et al.^[117], aus der Fraktion IV von Cohn ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 4000–6000 zu isolieren, das

praktisch frei von Kohlenhydrat ist. Es kann die durch Phytagglutinin induzierte Proliferation von Lymphocyten verhindern und bei gegen Hammel-Erythrocyten immunisierten Mäusen die Bildung von plaque-bildenden Zellen inhibieren.

Diese Substanzen scheinen nicht identisch zu sein mit den Chalonen. Das sind Stoffe, die die Zellproliferation in bestimmten Geweben hemmen, also Mitose-Inhibitoren. Sie werden von den Zellen dieser Gewebe gebildet, z. B. von Lymphocyten, Granulocyten oder Fibroblasten, und sind ebenfalls für die Transplantations- und Tumor-Immunologie wichtig^[118–120]. Sie lassen sich aus diploiden Human-Fibroblasten, Rindermilz oder Kalbsthymus isolieren. Die Molekulargewichte liegen zwischen 30000 und 50000. Das Chalon aus Kalbsthymus ist ein saures α -Glykoprotein, und es erhebt sich die Frage, ob es etwas mit dem sauren α_1 -Glykoprotein zu tun hat.

3.4. Biologische Eigenschaften, bei denen Kohlenhydrate keine Rolle spielen

Auf dem Fc-Teil der Immunglobuline gibt es Bezirke, die für Placenta-Permeabilität, Komplement-Bindung, Phagocytose und Artspezifität wichtig sind. Besonders für die erstgenannte Eigenschaft hatte man Kohlenhydrate verantwortlich gemacht^[121]. Aber wie durch Vergleich von nativem und mit spezifischen Glykosidasen behandeltem Mäuse-Immunglobulin gezeigt werden konnte, sind die Zucker für die Placenta-Permeabilität nicht erforderlich^[122].

Auch für die Komplement-Bindung der IgG-Globuline scheinen die Zucker keine Bedeutung zu haben^[123]. Isolierte IgG-Glykopeptide beeinflußen die Komplement-Bindung nicht, und bei zwölf IgG-Myelomglobulinen mit unterschiedlichen Kohlenhydrat-Gehalten zeigte die Komplement-Bindung keine Abhängigkeit vom Zuckergehalt^[124]. Bei Phagocytose-Versuchen mit zahlreichen Plasmaproteinen konnten wir keine Hinweise für eine Beeinflussung durch die Zucker feststellen^[125]. Das IgM mit rund 10% Kohlenhydraten stimuliert die Phagocytose gut, aber das kohlenhydrat-freie C-reaktive Protein bewirkt praktisch die gleiche Förderung der Phagocytose.

An der Artspezifität der Immunglobuline scheinen die Kohlenhydrate ebenfalls nicht beteiligt zu sein. Sie sind nicht immunogen^[126]. Als Grund hierfür kann man anführen, daß es nur einige wenige Grundtypen dieser Glykoprotein-Oligosaccharid-Einheiten gibt (Abb. 1) und daß diese in der Evolution praktisch gleich geblieben sind. Sie sind weit verbreitet und werden daher als Self toleriert.

Angesichts eines so reichen Tatsachenmaterials fragt man sich nach der eigentlichen Bedeutung der Kohlenhydrate. Liegt all diesen Erscheinungen ein gemeinsames Prinzip zugrunde oder sind die Zucker nur zufällig da, ein Relikt aus grauer Vorzeit, der Evolution?

3.5. Evolution der Glykoproteine

Analysen der Aminosäure-Sequenz einiger Proteine haben die Vorstellungen von Darwin bestätigt. Die großen

Tabelle 9. Kohlenhydrat-Zusammensetzung von Immunglobulinen verschiedener Spezies. AV = Antigenverwandtschaft zwischen HMW und LMW.

Klasse	Spezies [a]	Hexose [%]	Hexosamin [%]	Fucose [%]	Acetyl- neuraminsäure [%]	Gesamt- Kohlenhydrat [%]	AV
Knorpelfische	Dornhai <i>Heterodontus francisci</i>						
	HMW 70000	4.1	3.4	0.45	1.4	9.3	+
Knochenfische	LMW 70000	5.5	4.4	0.5	1.5	11.9	
	Afrikanischer Lungenfisch <i>Protopterus aethiopicus</i>						
Reptilien	LMW 38000	2.4	2.1	0.45	0.03	5.0	-
	Löffelstör <i>Polyodon spatula</i>						
Vögel	HMW 70000	5.9	3.3	1.1	0.5	9.0	+
	LMW 70000	4.1	2.9	1.0	0.1	8.1	
Säugetiere	Schlammfisch <i>Amia calva</i>						
	HMW 70000	5.9	3.3	0.7	0.8	10.7	+
Säugetiere	LMW 52000	4.8	2.6	0.6	1.1	9.1	
	Schildkröte <i>Chelydra serpentina</i>						
Säugetiere	LMW 38000	0.2	0.05	0.4	0.2	0.8	-
	Huhn <i>Gallus domesticus</i>						
Säugetiere	HMW 70000	3.2	2.9	0.5	0.6	7.2	-
	LMW 66000	2.0	1.25	0.45	0.4	4.1	
Säugetiere	Mensch <i>Homo sapiens</i>						
	HMW (IgM) 70000	5.6	4.2	1.0	1.3	12.1	-
	LMW (IgG) 50000	1.0	0.9	0.3	0.2	2.4	

[a] Die Abkürzungen HMW (High molecular weight) und LMW (Low molecular weight) bedeuten Molekulargewichte von 900000 bzw. 150000 für die nativen Antikörper.

