

Freie und Membrangebundene Ribosomen in der Rattenleber: Tagesrhythmik und hormonale Einflüsse

Free and Membrane-bound Ribosomes in Rat Liver:
Daily Rhythm and Hormonal Influences

LOTHAR DIEMINGER

I. Zoologisches Institut der Universität Göttingen

(Z. Naturforsch. 28c, 66—71 [1973]; eingegangen am 24. Juli/27. November 1972)

Daily rhythm, free, membrane-bound ribosomes, rat liver, corticosteroids

Free and membrane-bound ribosomes were isolated from rat liver and quantitized by photometric methods. The amount of membrane-bound ribosomes remains relatively constant over 24 hours whereas the amount of free ribosomes changes considerably: a maximum appears between 6—9 h, a minimum between 18—21 h. Fasting the animals increases the overall variance.

Injectations of cortisol 4 hours before killing the animals increases the total amount of ribosomes and induces a definite maximum of membrane-bound ribosomes at 6 h. The maximum of free ribosomes appears at the same time as in control animals. In contrast to cortisol, corticosterone has no effect on the total amount of ribosomes, it induces, however, a maximum of membrane-binding between 18—21 h. Also in this case the maximum of free ribosomes remains unchanged.

In the evening, the protein content of free ribosomes decreases whereas a change was not observed in membrane-bound ribosomes. Cortisol increases the protein content in free and membrane-bound ribosomes.

Viele Funktionen der Rattenleber unterliegen einem Tagesrhythmus. Es treten beispielsweise Schwankungen in der RNA Synthese und im RNA Gehalt auf und tageszeitliche Aktivitätsänderungen bei zahlreichen Enzymen, die zum Teil rhythmisch neu synthetisiert werden¹. Entsprechend gibt es Befunde über einen Tagesrhythmus der gesamten Proteinsynthese²⁻⁴.

Die Proteinsynthese findet im Wesentlichen an den cytoplasmatischen Ribosomen statt, deren RNA etwa 80% der RNA der ganzen Zelle ausmacht. Es lassen sich zwei Klassen dieser Ribosomen unterscheiden, die verschiedene Proteine synthetisieren: Freie Ribosomen und an das endoplasmatische Reticulum (ER) gebundene. In vielen Arbeiten⁵⁻¹⁴ wird gezeigt, daß sekretorische Proteine, z. B. Serumproteine, an gebundenen Ribosomen, nicht sekretorische dagegen, wie z. B. Ferritin, an freien Ribosomen synthetisiert werden. Daß dieser funktionelle Unterschied jedoch nicht streng gilt, ist an dem Enzym Tyrosinaminotransferase nachgewiesen worden, das als intrazelluläres Protein auch an membrangebundenen Ribosomen synthetisiert wird¹⁵. Außerdem fanden FRIDLENDER und WETTSTEIN¹⁶ Unterschiede in der Zusammensetzung des ribosomalen

Proteins bei freien und gebundenen Ribosomen.

Welche Faktoren die Bindung an das ER bewirken ist noch unklar. Es werden Mg^{++} ¹⁷⁻¹⁹, Disulfidbrücken²⁰⁻²¹, neu synthetisierte Peptidketten²², mRNA²³ und tRNA²⁴⁻²⁵ als bindende Glieder diskutiert, die auch tagesperiodischen Schwankungen unterworfen sein könnten. Ebenso wäre eine unterschiedliche Reaktion auf Hormone denkbar, die die Bindung beeinflussen, wie es z. B. für Corticosteron und Hydrocortison bekannt ist²⁶⁻²⁷.

Es schien daher interessant, die Eigenschaften der Ribosomen im Zusammenhang mit dem Rhythmus der RNA- und Proteinsynthese, die Bindungsverhältnisse von Ribosomen und ER und ihre Beeinflussung durch Hormone im Laufe des Tages zu untersuchen.

