

D-Aspartyl-L-alanin als Interpeptidbrücke im Murein von *Bacillus pasteurii* Migula

D-Aspartyl-L-alanine an Interpeptide Bridge of the Murein of *Bacillus pasteurii*
Migula

H. RANFTL und O. KANDLER

Botanisches Institut der Technischen Universität München und Botanisches Institut der Universität
München

(Z. Naturforsch. 28 c, 4—8 [1973]; eingegangen am 25. August/3. Oktober 1972)

Murein structure, *Bacillus pasteurii*

The murein (peptidoglycan) of the cell walls of 4 strains of *B. pasteurii* was analysed. In vegetative cells the peptide subunits consist of L-Ala-N²-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala while the interpeptide bridge bond to the ε-aminogroup of L-Lys consists of N-β-D-Asp-L-Ala. The spores contain a murein of the meso-DAP-type. In the strain ATCC 6453 about 30 % of L-Ala of the interpeptide bridge is replaced by L-Ser.

Das Murein (Peptidoglycan) der Gattung *Bacillus* ist bisher vorwiegend von Arten der Gruppe 1 und 2 nach SMITH *et al.*¹ (Formen mit ovalen bis zylindrischen Sporen) untersucht worden. In allen bisher beschriebenen Fällen gehört das Murein dieser Arten dem meso-DAP-Typ an. Auch in eigenen Untersuchungen an mehr als 20 Arten wurde nur dieser Typ gefunden². Demgegenüber kommt in vegetativen Zellen von *B. sphaericus*, einem Vertreter der rundsporigen Gruppe 3, Lysin als Diaminosäure und als zusätzliche Aminosäure D-Asparaginsäure vor³, während das Murein der Sporen dieser Art meso-DAP und keine Asparaginsäure enthält. Neuerdings zeigten HUNGERER und TIPPER⁴, daß die Aminosäuresequenz des Mureins der vegetativen Zellen dem L-Lys-D-Asp-Typ, wie er bei *Lactobacillen* weit verbreitet ist, entspricht.

In der vorliegenden Arbeit wird das Murein einer weiteren rundsporigen Art, nämlich *B. pasteurii*, beschreiben, bei der die vegetativen Zellen ebenfalls Lysin als Diaminosäure und zusätzlich D-Asparaginsäure enthalten. Im Unterschied zu *B. sphaericus* enthält aber die Interpeptidbrücke zusätzlich zu Asparaginsäure auch L-Alanin.

Material und Methode

Verwendet wurden *B. pasteurii* ATCC* 6453, DSM** 276, DSM 323 sowie ein Eigenisolat (Stamm M), das,

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. O. KANDLER, Botanisches Institut d. Univ. München, D-8000 München, Menzinger Str. 19.

* American Type Culture Collection.

** Deutsche Sammlung für Mikroorganismen.

wie bei CLAUS⁵ beschrieben, aus Mistbeeterde isoliert wurde. Die Massenkulturen zur Gewinnung der Zellwände erfolgten in Hefe-Dextrose-Bouillon unter Zusatz von 2 % Harnstoff (0,5 % Hefeextrakt, 1 % Pepton aus Casein, 0,5 % Glucose, 2 % Harnstoff, pH 8,5–9,0). Der Harnstoff muß vor dem Autoklavieren zum Medium gegeben werden⁶, damit eine teilweise Hydrolyse zu NH₄⁺ erfolgt. Die Kulturen wurden in 1 l Erlenmeyer (300 ml Medium) auf der Schüttelmaschine bei 30 °C inkubiert und in der log. Phase geerntet. Durch mikroskopische Kontrolle wurde sichergestellt, daß es sich nur um vegetative Zellen handelte.

Die Isolierung und Reinigung der Zellwände, sowie die Analyse der Total- und Partialhydrolysate einschließlich Chromatographie, Dinitrophenylierung usw. erfolgte in der früher ausführlich beschriebenen Weise^{2, 7, 8}.