Etappen der Evolution lassen sich an den Veränderungen der Sequenz des Cytochroms C überschauen^[127]. Dieses Protein, das bei der biologischen Oxidation in den Zellen eine Rolle spielt, hat sich in der Evolution am wenigsten verändert. Die Feinheiten unseres Stammbaumes, besonders der letzten Phasen, lassen sich am Hämoglobin ablesen^[128]. Diese beiden Proteine enthalten jedoch kein Kohlenhydrat.

Von den Serum-Glykoproteinen sind die Immunglobuline wegen ihrer Bedeutung in Prophylaxe und Therapie am besten untersucht^[129, 130]. Sie bestehen nach den Untersuchungen von Porter und Edelman, die dafür 1972 den Nobelpreis erhielten^[131], aus zwei leichten (L) und zwei schweren (H) Peptidketten. Die L- und H-Ketten sollen sich von einem Ur-Gen, das nur die halbe L-Kette codiert, ableiten. Durch Gen-Duplikation und Hypermutation haben sich daraus die heutigen Immunglobulin-Gene entwickelt^[132–135]. Von den H-Ketten sollen die Ketten des IgM, die μ -Ketten, die evolutionsgeschichtlich ältesten sein.

Außer der Aminosäure-Sequenz gibt auch die Kohlenhydrat-Zusammensetzung wichtige Hinweise über die Evolution der Immunglobuline^[136, 137]. So sind die Kohlenhydrat-Gehalte der hochmolekularen Antikörper (IgM), deren H-Kette ein Molekulargewicht von ca. 70000 hat, praktisch gleich geblieben (Tabelle 9). Sie stimmen auch mit den in einigen Spezies vorkommenden 7S-IgM-Antikörpern, mit denen sie eine komplett Antigengemeinschaft zeigen, überein. Aus der Reihe fällt lediglich das IgM-Globulin des Huhnes, das einen geringeren Kohlenhydrat-Gehalt hat.

Die H-Ketten des IgG-Globulins, die γ -Ketten, mit Molekulargewichten von ca. 50000, haben antigenmäßig nichts mit der μ -Kette zu tun. Sie haben, wie schon in Tabelle 2 gezeigt, beim Menschen einen Gesamtkohlenhydrat-

Gehalt, der noch unter 3% liegt. Die γ -Ketten bestehen normalerweise aus einem variablen Teil (V) und drei konstanten Teilen (C₁, C₂ und C₃), deren Bereich ca. 110 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 12500 umfaßt^[138]. Fehlt einer dieser konstanten Bereiche, wie z. B. bei der H-Kette der Schildkröte oder des Afrikanischen Lungenfisches, so beträgt das Molekulargewicht dieser verkürzten H-Ketten nur ca. 38000.

Im Rinder-IgG ist die komplexe Oligosaccharid-Einheit C₃ im Bereich C₃ der H-Kette lokalisiert. Wenn ein solcher kohlenhydrat-haltiger Kettenabschnitt fehlt, so ist wie bei der Schildkröte der Kohlenhydrat-Gehalt der H-Kette sehr gering. Fehlt dagegen infolge abweichender Gen-Duplikation ein kohlenhydrat-armer Kettenabschnitt, wie es z. B. beim Afrikanischen Lungenfisch sein könnte, so kann der Kohlenhydrat-Gehalt der H-Ketten höher liegen als bei den H-Ketten mit drei konstanten Bereichen.

Beim Huhn beträgt das Molekulargewicht der H-Kette der LMW-Antikörper 66000. Es erhebt sich die Frage, ob ein zusätzlicher konstanter, kohlenhydrat-haltiger Kettenabschnitt den im Vergleich zum IgG des Menschen erhöhten Kohlenhydrat-Anteil verursacht hat. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen diesen abweichenden Struktur und den Konformationsänderungen der Hühner-Antikörper in Salzlösungen verschiedener Konzentration, die verantwortlich sein sollen für das besondere Präzipitationsverhalten der Hühner-Antikörper im Agar-gel^[139]. Hühner-Antikörper benötigen bekanntlich für die Bildung von Immunpräzipitaten einen NaCl-Gehalt von 8%.

In den Immunglobulinen der Vertebraten wurden bei allen untersuchten Species Mannose, Galaktose, Glucosamin und Acetyl-neuraminsäure nachgewiesen. Das Mannose:Galaktose-Verhältnis war bei Säugetieren und Vögeln

größer als 1, bei Tieren, die unterhalb der Vögel stehen, lag es in der Größenordnung um 1. Die Fucose fehlte bei zwei der untersuchten Spezies^[140]. Die Kohlenhydratzusammensetzung der Transferrine differiert je nach Spezies ebenfalls erheblich^[141, 142]. Die Unterschiede werden damit erklärt, daß die Proteine eine unterschiedliche Anzahl von Heteropolysaccharid-Einheiten enthalten sollen: Affen-(Cynomolgen-), Hühner- und Rinder-Transferrin eine, Human-, Pferde- und Kaninchen- zwei und Schweine-Transferrin vier.

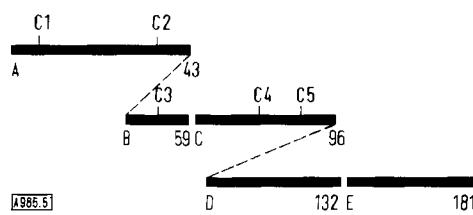


Abb. 5. Struktur des sauren α_1 -Glykoproteins (vgl. Abb. 4). Zur Veranschaulichung der homologen Bezirke wurde die Kette in die Bereiche A bis E zerlegt (nach [143]).