Herrn Prof. Dr. L. RENSING danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit. Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Material und Methode

Die Versuchstiere

Ratten des Stammes Sprague-Dawley, die im Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12 : 12 Std., L 6—18⁰⁰) gehalten wurden, bekamen Futter (Altromin Typ 1300) und Wasser *ad libitum*. Die Fütterung erfolgte in der

Sonderdruckanforderungen an L. DIEMINGER, I. Zool. Institut d. Univ., D-3400 Göttingen, Berliner Str. 28.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Stunde vor der Dunkelzeit, zwischen 17 und 18⁰⁰. Die Raumtemperatur lag zwischen 22° und 25 °C. Männliche Tiere wurden im Alter von ca. einem Monat von dem Muttertier abgesetzt und zu 10–15 Tieren in Drahtkäfige mit 60 x 60 cm Grundfläche überführt. Zu den Versuchen verwendete ich diese Tiere mit einem Gewicht von 250–350 g; sie waren dann etwa drei Monate alt.

Methoden

1. Isolierung von freien und gebundenen Ribosomen

Alle Tiere wurden nach der von BLOBEL und POTTER²⁸, DAILLIE u. Mitarb.¹³ und PRUDHOMME u. Mitarb.²⁹ beschriebenen Methoden aufgearbeitet. Die Methoden wurden kombiniert und geringfügig variiert: Die Tiere habe ich ohne vorherige Betäubung durch Genickschlag getötet. Etwa ½ g des mittleren Leberlappens habe ich entnommen und das Blut zwischen Fließpapier vorsichtig ausgedrückt. Das Leberstückchen wurde dann in 5 ml eiskalter Homogenisationslösung (0,25 M Saccharose, 0,005 M MgCl₂ und 0,025 M KCl) überführt und sein Gewicht genau bestimmt. Alle Meßdaten sind auf 1 g Leberfrischgewicht bezogen. Tris, das in fast allen Methoden zur Ribosomenisolierung verwendet wird, eignet sich wegen seiner detergierenden Wirkung auf die gebundenen Ribosomen nicht. Der pH-Wert der ungepufferten Lösung lag bei 7,0–7,2. Anschließend habe ich die Leber in kleine Stückchen geschnitten und im Potter-Elvehjem Homogenisator unter wiederholter Abkühlung im Eis-Wassergemisch homogenisiert (10 Durchgänge). Alle weiteren Schritte erfolgten bei 2°–4 °C. Das Homogenat wurde 20 min bei 20 000 g in einer Zentrifuge des Typs Omikron von Heraeus Christ zentrifugiert, der Überstand mit einer Spritze abgenommen und in Eis aufbewahrt.

Ribosomen in diesem Überstand bezeichne ich als freie Ribosomen. Das Sediment habe ich in 5 ml einer 1-proz. Lösung von Natriumdesoxycholat in 0,25 M Saccharose, 0,05 M Tris, 0,005 M MgCl₂ und 0,025 M KCl bei pH 7,5 suspendiert und wieder 20 min bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält dann die Ribosomen, die vorher an das ER gebunden waren und durch Desoxycholat abgelöst worden sind. Das Sediment wurde verworfen. Jeweils 1 ml der Überstände der ersten und der zweiten Zentrifugation habe ich auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (untere Schicht 3 ml 2 M, obere Schicht 3 ml 0,5 M Saccharose) geschichtet und 90 min bei 18 000 g in der Ultrazentrifuge Omega II von Heraeus Christ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation enthalten die Sedimente die freien bzw. die gebundenen Ribosomen weitgehend frei von gefärbten Verunreinigungen. Ich habe die Saccharoselösung vorsichtig abgegossen und die Wände der Zentrifugenröhrchen gründlich mit Filterpapier von noch anhaftenden Rückständen der Trennschicht gereinigt. Die Sedimente wurden mit 1 ml 10-proz. NaCl durch Rühren mit einem Glasstab suspendiert, anschließend auf das 10-fache Volumen mit aqua dest. verdünnt und 5 min bei

1 800 g zentrifugiert. Von den dann fast klaren Überständen habe ich die Extinktion bei 260 nm gegen Wasser in einem Zeiss Photometer des Typs PMQ II gemessen.