Die Konfiguration der Glutaminsäure, Asparaginsäure und des Lysins wurde durch die Messung der optischen Rotationsdispersion (ORD) der DNP Derivate bestimmt⁹. Die Beteiligung der β-Carboxylgruppe an der Peptidbindung wurde durch Photolyse der entsprechenden dinitrophenylierten Peptide sowie der Zellwand nachgewiesen¹⁰.

Ergebnisse

1. Molverhältnisse der Aminosäuren und Aminozucker

Die Tab. I gibt die in den Totalhydrolysaten (4 N HCl, 16 h, 100 °C) von verschiedenen Zellwandpräparationen vegetativer Zellen (mit und ohne Extraktion durch TES) gefundenen Molverhältnisse von Aminozuckern und Aminosäuren wieder. Neben Glucosa-

min war als weiterer Aminosucker noch Mannosamin nachweisbar, das aber keine Komponente des Mureins ist. Der Gesamtgehalt der durch tryptische Verdauung gereinigten Zellwandpräparation an Murein betrug rund 30 %, wenn man davon ausgeht, daß alle gefundene Glutaminsäure Bestandteil des Mureins ist und wenn man die in Abb. 2 gegebene Struktur des Mureins der Berechnung zugrunde legt. Der Hauptteil der Zellwand dürfte aus Polysaccharid bestehen, das vorwiegend aus Mannosamin, Glucosamin und Glucose zusammengesetzt ist. Daher stammt auch die weit über 1,0 liegende Menge an Glucosamin.

Der Stamm M enthält offenbar keine Teichonsäure, denn der Phosphatgehalt liegt mit 1,4 % sehr niedrig und durch Extraktion mit TES (3 Tage bei 4 °C) ergab sich keine Zunahme des Gehaltes an Murein-Aminosäuren (Tab. I). Dagegen wies der Stamm ATCC 6453 einen Phosphatgehalt von 4,15 % auf und durch TES ließ sich Teichonsäure isolieren. Im Hydrolysat der isolierten Teichonsäure (2 N HCl, 2 h, 100 °C) ließ sich nach elektrophoretischer Trennung α -Glycerophosphat nachweisen. Dagegen verlief der Nachweis von Alaninamid nach 48-stdg. Ammonialyse negativ. Diese Teichonsäure enthält demnach im Gegensatz zu

Tab. I. Aminosäuregehalt von Zellwandpräparationen. TRYP = gereinigt durch tryptische Verdauung. TES = zusätzliche Reinigung durch Extraktion mit Trichloressigsäure. a. μ Mol/mg Zellwand; b. Molverhältnisse (Glu = 1).

| Organismus | | Ala | Glu | Lys | Asp | Ser | GlcNH ₂ | Mur | NH ₃ | NH ₃ nach 4 Stdn. Hydrolyse | |
|------------|------|-----|-------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-----------------|--|-------|
| Stamm M | TRYP | a | 0,695 | 0,265 | 0,275 | 0,275 | — | 0,610 | 0,235 | 0,380 | 0,127 |
| | | b | 2,62 | 1,0 | 1,03 | 1,03 | — | 2,26 | 0,88 | 1,43 | 0,48 |
| | TES | a | 0,840 | 0,320 | 0,335 | 0,310 | — | 0,815 | 0,275 | 0,295 | — |
| | | b | 2,62 | 1,00 | 1,04 | 0,96 | — | 2,55 | 0,85 | 0,92 | — |
| ATCC 6453 | TRYP | a | 0,685 | 0,267 | 0,322 | 0,289 | 0,089 | 0,833 | 0,122 | 0,311 | 0,120 |
| | | b | 2,38 | 1,00 | 1,20 | 1,08 | 0,33 | 3,12 | 0,64 | 1,16 | 0,42 |
| | TES | a | 1,38 | 0,59 | 0,56 | 0,60 | 0,20 | 0,38 | 0,30 | 0,24 | — |
| | | b | 2,34 | 1,00 | 0,95 | 1,01 | 0,34 | 0,64 | 0,50 | 0,48 | — |
| DSM* 276** | TRYP | a | 0,54 | 0,24 | 0,23 | 0,22 | — | 0,52 | 0,22 | 0,46 | 0,49 |
| | | b | 2,24 | 1,00 | 0,95 | 0,92 | — | 2,14 | 0,92 | 1,94 | 2,04 |
| DSM* 323 | TRYP | a | 0,65 | 0,28 | 0,25 | 0,26 | — | 0,54 | 0,26 | 0,22 | 0,12 |
| | | b | 2,34 | 1,00 | 0,89 | 0,94 | — | 1,85 | 0,93 | 0,78 | 0,4 |

* DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen.

** Gehalt an Fremdaminosäuren in Stamm DSM 276 in μ Mol/mg: Glycin 0,021; Serin 0,013; Leucin 0,009; Isoleucin 0,005; andere Aminosäuren nicht erfaßbar. Bei anderen Stämmen ähnliche oder geringere Mengen.

anderen Teichonsäuren kein estergebundenes D-Alanin. Die Stämme DSM 276 und 323 wurden nicht auf Teichonsäure untersucht.

Die in Tab. I aufgeführten Molverhältnisse sind durch das Auftreten von ein Mol Asparaginsäure und von mehr als 2 Molen Alanin pro Mol Glutaminsäure von allen anderen bisher untersuchten Mureinen verschieden, denn bisher sind mit dem Vorkommen von Asparaginsäure immer nur 1,5 bis 2 Mole Alanin verbunden. Bei Stamm ATCC 6453 ist ein Teil des L-Alanins durch L-Serin ersetzt, wie dies auch in anderen Fällen schon wiederholt gefunden wurde². Die enzymatische Bestimmung¹¹ der Konfiguration des Alanins ergab 3 Mole L-Ala pro Mol D-Alanin. Glutaminsäure und Asparaginsäure liegen ausschließlich in der D-Konfiguration vor, wie die Messung der ORD der DNP-Derivate und der negativ verlaufende enzymatische

Test auf die entsprechenden L-Aminosäuren ergab. Bei Lysin handelt es sich nach den Ergebnissen der ORD-Messung um L-Lysin.

Der im Hydrolysat mit etwas mehr als 1 Mol pro Mol Glutaminsäure auftretende NH₃ konnte aus Amidbindungen oder aus der Hydrolyse der in großen Mengen vorhandenen Aminosucker stammen. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu entscheiden, wurde der NH₃-Gehalt nach nur 4-stdg. Hydrolyse in 4 N HCl bestimmt. Nach GHUYSEN *et al.*¹² erfolgt in dieser Zeit eine vollständige Hydrolyse der Amide, während praktisch noch keine Zerstörung der Aminosucker eintritt. In unserem Fall ergeben sich bei 3 Stämmen nur rund 0,45 Mol NH₃ pro Mol Gesamtglutaminsäure. Es ist daher anzunehmen, daß hier nur rund 50 % der Glutaminsäure des Mureins amidiert sind. Das entspricht den Befunden bei *B. licheniformis*¹⁸ und *Aero-*

*coccus*¹⁴, bei denen ebenfalls nur eine teilweise Amidierung der Glutaminsäure vorliegt. Der Stamm DSM 276 weist dagegen rund 2 Mole NH₃ pro Mol Glutaminsäure auf, sodaß hier vermutlich Glutaminsäure und Asparaginsäure amidiert sind, wie dies bei den meisten Lactobacillen gefunden wurde².