Für die Entwicklungsgeschichte der Glykoproteine ist die kürzlich durch Aminosäuresequenz-Analysen festgestellte Verwandtschaft zwischen den Immunglobulinen und dem sauren α_1 -Glykoprotein von besonderem Interesse^[143]. Die Peptidkette des sauren α_1 -Glykoproteins enthält, wie Abbildung 5 zeigt, zwei Partialsequenz-Duplikationen. Bereich B ist homolog mit dem Carboxyende des Abschnitts A. Bereich D ist homolog mit Bereich C. Der aus 43 Aminosäuren bestehende amino-terminalen Abschnitt A ist homolog mit dem amino-terminalen Ende der L-Kette (κ -Typ) des IgG-Globulins. Die 22 Aminosäuren vom Carboxyende des Bereichs D zeigen eine sehr hohe Homologie mit der α -Kette des Haptoglobins^[144]. Sequenz E ist homolog mit einem konstanten Bereich der H-Kette des Kaninchen-IgG^[*].

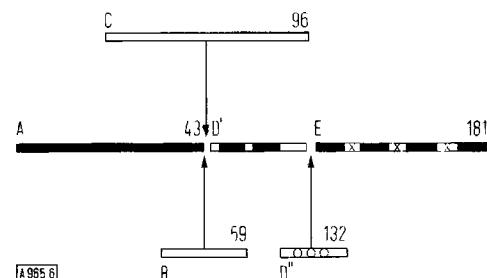


Abb. 6. Schematische Darstellung der „reduzierten“ Aminosäure-Sequenz des sauren α_1 -Glykoproteins. Die Bereiche B und C mit Sequenz-Duplikation und die Haptoglobin-Sequenz D sind ausklammert. Die Peptidkette besteht dann noch aus A, das dem variablen Bereich der L-Kette des IgG entspricht, E, das dem konstanten Bereich der H-Kette des IgG ähnelt und einem Teilbereich von D. Sie umfaßt ca. 110 Aminosäuren und stellt so das hypothetische Ur-Immunglobulin dar (nach [143]).

Läßt man, wie in Abbildung 6 gezeigt, die Abschnitte mit Sequenz-Duplikation und den Haptoglobin-Bereich weg, so erhält man eine „reduzierte“ Peptidkette, die dem hypothetischen Ur-Immunglobulin entspricht. Der Gedanke

[*] Die Angaben in den Abb. 4 sowie 5 und 6 stimmen nicht völlig überein: Bei Abb. 4 ist eine Peptidkette aus ca. 210 Resten, bei Abb. 5 und 6 aus 181 Resten zugrundegelegt. An der Aussage der Abbildungen 5 und 6 ändert sich dadurch im Prinzip jedoch nichts.

liegt nahe, daß das saure α_1 -Glykoprotein daraus entstanden ist.

Angesichts der genetischen Verwandtschaft dieser beiden Proteine fragt man sich, ob das saure α_1 -Glykoprotein heute noch funktionell mit der Immunabwehr zu tun hat, zumal es bei allen entzündlichen Prozessen im Serum stark erhöht ist, und wie die Zucker in die Peptidkette eingebaut werden, d. h. wie die Glykoproteine sich bilden.

3.6. Synthese der Glykoproteine

Die Synthese der Serum-Glykoproteine erfolgt im wesentlichen an zwei Stellen: in der Leber und im Lymphgewebe. Ausnahmen hiervon bilden der fibrin-stabilisierende Faktor, der aus den Thrombocyten kommt, und einige Glykoprotein-Hormone, die der Hypophyse sowie der Placenta entstammen. Die meisten Glykoproteine werden ausschließlich in der Leber synthetisiert^[145–147] (Tabelle 10). Transferrin soll in der Leber und in Lymphocyten gebildet werden. Die Immunglobuline entstammen Plasmazellen, die sich von B-Lymphocyten ableiten. Die für die Bildung des sekretorischen IgA zuständigen Plasmazellen können das Protein in Brustdrüsen, Bronchien, Darmschleim etc. produzieren. Möglicherweise werden in den Lymphocyten weitere Glykoproteine gebildet.

Der Ablauf der Glykoprotein-Synthese könnte auf drei Arten erfolgen^[53, 73]:

1. Protein und Kohlenhydrat-Gruppen könnten getrennt synthetisiert und am Bildungsort der Peptidkette, den Ribosomen, miteinander verknüpft werden.
2. Der Einbau der Kohlenhydrat-Gruppen könnte erfolgen, nachdem die Peptidkette das Ribosom verlassen hat und sich im endoplasmatischen Reticulum befindet.
3. Auch eine Kombination der beiden vorstehenden Möglichkeiten wäre denkbar, bei der ein Teil der Kohlenhy-

Tabelle 10. Syntheseort von Glykoproteinen des Humanplasmas.

Glykoprotein	Syntheseort
α_1 -Fetoprotein	Leber
saures α_1 -Glykoprotein	Leber
vitamin-B ₁₂ -bindendes Protein TC I	Leukocyten
α_1 -Antitrypsin	Leber
Prothrombin	Leber
Gc-Globulin	Leber
Haptoglobin	Leber
Antithrombin III	Leber
Coeruloplasmin	Leber
C1-Inaktivator	Leber
Cholinesterase	Leber
α_2 -Makroglobulin	Leber
Transferrin	Leber, Lymphgewebe; Milz, Brustdrüse, Lymphocyten, Makrophagen
C4	Leber
Hämopexin	Leber
β_2 -Glykoprotein I	Leber
Fibrinogen	Leber
Faktor XIII	Leber?
fibrin-stabilisierender Faktor	Thrombocyten
Immunglobuline	Lymphgewebe: Lymphknoten, Milz, Brustdrüse, Plasmazellen

drate in der Ribosomen-Phase eingebaut und der Rest später angehängt wird.