2. Enzymtest

Tyrosinaminotransferase wurde nach DIAMONDSTONE³⁰ getestet.

3. Bestimmung des RNA-Protein-Verhältnisses in den Ribosomen

Die Sedimente der Dichtegradientenzentrifugation habe ich in 5 ml 10-proz. PCA suspendiert und 15 min bei ca. 1 300 g zentrifugiert, dieses Sediment zweimal mit 5-proz. PCA gewaschen und 2 Stdn. mit 4 ml 0,3 N NAOH bei 37 °C inkubiert. Protein wurde nach LOWRY³¹, und RNA im UV bei 260 nm bestimmt.

Befunde

1. Freie und gebundene Ribosomen bei unbehandelten Tieren (Abb. 1)

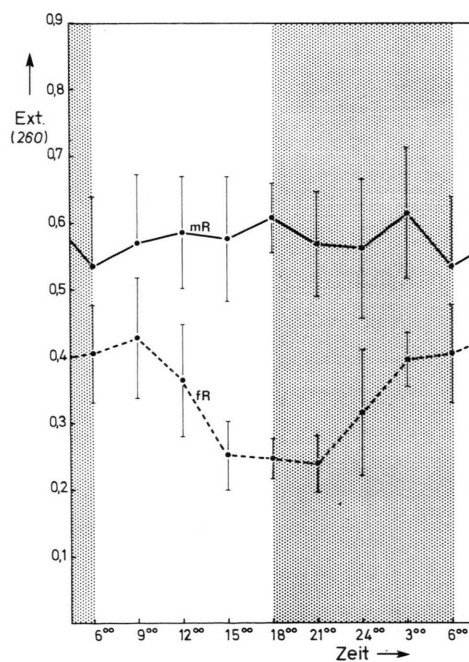


Abb. 1. Freie (---, FR) und membranbounde (—, mR) Ribosomen bei unbehandelten Tieren. Ordinate: Extinktion der Ribosomensuspension bei 260 nm, senkrechte Striche geben den dreifachen mittleren Fehler an; Abszisse: Tageszeit, 6–18⁰⁰ L, 18–6⁰⁰ D.

Gruppen von drei Tieren, zum Teil aus verschiedenen Käfigen, wurden im Abstand von 3 Stdn. über den ganzen Tag verteilt getötet. Ferner sind alle Tiere,

die in den folgenden Versuchen als Kontrollen dienten, in der Kurve enthalten. So ergibt sich eine Anzahl von 16–20 Tieren zu jedem Zeitpunkt.

Die gebundenen Ribosomen zeigen nur geringe Schwankungen, die sich statistisch nicht absichern lassen. Die freien Ribosomen dagegen unterliegen einem deutlichen Tagesrhythmus. Das Maximum liegt bei 6–9°; das Minimum bei 18–21 °C.

Um die Befunde von FISHMAN u. Mitarb.³² über den Einfluß der Nahrungsaufnahme zu prüfen, habe ich die Tiere 24 und 48 Std. vor dem Töten hungern lassen bei Wasser *ad libitum*, und dann freie und gebundene Ribosomen bestimmt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 6 Tiere getötet.