2. N- und C-terminale Aminosäuren

Die dünnschichtchromatographische Trennung von Hydrolysaten dinitrophenylierter Zellwände lieferte geringe Mengen ϵ -DNP-Lysin neben einer größeren Menge an DNP-Asparaginsäure. Die photometrische Auswertung ergab, daß 43 % der Asparaginsäure und 8 % des Lysins in der Zellwand N-terminal vorlagen. Die Bestimmung des Aminosäuregehalts von Hydrolysaten normaler und dinitrophenylierter Zellwände mit Hilfe des Aminosäureanalysators ergab für Asparaginsäure eine Differenz von rund 40 %, bei Lysin lagen die Unterschiede innerhalb der Fehlergrenzen.

Die Hydrazinolyse der Zellwände lieferte 16 % des Gesamtlysingehaltes als freies Lysin, aber nur weniger als 1 % freies Alanin. Demnach ist praktisch nur Lysin, aber kaum Alanin C-terminal. Nach BRAUN und SCHRÖDER¹⁵ unterliegt Lysin einer starken Zerstörung während der Hydrazinolyse, sodaß die Lysinwerte als Mindestwerte zu betrachten sind.

3. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz mit Hilfe der Partialhydrolyse

Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz wurden die tryptisch gereinigten Zellwände von Stamm M einer Partialhydrolyse (4 N/HCl, 10–45 Min., 100 °C) unterworfen und die entstandenen Peptide papierchromatographisch getrennt. Abb. 1 gibt das Schema eines zweidimensionalen Chromatogramms wieder. Durch wiederholte eindimensionale Chromatographie wurden die Peptide isoliert und in der früher beschriebenen Weise^{7, 8} identifiziert.

Das Auftreten der Peptide Mur-L-Ala, Mur-L-Ala-D-Glu, N²- γ -D-Glu-L-Lys, L-Ala-N²-D-Glu-L-Lys und L-Lys-D-Ala beweisen, daß die an die Muraminsäure gebundene Peptiduntereinheit die übliche Sequenz Mur-L-Ala-N²- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala aufweist.

Die Peptide N⁶-L-Ala-L-Lys und N⁶-L-Ala-L-Lys-D-Ala zeigen die Substitution der ϵ -Aminogruppe des Lysins durch L-Ala, das seinerseits zusammen mit Asparaginsäure die Interpeptidbrücke zu einem benach-

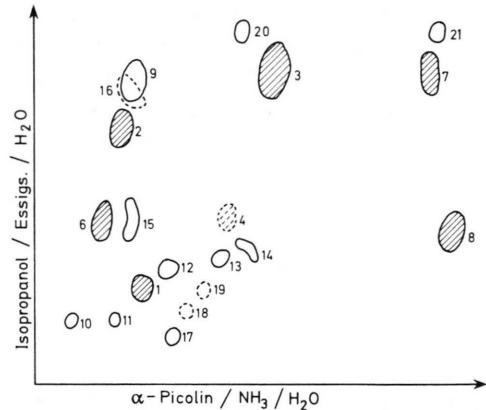


Abb. 1. Schema eines zweidimensionalen Chromatogramms eines Partialhydrolysates (4N HCl/100 °C/45 Min.) von *B. pasteurii* (Stamm M und ATCC 6453): 1 = Lys; 2 = Glu; 3 = Ala; 4 = Ser; 6 = Asp; 7 = Mur; 8 = GlcNH₂; 9 = L-Ala-D-Glu; 10 = N²-8-D-Glu-L-Lys; 11 = L-Ala-N²-8-G-Glu-L-Lys; 12 = L-Lys-D-Ala; 13 = N⁶-L-Ala-L-Lys; 14 = N⁶-(L-Ala)-Lys-D-Ala; 15 = N- β -D-Asp-L-Ala; 16 = D-Ala-D-Asp; 17 = N⁶-(N- β -D-Asp-L-Ala)-L-Lys; 18 = N⁶-Ser-L-Lys; 19 = N⁶-(Ser)-L-Lys-D-Ala; 20 = Mur-L-Ala-D-Glu und 21 = Mur-L-Ala. Nr. 4, 18 und 19 treten nur bei ATCC 6453 auf.

barten Tetrapeptid bildet, wie das Vorkommen der Peptide N- β -D-Asp-L-Ala, N⁶(N- β -D-Asp-L-Ala)-L-Lys und D-Ala-D-Asp beweist.