Der sukzessive Einbau nach Fall drei scheint für die Synthese der Serum-Glykoproteine in Leber und Lymphocyten zuzutreffen. Mit radioaktiv markiertem Leucin und ^{14}C -Monosacchariden konnte gezeigt werden, daß die L-Kette eines IgG-Myelomglobulins von der Maus in ca. 30–40 Sekunden synthetisiert wird^[148–150]. Der gesamte Peptidanteil des IgG-Moleküls entsteht in etwa 90 Sekunden. Die in der Ribosomen-Fraktion gefundenen Antikörper sind praktisch kohlenhydrat-frei, lediglich Glucosamin ist schon nachweisbar. Die Antikörper wandern nun zur Peripherie der Zelle. Auf dem Wege dorthin durch die Kanäle des endoplasmatischen Reticulums werden durch mehrere Glykosyl-Transferasen, die entlang der Membranen des rauhen und glatten endoplasmatischen Reticulums und im Golgi-Apparat lokalisiert sind, schrittweise weitere Monosaccharide angehängt. Zuletzt werden die endständigen Fucose- und Acetylneuraminsäurereste eingebaut. Insgesamt dauert es ca. 20–30 Minuten, bis komplett Antikörper-Moleküle außerhalb der Zelle erscheinen.

Inhibiert man den Einbau der Monosaccharide^[151] durch Zugabe von 2-Desoxy-D-glucose^[152], so unterbleibt die Wanderung der neugebildeten Antikörper-Moleküle zur Peripherie hin. Sie bleiben in den ribosomen-haltigen Membranen und können nicht in das rauhe endoplasmatische Reticulum oder von dort zu den glatten Membranen gelangen. Für das Ausschleusen der Glykoproteine aus dem glatten endoplasmatischen Reticulum oder dem Golgi-Apparat aus der Zelle sollen die Zucker nicht wichtig sein.

Der Aufbau der Oligosaccharid-Einheiten ist nicht durch einen Ribonucleinsäure-Code gesteuert wie im Falle der Peptidkette. Er hängt vielmehr vom Vorhandensein der betreffenden Glykosyl-Transferasen im Gewebe, in dem die Synthese stattfindet, ab. Das Vorkommen oder Fehlen dieser Enzyme ist natürlich genetisch determiniert. Bei der Synthese des Ovotransferrins (Conalbumin), das hinsichtlich seiner Aminosäure-Struktur und immunologisch mit dem Serum-Transferrin des Huhnes identisch ist, aber eine andere Kohlenhydrat-Zusammensetzung aufweist – es enthält nur Glucosamin und Mannose – waren offenbar die für den Einbau weiterer Zuckerreste erforderlichen Enzyme nicht zugegen^[153]. Da der Einbau in die Peptidkette nicht durch RNA codiert ist, aber doch genetisch gesteuert sein muß, so nahm man an, daß das Signal für das Eingreifen der Glykosyl-Transferasen in der Aminosäure-Sequenz verankert ist. Immer dann, wenn die Aminosäure-Folge Asn—X—Thr oder Asn—X—Ser – wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann – auftritt, soll Hexosamin an Asparagin angehängt werden^[2, 3, 154]. Die Aminosäure X soll den Typ der Oligosaccharid-Einheit bestimmen.

Man kann gegen diese Hypothese einwenden, daß die Ribonucleasen A und B die gleiche Aminosäure-Sequenz haben, die eine enthält Zucker, die andere nicht. Aber wie schon im Falle der Hühner-Transferrine gesagt, spielen auch Vorkommen und Natur der Glykosyl-Transferasen eine Rolle, und es dürfen keine Inhibitoren für den Einbau der Zucker zugegen sein.

Damit wird das Vorkommen der Zucker in den Glykoproteinen verständlich, aber die Frage nach dem eigentlichen Sinn ist immer noch nicht geklärt.

3.7. Funktion der Kohlenhydrate in Glykoproteinen

Nach der Hypothese von *Eylar*^[155] soll die Bedeutung der Zucker darin liegen, daß sie den in den Zellen gebildeten Proteinen den Austritt durch die Zellmembran in den extrazellulären Raum ermöglichen. Sie wären somit eine Art chemischer Paß. Die Befunde von *Melchers* und *Knopf*^[148, 150] (s. Abschnitt 3.6) schienen *Eylars* Auffassung zu bestätigen. Es gibt jedoch auch Argumente dagegen. So wird z. B. das Serumalbumin, das die überwiegende Menge der Plasmaproteine ausmacht, in Zellen synthetisiert und kann deren Membran passieren, obwohl es keine Kohlenhydrate enthält. Der Hypophysenvorderlappen scheidet Hormone aus; drei davon – LH, FSH und TSH – sind Glykoproteine, die anderen drei – Wachstumshormon, ACTH und Prolactin – nicht. Auch die neueren Arbeiten von *Esterly*^[151] und *Melchers*^[152] lassen die Hypothese zweifelhaft erscheinen. Die Vielzahl der geschilderten Phänomene steht eher im Einklang mit der Auffassung von *Winterburn* und *Phelps*^[156, 157]. Hiernach sollen die Zucker Rezeptoren in einem Erkennungsprozeß sein. Beispiele für positive Erkennung wären

1. Hormone, die über Neuraminsäurereste ihre Zielzelle finden – wie Choriongonadotropin und FSH – und die inaktiviert werden, wenn man die Neuraminsäure entfernt.
2. der rasche Katabolismus von neuraminsäure-freiem Coeruloplasmin. Solange die Neuraminsäure endständig war, erkannten die Leberparenchymzellen das Protein nicht. Die nach Abspaltung der Neuraminsäure freigelegten Galaktosereste wurden dagegen sofort erkannt – vielleicht von Sialyl-Transferasen der Zellmembran – und das Asialo-Coeruloplasmin verschwand in kürzester Zeit aus der Blutbahn.