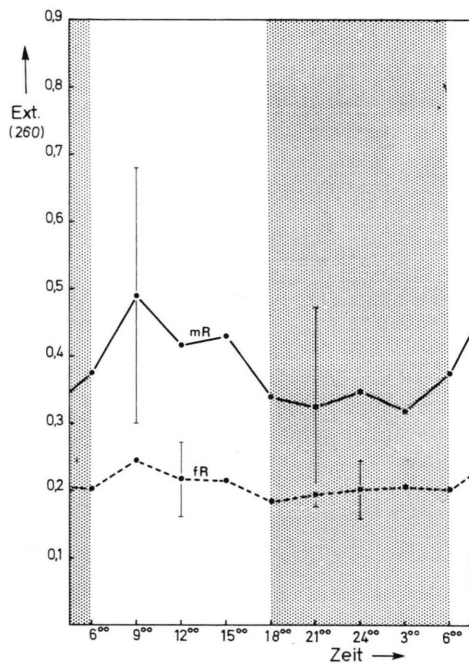


Abb. 2. Freie (---, fR) und membrangebundene (—, mR) Ribosomen nach einer Hungerzeit von 24 und 48 Std. Ord. und Absz. wie in Abb. 1.

Nach beiden Hungerperioden waren die Ergebnisse übereinstimmend (Abb. 2): Bei den freien Ribosomen liegen die Werte niedriger als bei den Kontrollen, weisen aber keinen Rhythmus auf; die Werte der gebundenen Ribosomen sind im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls etwas niedriger.

Insgesamt streuen die Werte so stark, daß keine weiteren Versuche unternommen wurden, und daher über die Existenz eines Rhythmus unter diesen Bedingungen keine Aussage gemacht werden kann.

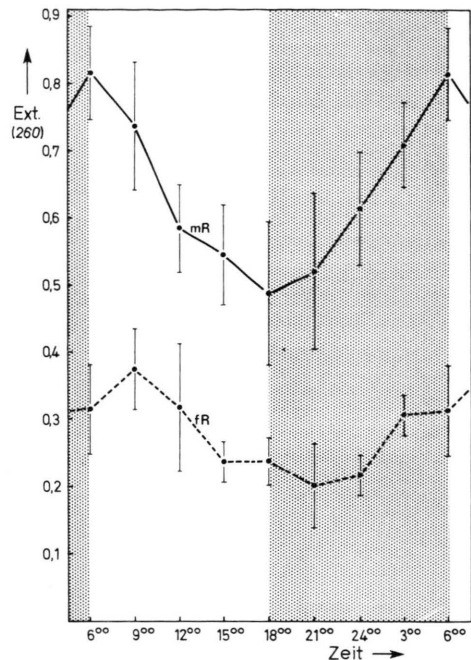


Abb. 3. Freie (---, fR) und membrangebundene (—, mR) Ribosomen jeheils 4 Std. nach der Injektion von 5 mg Hydrocortison auf 100 g Körpergewicht. Ord. u. Absz. wie Abb. 1.

2. Freie und gebundene Ribosomen nach Hydrocortisongabe (Abb. 3)

Außer den Nahrungsprodukten wird die Ribosomenbindung durch Corticosteroide beeinflusst, wie u. a. WILLIAMS u. Mitarb.²⁰⁻²¹ sowie JAMES u. Mitarb.²⁶ nachgewiesen haben. Aus diesem Grunde habe ich zunächst die tageszeitlichen Schwankungen der freien und gebundenen Ribosomen unter der Einwirkung von Hydrocortison untersucht. Vier Stunden vor der Tötung wurde den Tieren 5 mg Hydrocortison auf 100 g Körpergewicht *i. p.* injiziert. Hydrocortison, das als Succinat vorlag, wurde dabei in physiologischer NaCl-Lösung durch Zugabe von NaOH gelöst. Die Tiere blieben nach der Injektion bei den Ratten, die nicht injiziert wurden. Die Werte zu jedem Zeitpunkt ist das Mittel aus der Analyse von 12 Tieren.

Bei diesen Versuchen zeigt sich ein deutlicher Rhythmus der gebundenen Ribosomen, der sein Maximum um 6⁰⁰ und sein Minimum um 18⁰⁰ hat. Er ist deutlich verschieden von den Kontrollen. Die freien Ribosomen weisen auch noch einen Rhythmus auf, der etwas

flacher als der Rhythmus bei den Kontrollen verläuft, von diesem statistisch aber nicht zu trennen ist. Eine Phasenverschiebung zwischen Kontrollen und injizierten Ratten tritt nicht ein. Die gebundenen Ribosomen weisen die gleiche Phasenlage wie die freien Ribosomen auf.