Der Beweis, daß die Asparaginsäure mit ihrer β -Carboxylgruppe an das L-Ala der Interpeptidbrücke gebunden ist, wurde in Anlehnung an PERKINS¹⁰ durch die Untersuchung der Photolyse dinitrophenylierter Zellwände erbracht. Ein starker Anstieg der Extinktion bei 284 nm und ein Abfall bei 340 nm nach UV-Bestrahlung zeigten an, daß die der dinitrophenylierten Aminogruppe benachbarte α -Carboxylgruppe der Asparaginsäure nicht an einer Peptid- oder Amidbindung beteiligt ist und daher abgespalten wird.

Die Zerstörung der DNP-Asparaginsäure durch die UV-Bestrahlung wurde außerdem durch die dünnschichtchromatographische Analyse des Hydrolysates der photolysierten DNP-Zellwände gezeigt. Nach Photolyse fehlte die DNP-Asparaginsäure völlig. Auch das isolierte Peptid D-Asp-L-Ala wurde entsprechend behandelt und erwies sich als N- β -D-Asp-L-Ala.

Unter Zusammenfassung der Ergebnisse der Partialhydrolyse und der Bestimmung der N- und C-terminalen Aminosäuren ergibt sich die in der Abb. 2 dargestellte Struktur des Mureins. Dabei ist die Struktur des Glycans in Analogie zu anderen Mureinen (vgl. GHUYSEN¹⁶) angenommen.

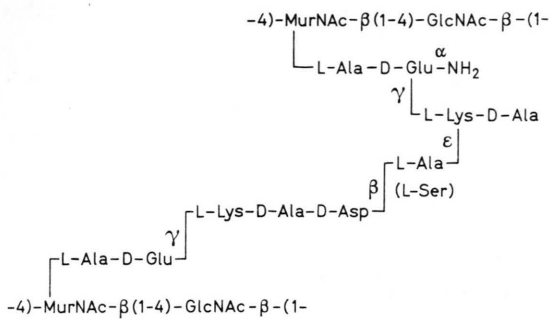


Abb. 2. Ausschnitt aus dem Murein von *B. pasteurii*. Beim Stamm ATCC 6453 ist jedes 3. L-Alanin der Interpeptidbrücke durch Serin ersetzt.

Gegenüber der „idealisierten“ Struktur der Abb. 2 weist das tatsächlich vorliegende Murein einige Abweichungen auf:

- Etwa 8 % des Lysins ist nicht mit einer Interpeptidbrücke substituiert, da dieser Prozentsatz des Lysins nach Dinitrophenylierung der Zellwände als DNP-Lysin gefunden wurde.
- Etwa 40 % der vorhandenen Interpeptidbrücken sind nicht quervernetzt, wie das Auftreten der entsprechenden Menge an DNP-Asparaginsäure zeigt. Die Quervernetzung ist unter Berücksichtigung von a) nur zu rund 50 % durchgeführt.
- Das C-terminale D-Alanin, das aufgrund der sehr unvollständigen Quervernetzung rund 50 % des Gesamt-D-Alanins betragen müßte, ist praktisch vollständig abgespalten, wie das Vorkommen von weniger als 1 % C-terminalem Alanin und mehr als 16 % C-terminalem Lysin beweist. Damit steht auch in Übereinstimmung, daß das Molverhältnis des Alanins zu Glutaminsäure nicht 3 : 1, sondern nur rund 2,5 : 1 beträgt. Entsprechend beträgt das Verhältnis L-Ala/D-Ala nicht 2 : 1, sondern 3 : 1.
- Die Amidierung der α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure ist bei den Stämmen ATCC 6453, SMG 323 und M nur zu rund 50 % verwirklicht, wie das Vorkommen von nur rund 0,5 Mol leicht abhydrolysierbarem NH_3 zeigt. Dagegen sind bei SMG 276 sowohl Glutaminsäure als auch Asparaginsäure praktisch vollständig amidiert.