3. die Hämagglutination durch Influenza-Viren.

Negative Erkennung wäre z. B. das Maskieren von Antigen-determinanten oder das Kaschieren größerer Bezirke der Moleküloberfläche. Das sind die in Abschnitt 3.3 erwähnten Phänomene, die heute in der Tumor- und Transplantations-Immunologie wichtig sind. Bei der Aktualität dieser modernen Forschungsrichtungen der Medizin lohnt es sich, der Bedeutung der Glykoproteine nachzugehen.

Eingegangen am 22. Juni 1973 [A 965]

- [1] A. Gottschalk: Glycoproteins. Their Composition, Structure and Function. 2. Aufl. B. B. A. Library, Bd. 5. Elsevier, Amsterdam 1972.
[2] R. G. Spiro, Annu. Rev. Biochem. 39, 599 (1970).
[3] R. G. Spiro, New. Engl. J. Med. 281, 991, 1043 (1969).
[4] G. A. Jamieson u. T. J. Greenwalt: Glycoproteins of Blood Cells and Plasma. Lippincott, Philadelphia 1971.
[5] H. E. Schultz, Deut. Med. Wochenschr. 83, 1742 (1958).
[6] H. E. Schultz, Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 17, 77 (1961).
[7] H. E. Schultz u. J. F. Heremans: Molecular Biology of Human Proteins. Bd. 1. Elsevier, Amsterdam 1966.
[8] H. Haupt u. K. Heide, Blut 24, 94 (1972).
[9] H. E. Schultz, R. Schmidtberger u. H. Haupt, Biochem. Z. 329, 490 (1958).
[10] E. F. Neufeld u. V. Ginsburg in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1966, Bd. 8, S. 95.
[11] D. Grässlin u. H. Weicker, Clin. Chim. Acta 21, 15 (1968).
[12] R. L. Katzman, A. K. Bhattacharyya u. R. W. Jeanloz, Biochim. Biophys. Acta 184, 523 (1969).
[13] W. Niedermeier, Anal. Biochem. 40, 465 (1971).