3. Freie und gebundene Ribosomen nach Corticosterongabe (Abb. 4)

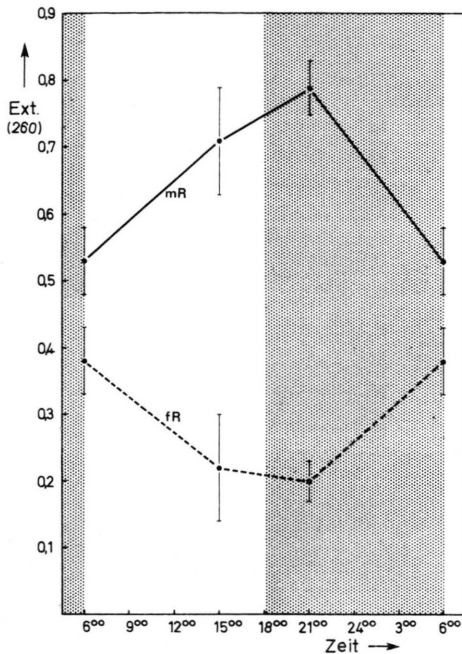


Abb. 4. Freie (---, fR) und membrangebundene (—, mR) Ribosomen jeweils 4 Std. nach der Injektion von 5 mg Corticosteron auf 100 g Körpergewicht. Ord. u. Absz. wie in Abb. 1.

Wie unter 2. wurde den Ratten 4 Std. vor dem Töten 5 mg Corticosteron auf 100 g Körpergewicht *i. p.* injiziert. Corticosteron, das als Acetat vorlag, ist in physiologischer NaCl unlöslich und muß daher in einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit einem Glaspistill suspendiert und als Suspension gespritzt werden. Die Aufnahme des Hormons im Körper prüfte ich an der Steigerung der Tyrosinaminotransferaseaktivität³³⁻³⁴ durch den Enzymtest nach DIAMONDSTONE³⁰. Die Werte der Ribosomenkonzentration zu jedem Zeitpunkt ist das Mittel von neun Tieren, während der Enzymtest an jeweils drei Tieren vorgenommen wurde.

Die entgegengesetzte Wirkung von Hydrocortison und Corticosteron, die JAMES u. Mitarb.²⁶ beschreiben, kann in bezug auf die Bindungsverhältnisse der Ribosomen bestätigt werden. Corticosteron bewirkt zu den getesteten Zeitpunkten in den gebundenen Ribosomen einen entgegengesetzten Rhythmus wie Hydrocortison. Die Phasendifferenz zu dem durch Hydrocortison induzierten Rhythmus beträgt bei den gebundenen Ribosomen also 12 Std. Eine Änderung der freien Ribosomen gegenüber den Kontrollen und Hydrocortison ist nicht festzustellen.

4. RNA-Protein-Verhältnis

Es schien nun interessant zu untersuchen, welche Faktoren für die tagesrhythmischen und hormoninduzierten Änderungen der Ribosomen verantwortlich sein könnten. Einen Hinweis darauf kann man von der Analyse des RNA-Protein-Verhältnisses bei freien und gebundenen Ribosomen im Laufe von 24 Std. erwarten und von den möglichen Änderungen durch Behandlung mit Hormonen. Dazu habe ich jeweils an zwei Tageszeiten den RNA- und Proteinanteil der isolierten Ribosomen von je acht Tieren bestimmt.