3. Position von L-Serin bei ATCC 6453

Die Klärung der Position des im Murein von ATCC 6453 auftretenden L-Serins wurde ebenfalls mit Hilfe der Analyse des Partialhydrolysates erreicht. Zusätzlich zu den bei den übrigen Stämmen gefundenen Peptiden traten hier die Peptide N^6 -L-Ser-L-Lys und N^6 -L-Ser-L-Lys-D-Ala (Abb. 1) auf. Sie zeigen, daß L-Serin einen Teil des L-Ala der Interpeptidbrücke ersetzt, wie es auch schon die Molverhältnisse nahelegen. Die Dinitrophenylierung ergab ϵ -DNP-Lys und DNP-Asp in ähnlichen Prozentsätzen wie bei Stamm M.

Um zu prüfen, ob der Ersatz von L-Alanin durch den Serin- bzw. Alaningehalt des Nährbodens bestimmt ist, wurde der Stamm in Nährböden mit Zusatz von 0,5 % L-Alanin bzw. 0,5 % L-Serin kultiviert und die Zellwände analysiert. Der Anteil von L-Serin änderte sich jedoch nicht und lag in beiden Fällen wie bei der Kontrolle ohne Aminosäurezusatz bei 0,3 Mol pro Mol Glutaminsäure. Das Verhältnis von L-Alanin zu L-Serin in der Interpeptidbrücke scheint demnach genetisch festgelegt zu sein und der Stamm ATCC 6453 stellt hinsichtlich seiner Mureinzusammensetzung eine Variante innerhalb der Art dar.

Diskussion

Das beschriebene Murein weicht von den ebenfalls asparaginsäurehaltigen Mureinen von *B. sphaericus* oder der Lactobacillen grundsätzlich dadurch ab, daß die Asparaginsäure der Interpeptidbrücke nicht direkt, sondern über einen L-Alanylrest an das Lysin gebunden ist. In Übereinstimmung mit *B. sphaericus* weisen die Sporen von *B. pasteurii* den meso-DAP-Typ des Mureins auf. Um dies zu zeigen, wurden Sporenaufschwemmungen hydrolysiert und das Hydrolysat papierchromatographisch analysiert. Es ergaben sich große Mengen an meso-DAP, die in vegetativen Zellen fehlen. Eine genauere Analyse des Mureins wurde nicht vorgenommen. Nachdem sich die beiden untersuchten Arten der rundsporigen Bacillen von allen Ver tretern der Gruppe 1 und 2 hinsichtlich der Mureinzusammensetzung unterschieden, war es von Interesse, ob auch die dritte beschriebene rundsporige Art der Gruppe 3 einen entsprechenden chemischen Dimorphismus zwischen vegetativer Zelle und Spore aufweist. Wir untersuchten daher auch einen Stamm von *B. pantothenicus* (ATCC 14576). Die Zellwand der vegetativen Zellen wies jedoch den meso-DAP-Typ des Mureins auf, wie aus den Molverhältnissen der Aminosäuren in Zell-

wandhydrolysaten und dem Peptidmuster nach Partialhydrolyse hervorging. Hydrolysate von Sporen enthielten ebenfalls große Mengen an meso-DAP.