- [14] K. B. M. Reid, D. M. Lowe u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 130, 749 (1972).
- [15] L. Warren, *J. Biol. Chem.* 234, 1971 (1959).
- [16] G. D. Dimitrov, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 121 (1973).
- [17] N. Heimburger, H. Haupt u. H. G. Schwick: Proteinase Inhibitors of Human Plasma. Proc. Internat. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, München 1970. De Gruyter, Berlin 1971.
- [18] W. Kisiel u. D. J. Hanahan, *Biochim. Biophys. Acta* 304, 103 (1973).
- [19] S. L. Schneider u. W. R. Slaunwhite, *Biochemistry* 10, 2086 (1971).
- [20] H. Haupt, N. Heimburger, Th. Kranz u. S. Baudner, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1841 (1972).
- [21] K. Sletten, I. Aakesson u. J. O. Alvsaker, *Nature New Biol.* 231, 118 (1971).
- [22] N. Heimburger, H. Haupt, Th. Kranz u. S. Baudner, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1133 (1972).
- [23] H. Haupt, K. Heide, O. Zwisler u. H. G. Schwick, *Blut* 14, 65 (1966).
- [24] K. C. Robbins, L. Summaria, D. Elwyn u. G. H. Barlow, *J. Biol. Chem.* 240, 541 (1965).
- [25] T. Iwasaki u. K. Schmid, *J. Biol. Chem.* 245, 1814 (1970).
- [26] H. Haupt, S. Baudner, Th. Kranz u. N. Heimburger, *Eur. J. Biochem.* 23, 242 (1971).
- [27] H. J. Müller-Eberhard, U. Nilsson u. T. Aronsson, *J. Exp. Med.* 111, 201 (1960).
- [28] H. Haupt, K. Heide u. H. G. Schwick, *Klin. Wochenschr.* 48, 550 (1970).
- [29] H. Bohn, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 23, 455 (1970).
- [30] H. Haupt u. K. Heide, *Clin. Chim. Acta* 12, 419 (1965).
- [31] H. G. Schwick, H. Haupt u. K. Heide, *Klin. Wochenschr.* 46, 981 (1968).
- [32] N. Heimburger, K. Heide, H. Haupt u. H. E. Schultzze, *Clin. Chim. Acta* 10, 293 (1964).
- [33] H. L. Spiegelberg, J. W. Prahl u. H. M. Grey, *Biochemistry* 9, 2115 (1970).
- [34] H. Bennich u. S. G. O. Johansson, *Advan. Immunol.* 13, 1 (1971).
- [35] H. Hirai, S. Nishi u. H. Watabe, 20. Colloq. Brügge 1972.
- [36] E. Alpert, P. Schür, J. Drysdale u. K. Isselbacher, *Fed. Proc.* 30, 301 (1971).
- [37] K. Sterling et al., *J. Clin. Invest.* 50, 1758 (1971).
- [38] G. A. Jamieson, *J. Biol. Chem.* 240, 2019 (1965).
- [39] C. M. Gerbeck, A. Bezkorovainy u. M. E. Rafelson, *Biochemistry* 6, 403 (1967).
- [40] J. T. Dunn u. R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* 242, 5549 (1967).
- [41] Z. Hrkal u. U. Müller-Eberhard, *Biochemistry* 10, 1746 (1971).
- [42] G. A. Jamieson, *J. Biol. Chem.* 240, 2916 (1965).
- [43] K. Yonemasu, R. M. Stoud, W. Niedermeier u. W. T. Butler, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 43, 1388 (1971).
- [44] K. B. M. Reid, D. M. Lowe u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 130, 749 (1972).
- [45] W. Niedermeier, M. Tomana u. J. Mestecky, *Biochim. Biophys. Acta* 257, 527 (1972).
- [46] K. Kobayashi, *Immunochemistry* 8, 785 (1971).
- [47] H. J. Müller-Eberhard, *Annu. Rev. Biochem.* 38, 389 (1969).
- [48] U. Hadding u. H. J. Müller-Eberhard, *Immunology* 16, 719 (1969).
- [49] K. Heide, R. Schmidberger u. H. G. Schwick, *Behringwerk-Mitt.* 33, 96 (1957).
- [50] A. Scanu u. J. L. Granda, *Biochemistry* 5, 446 (1966).
- [51] D. S. Fredrickson, *J. Clin. Invest.* 51, 1486 (1972); Internat. Sympos. Lipid Metabolism, Wiesbaden/Oberursel 1972.
- [52] P. A. Peterson, *J. Biol. Chem.* 246, 34 (1971).
- [53] J. L. Simkin, *Exp. Ann. Biochim. Méd.* 31, 19 (1970).
- [54] G. Dawson u. J. R. Clamp, *Biochem. J.* 107, 341 (1968).
- [55] M. W. Fanger u. D. G. Smyth, *Biochem. J.* 127, 757 (1972).
- [56] M. M. Hurst, W. Niedermeier, J. Zikan u. J. C. Bennett, *J. Immunol.* 110, 840 (1973).
- [57] F. Miller, *Immunochemistry* 9, 217 (1972).
- [58] S. Hickman, R. Kornfeld, C. K. Osterland u. St. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* 247, 2156 (1972).
- [59] G. A. Jamieson, M. Jett u. S. L. De Bernardo, *J. Biol. Chem.* 246, 3686 (1971).
- [60] M. Isemura u. K. Schmid, *Biochem. J.* 124, 591 (1971).
- [61] G. A. Jamieson, *J. Biol. Chem.* 246, 3686 (1971).
- [62] R. Kornfeld, J. Keller, J. Baenzinger u. St. Kornfeld, *J. Clin. Invest.* 50, 56a (1971).
- [63] P. V. Wagh, I. Bornstein u. R. J. Winzler, *J. Biol. Chem.* 244, 658 (1969).
- [64] D. Pette u. I. Stupp, *Klin. Wochenschr.* 38, 109 (1960).
- [65] K. Schmid, *Nature* 204, 75 (1964).
- [66] C. A. Abel u. T. A. Good, *Clin. Chim. Acta* 14, 802 (1966).
- [67] C. M. Gerbeck, T. Yoshikawa u. R. Montgomery, *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 67 (1969).
- [68] P. J. Gaffney, *Nature New Biol.* 230, 54 (1971).
- [69] C. M. Jackson, *Fed. Proc.* 31, 170 (1972).
- [70] A. Shimizu, F. W. Putnam, C. Paul, J. R. Champ u. I. Johnson, *Nature New Biol.* 231, 73 (1971).
- [71] M. M. Hurst, W. Niedermeier, J. Zikan u. J. C. Bennett, *J. Immunol.* 110, 840 (1973).
- [72] J. T. Dunn u. R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* 242, 5556 (1967).
- [73] D. L. Gustine u. E. F. Zimmerman, *Biochem. J.* 132, 541 (1973).
- [74] C. A. Abel, H. L. Spiegelberg u. H. M. Grey, *Biochemistry* 7, 1271 (1968).
- [75] G. M. Edelman, B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser u. M. J. Waxdal, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 78 (1969).
- [76] K. Heide, H. Haupt u. R. Schmidberger, *Behringwerk-Mitt.* 37, 29 (1959).
- [77] F. A. Garver u. N. Hilschmann, *Eur. J. Biochem.* 26, 10 (1972).
- [78] K. Schmid, *Experientia* 28, 24 (1972).
- [79] P. J. Gaffney, *Biochim. Biophys. Acta* 263, 453 (1972).
- [80] C. M. Gerbeck, A. Bezkorovainy u. M. E. Rafelson, *Biochemistry* 6, 403 (1967).
- [81] D. R. Barnett, T. Lee u. B. H. Bowman, *Biochemistry* 11, 1189 (1972).
- [82] K. Kawahara, T. Ikenaka, R. B. Nimberg u. K. Schmid, *Biochim. Biophys. Acta* 295, 505 (1973).
- [83] P. Andrews, *Protides Biol. Fluids* 14, 573 (1966).
- [84] J. P. Segrest, R. L. Jackson, E. P. Andrews u. V. T. Marchesi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 390 (1971).
- [85] K. Heide u. H. Haupt, *Behringwerk-Mitt.* 43, 161 (1964).
- [86] H. E. Schultzze, K. Heide u. H. Haupt, *Clin. Chim. Acta* 7, 854 (1962).
- [87] J. R. Vandeneheede, A. I. Ahmed u. R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* 247, 7885 (1972).
- [88] R. E. Feeney, A. I. Ahmed u. D. T. Osuga, *Fed. Proc.* 32, 1817 (1973).
- [89] A. G. Morell, I. Sternlieb u. I. H. Scheinberg, *Science* 166, 1293 (1969).
- [90] H. E. Schultzze, *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* 1, 290 (1962).
- [91] E. H. Morgan, G. Marsaglia, E. R. Giblett u. C. A. Findu, *J. Lab. Clin. Med.* 69, 370 (1967).
- [92] St. Kornfeld, *Biochemistry* 7, 945 (1968).
- [93] T. Muldoon u. U. Westphal, *J. Biol. Chem.* 242, 5636 (1967).
- [94] M. Ganguly u. U. Westphal, *J. Biol. Chem.* 243, 6130 (1968).
- [95] A. G. Morell, G. Gregoriadis u. I. H. Scheinberg, *J. Biol. Chem.* 246, 1461 (1971).
- [96] J. C. Rogers u. S. Kornfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 622 (1971).
- [97] R. D. Marshall, *Annu. Rev. Biochem.* 41, 673 (1972).
- [98] B. A. Bray u. K. Laki, *Biochemistry* 7, 3119 (1968).
- [99] B. A. Bray u. B. Alexander, *Fed. Proc.* 28, 356 (1969).
- [100] H. G. Schwick u. H. E. Schultzze, *Clin. Chim. Acta* 4, 26 (1959).
- [101] G. F. Springer, H. G. Schwick u. M. A. Fletcher, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 634 (1969).
- [102] U. Hadding u. H. J. Müller-Eberhard, *Immunology* 16, 719 (1969).
- [103] J. S. Multani, C. P. Cepurneek, P. S. Davis u. P. Saltman, *Biochemistry* 9, 3970 (1970).
- [104] J. Watson u. J. Prichard, *J. Immunol.* 108, 1215 (1972).
- [105] I. Yamashina, *Acta Chem. Scand.* 10, 1666 (1956).
- [106] G. A. Jamieson, *Protides Biol. Fluids* 14, 71 (1966).
- [107] M. Waller u. C. W. Moncure, *Immunochemistry* 10, 99 (1973).
- [108] J. F. Heremans, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 45, 131 (1968).
- [109] J. F. Heremans, *Behringwerk-Mitt.* 49, 28 (1969).
- [110] M. Wölcott, D. Freeman, W. Hammack u. W. Niedermeier, *Fed. Proc.* 31, 3133 (1972).
- [111] E. Kallee, S. Debiasi, C. Karypidis, K. Heide u. H. G. Schwick, *Acta Isotop. 4*, 103 (1964).
- [112] E. Athineos, M. Thornton u. R. J. Winzler, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 353 (1962).