Tab. I. Prozentuale Verteilung von RNA und Protein auf die Ribosomen.

		gebundene Ribosomen		freie Ribosomen	
		RNA [%]	Prot. [%]	RNA [%]	Prot. [%]
Kontr.	6 ⁰⁰	31	69	32	68
	18 ⁰⁰	32	68	45	55
Hydroc.	6 ⁰⁰	26	74	27	73
	18 ⁰⁰	26	74	35	65

Die in Tab. I aufgeführten Ergebnisse lassen sich in zwei Punkte zusammenfassen:

- das Verhältnis RNA-Protein ist bei den freien Ribosomen über den Tag nicht konstant, sondern weist ein Maximum am Abend auf; dabei sinkt der Proteinanteil.
- der Proteinanteil wird durch Hydrocortison etwas vergrößert, wobei auch eine Tagesrhythmik bei den freien Ribosomen zu erkennen ist.

Diskussion

Tageszeitliche Unterschiede in dem Anteil von glattem und rauhen ER sind in einigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen von MÜLLER u. Mitarb.³⁵, ROHR u. Mitarb.³⁶ sowie CHEDID und NAIR³⁷ beobachtet worden. Die Ergebnisse stimmen aber nur zum Teil überein. Während Müller und Chedid beim glatten ER tagsüber geringere Mengen fanden als nachts, konnte Rohr keine Unterschiede feststellen. Für das rauhe ER fand Müller am Tag größere Werte als in der Nacht, Rohr entnimmt seinen Ergebnissen das Gegenteil, und Chedid erhält gleich große Werte. Diese Unterschiede in den Ergebnissen mögen teilweise auf die histologischen Untersuchungsmethoden zurückzuführen sein, die auf dem Vergleich relativ weniger Zellen beruhen. Wie nämlich aus der Arbeit von MÜLLER u. Mitarb.³⁵ hervorgeht, bestehen drastische Unterschiede zwischen einzelnen Leberzellen. Mit Hilfe biochemischer Methoden ist von FISHMAN u. Mitarb.³² ein Tagesrhythmus der Menge der Polysomen, die aus mehr als zwei Ribosomen bestehen, beschrieben worden. Das Maximum der Ribosomenaggregation wird gegen 22⁰⁰ erreicht. Diese Befunde stehen nicht im Widerspruch zu den hier gefundenen Ergebnissen, bei denen kein Tagesrhythmus in der Menge der gebundenen Ribosomen, sondern nur in der Menge der freien beobachtet wird.

Proteine wie die Tyrosinaminotransferase oder säureunlösliche Serumfraktionen, die an gebundenen Ribosomen synthetisiert werden, weisen einen charakteristischen Tagesrhythmus in ihrer Aktivität bzw. Syntheserate auf¹⁻². Das Maximum wird dabei in der ersten Hälfte der Dunkelzeit erreicht, ein Zeitpunkt, der mit dem Maximum der gebundenen Polysomen³² und dem relativen Überwiegen der gebundenen Ribosomen in meinen Untersuchungen übereinstimmt. Außer dem abendlichen Maximum tritt in der säurelöslichen Fraktion der Serumproteine ein morgendliches Maximum der Markierung auf, das möglicherweise mit einem zweiten Proteinsynthesemaximum am Morgen in Verbindung zu bringen ist, wie es auch in Untersuchungen von BECKMANN³⁸ über den Einbau von ³H-Tryptophan zu beobachten ist. Dieses Maximum könnte mit dem hier beschriebenen Maximum der freien Ribosomen zwischen 3—6⁰⁰ zusammenhängen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Proteine, die nur an freien Ribosomen synthetisiert werden wie z. B. Ferritin, ein Synthesemaximum am Morgen zeigen.