Die Rundsporigkeit geht demnach nicht mit der Zellwandzusammensetzung parallel. Die Abweichung von dem für die Gattung *Bacillus* typischen meso-DAP-Typ des Mureins kommt offenbar nur bei den ohnehin recht nahe verwandten Arten *B. sphaericus* und *B. pasteurii* vor. Sie sind stoffwechselfysiologisch mehr mit *Sporosarcina ureae* als mit den übrigen Bacillen verwandt. Dies drückt sich auch in der Mureinzusammensetzung aus. Ähnlich wie bei den beiden rundsporigen Bacillen enthält das Murein der vegetativen Zellen von *Sporosarcina* L-Lysin, das der Sporen meso-DAP¹⁷. Die Interpeptidbrücke besteht allerdings nicht aus einem Asparaginsäurerest oder aus D-Aspartylalanin, sondern aus D-Glutamylglycin. Das Prinzip, eine D-

Dicarboxylaminosäure zu verwenden, ist aber auch hier gewahrt. Zwischen *Sporosarcina* und *B. pasteurii* besteht auch eine gewisse, wenn auch nur geringe DNA/DNA-Homologie¹⁸.

Schon SMITH *et al.*¹ waren sich nicht sicher, ob *B. pantothenicus* wirklich zur Gruppe 3 oder nicht besser zu Gruppe 2 der Bacillen zu stellen und damit von *B. pasteurii* und *B. sphaericus* abzusetzen ist. Die hier aufgezeigte Ähnlichkeit des Mureinaufbaues der beiden rundsporigen Arten und von *Sporosarcina* legt nahe, die drei Formen enger zusammenzufassen und sie eventuell unter Wiederbelebung der von MIQUEL¹⁹ vorgeschlagenen Gattung *Urobacillus* zu vereinigen.

Fräulein R. KECK und Frau E. HAGNER danken wir für ausgezeichnete technische Assistenz, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen.

- ¹ N. R. SMITH, R. E. GORDON u. F. E. CLARK, U.S. Dept. Agric. Monograph. No 16, Washington [1952].
- ² K. H. SCHLEIFER u. O. KANDLER, *Bacteriol. Rev.* **36**, 407—477 [1972].
- ³ J. F. POWELL u. R. E. STRANGE, *Biochem. J.* **65**, 700—708 [1957].
- ⁴ K. D. HUNGERER u. D. J. TIPPER, *Biochemistry* **8**, 3577—3586 [1969].
- ⁵ D. CLAUS, *Zbl. Bakt. Suppl.* **1**, 337—362 [1965].
- ⁶ W. R. WILEY u. J. L. STOKES, *J. Bacteriol.* **84**, 730—734 [1962].
- ⁷ K. H. SCHLEIFER u. O. KANDLER, *Arch. Mikrobiol.* **57**, 335—364 [1967a].
- ⁸ O. KANDLER, R. PLAPP u. W. HOLZAPFEL, *Biochem. biophysica Acta* [Amsterdam] **147**, 252—261 [1967].
- ⁹ O. KANDLER, D. KOCH u. K. H. SCHLEIFER, *Arch. Mikrobiol.* **61**, 181—186 [1968].
- ¹⁰ H. R. PERKINS, *Biochem. J.* **102**, 29c—32c [1967].
- ¹¹ H. U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Weinheim Verlag Chemie 1962.
- ¹² J. M. GHUYSEN, E. BRICAS, M. LEYH-BOUILLE, M. LACHE u. G. D. SHOKMAN, *Biochemistry* **6**, 2607—2619 [1967].
- ¹³ D. MIRELMAN u. N. SHARON, *J. biol. Chemistry* **243**, 2279—287 [1968].
- ¹⁴ M. NAKEL, J. M. GHUYSEN u. O. KANDLER, *Biochemistry* **10**, 2170—2175 [1971].
- ¹⁵ V. BRAUN u. W. T. SCHROEDER, *Arch. Biochem Biophysics* **118**, 241—252 [1967].
- ¹⁶ J. M. GHUYSEN, *Bacteriol. Rev.* **32**, 425—464 [1968].
- ¹⁷ H. RANFTL u. O. KANDLER, *Arch. Mikrobiol.* (im Druck).
- ¹⁸ S. A. HERNDON u. K. F. BOTT, *J. Bacteriol.* **97**, 6—12 [1969].
- ¹⁹ MIQUEL, *Ann. de Micrographie* **1**, 552 [1882].