- [113] R. L. Simmons, A. Rios u. P. K. Ray, *Nature New Biol.* 231, 179 (1971).
- [114] *Lancet* Nr. 7749, S. 523 (1972).
- [115] B. B. Kamrin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 58 (1959).
- [116] J. F. Mowbray, *Immunology* 6, 217 (1963).
- [117] J. C. Occhino, A. H. Glasgow, S. R. Cooperband, J. A. Mannick u. K. Schmid, *J. Immunol.* 110, 685 (1973).
- [118] *Selecta* 14, 4262 (1972).
- [119] J. C. Houck, R. L. Weil u. V. K. Sharma, *Nature New Biol.* 240, 210 (1972).
- [120] N. Kiger, I. Florentin u. G. Mathé, *Transplantation* 14, 448 (1972).
- [121] W. A. Hinrichs u. D. G. Smyth, *Immunology* 18, 769 (1970).
- [122] F. Miller, *J. Immunol.* 107, 1161 (1971).
- [123] J. D. Smiley u. H. Herten, *Immunochemistry* 2, 61 (1965).
- [124] M. Tomana, W. Niedermeier u. F. Skvarik, *Fed. Proc.* 32, 4486 (1973).
- [125] K. Heide u. F. R. Seiler, *Arzneim.-Forsch.* 21, 1443 (1971).
- [126] F. Melchers u. M. Sela, *Immunochemistry* 7, 749 (1970).
- [127] M. O. Dayhoff, *Sci. Amer.* 221, Nr. 7, S. 87 (1969).
- [128] M. O. Dayhoff: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Bd. 5. National Biomedical Research Foundation, Washington 1972.
- [129] Immunoglobulins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 190 (1971).
- [130] A. Höpner, *Chem. Unserer Zeit* 3, 3 (1969).
- [131] G. M. Edelman, *Angew. Chem.*, im Druck; R. R. Porter, *ibid.*, im Druck; K. Heide, *Chem. Labor Betr.* 1973, 97.
- [132] N. Hilschmann, *Naturwissenschaften* 56, 195 (1969).
- [133] R. L. Will, R. Delaney, R. E. Fellows u. H. E. Lebovitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 1762 (1966).
- [134] F. W. Putnam, K. Titani, M. Wikler u. T. Shinoda, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32, 9 (1967).
- [135] R. A. Good u. B. W. Papermaster, *Advan. Immunol.* 4, 1 (1964).
- [136] D. Frommel, G. W. Litman, S. L. Chartrand, U. S. Seal u. R. A. Good, *Immunochemistry* 8, 573 (1971).
- [137] G. W. Litman, *Immunochemistry* 8, 345 (1971).
- [138] R. J. Poljak, L. M. Amzel, H. P. Avey, L. N. Becka u. A. Nisonoff, *Nature New Biol.* 235, 137 (1972).
- [139] J. S. Gallagher u. E. W. Voss, *Immunochemistry* 6, 573 (1969).
- [140] R. C. Acton u. P. F. Weinheimer, *Fed. Proc.* 31, 3048 (1972).
- [141] H. G. van Eijk, J. P. van Dijk, W. L. van Noort, B. Leijse u. C. H. Monsoor, *Scand. J. Haematol.* 9, 267 (1972).
- [142] B. G. Hudson, M. Ohno, W. J. Brockway u. F. J. Castellino, *Biochemistry* 12, 1047 (1973).
- [143] K. Schmid, *Chimia* 26, 405 (1972).
- [144] J. A. Black u. G. H. Dixon, *Nature* 218, 736 (1968).
- [145] R. J. Bernacki u. H. B. Bosmann, *Eur. J. Biochem.* 33, 49 (1973).
- [146] G. B. Robinson, J. Molnar u. R. J. Winzler, *J. Biol. Chem.* 239, 1134 (1964).
- [147] L. Li, R. G. Kipfer u. R. E. Olson, *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 494 (1970).
- [148] P. M. Knopf, Y. S. Choi u. E. S. Lennox, *Behringwerk-Mitt.* 49, 155 (1969).
- [149] F. Melchers, *Behringwerk-Mitt.* 49, 169 (1969).
- [150] F. Melchers, *Umschau* 69, 105 (1969).
- [151] N. B. Esterly, G. V. Alm, R. D. A. Peterson u. A. Dorfman, *Experientia* 27, 208 (1971).
- [152] F. Melchers, *Biochemistry* 12, 1471 (1973).
- [153] J. Williams, *Biochem. J.* 108, 57 (1968).
- [154] M. Isemura, T. Ikenaka u. Y. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 457 (1972).
- [155] E. H. Eylar, *J. Theor. Biol.* 10, 89 (1966).
- [156] P. J. Winterburn u. C. F. Phelps, *Nature* 236, 147 (1972).
- [157] P. J. Winterburn, *Biochem. J.* 128, 118 P (1972).

ZUSCHRIFTEN

Wie „aromatisch“ sind λ^5 -Phosphorine? Elektrophile Substitutionsreaktionen

Von Werner Schäfer und Karl Dimroth^[1]

Herrn Professor Karl Winnacker zum 70. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet

Der Begriff „Aromazität“^[11] wird vom präparativen Chemiker auch so verstanden, daß die *Substitution* eines H-Atoms unter Erhalt oder Rückbildung des aromatischen Systems vor der *Addition* zu einer weniger ungesättigten Verbindung begünstigt ist. – Bei der Umsetzung von Phosphoniumyliden mit Elektrophilen beobachtet man stets eine Zweistufenreaktion: Addition zum Phosphoniumsalz und, in Gegenwart einer ausreichend starken Base, Abspaltung eines α -Protons. Ist das neue, substituierte Ylid stark mesomeriestabilisiert, so kann das Proton auch vom weniger stabilisierten Ausgangsylid unter „Umylidierung“^[2] aufgenommen werden.

Solche Reaktionen beobachteten Märkl et al. auch bei der Umsetzung von cyclischen 6π -delokalisierten Phosphoniumyliden wie 1,1-Diphenyl- und 1,1,2-Triphenyl-

phosphanaphthalin^[3]. Mit Methyljodid oder Diazoniumsalzen entstanden zunächst die Phosphoniumsalze, die in Gegenwart von Basen in die 4- oder 2-substituierten 1,1-Diphenyl- λ^5 -phosphanaphthaline übergeführt werden konnten; mit Säurechloriden bilden sie sich direkt unter Umylidierung.

Da 1,1-Dialkoxy- λ^5 -phosphorine^[4] nach anderen Kriterien der Aromatizität erheblich „aromatischer“ sein sollen als 1,1-Dialkyl- oder 1,1-Diaryl- λ^5 -phosphorine, müßten sich diese sehr schwach basischen Verbindungen besonders für die aus der Benzol-Chemie bekannten elektrophilen Substitutionen an C-2 oder C-4 eignen. Die präparative Überprüfung scheitert jedoch daran, daß derartige 1,1-Dialkoxy- λ^5 -phosphorine mit einem substituierbaren H-Atom an C-2 oder C-4 bisher nicht zugänglich sind.

Wir berichten hier über die Synthese von λ^5 -Phosphorinen mit anderen elektrofugen Gruppen als einem Proton an C-4. An diesen Derivaten konnten wir zeigen, daß sie glatt und in hoher Ausbeute, auch in saurem Medium, elektrophil substituiert werden können, ohne daß hierbei ein Hinweis für die intermediäre Bildung eines Phosphoniumsalzes gefunden wurde.

Den Zugang zu solchen λ^5 -Phosphorinen bildet (1,1-Dimethoxy-2,6-diphenyl- λ^5 -phosphorin-4-yl)carbenium-tetrafluoroborat (1)^[5]. Es reagiert in Acetonitril in Gegenwart von etwas Wasser zunächst zum nicht isolierten Alkohol (2). Dieser kann elektrophil unter Abspaltung

[*] Dr. W. Schäfer und Prof. Dr. K. Dimroth
Organische Chemie im Fachbereich Chemie
der Universität
355 Marburg, Lahnberge