Der Bindungsmechanismus zwischen Ribosomen und

Membran ist noch nicht eindeutig klar. WILLIAMS u. Mitarb.²⁰⁻²¹ berichten von der Existenz eines Enzyms, das die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysiert, die wiederum die Bindung der Ribosomen an die Membran beeinflussen. Auf dieses Enzym scheinen Steroidhormone einen besonders fördernden Einfluß zu haben^{26-27,39}. Ein Vergleich der physiologischen Corticosteronkonzentration (Kurve C in Abb. 5) mit dem

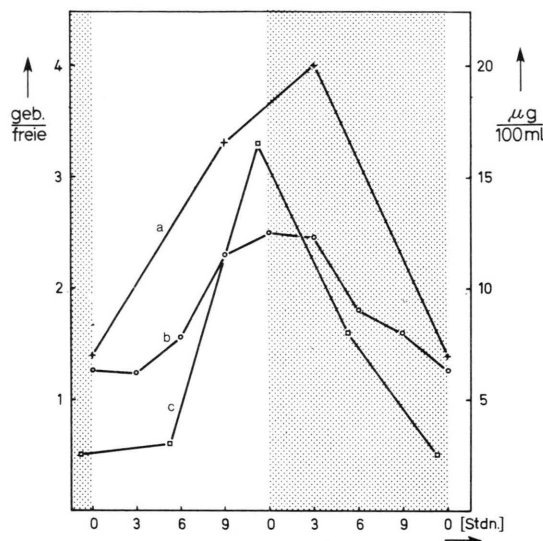


Abb. 5. Vergleich: Kurve a, Verhältnis gebundene/freie Ribosomen nach Corticosteroninjektion +; Kurve b, Verhältnis gebundene/freie Ribosomen bei unbehandelten Tieren; Kurve c, physiologische Corticosteronkonzentration in µg/100 ml Serum bei männlichen Ratten (Literaturwerte von DIXIT und BUCKLEY⁴⁰).

Verhältnis gebundener zu freien Ribosomen (Kurve B in Abb. 5) läßt den Einfluß deutlich werden. Im Zusammenhang damit ist auch die verstärkte Bindung von Ribosomen nach Corticosteroninjektion zu sehen. In Abb. 5 wird das Verhältnis gebundener zu freien Ribosomen von corticosteronbehandelten Tieren (Kurve A) mit unbehandelten Tieren (Kurve B) verglichen. Auffallend ist, daß die Wirkung zur Zeit des physiologischen Corticosteronmaximums am größten ist, während zur Zeit des Minimums zusätzliches Hormon keine oder nur geringe Förderung der Bindung bewirkt. Man könnte daher Empfindlichkeits- oder Konzentrationsschwankungen der Hormonrezeptoren annehmen, die mit dem Rhythmus der Hormonkonzentration in Phase verlaufen. Die unter normalen Bedingungen zu beobachtende Zunahme von gebundenen Ribosomen auf Kosten freier Ribosomen und die gleich-

zeitige Abnahme der Ribosomenmenge während des Abends könnte man durch folgende Annahme interpretieren: Einmal werden neusynthetisierte Ribosomen unter der Wirkung des Corticosteron gebunden, zum anderen werden mehr Ribosomen (freie und/oder gebundene) abgebaut. Ein verstärkter Abbau wird auch durch die Verringerung des Proteingehaltes der Ribosomen zu diesem Zeitpunkt nahegelegt.

Der Rhythmus der Ribosomen hängt aber nicht nur von der Degradation ab, sondern wahrscheinlich auch von der Synthese ribosomaler Vorläufer, deren Reifung zum aktiven Ribosom und dem Transport vom Kern in das Zytoplasma. Nach den Befunden von DÖRING und RENSING⁴¹ liegt das Maximum der ribosomalen RNA Synthese im Kern am Anfang der Dunkelperiode

und wahrscheinlich ein Maximum der Transportrate von RNA aus dem Kern in das Zytoplasma am Anfang der Hellphase. Einen stimulierenden Einfluß auf einen oder mehrere dieser Schritte hat möglicherweise das zweite untersuchte Glucocorticoid: Die Injektion von Hydrocortison führt zu einer deutlichen Steigerung der Gesamtmenge an Ribosomen in der Zeit zwischen 3 und 9⁰⁰. Da Hydrocortison in der Ratte normalerweise nicht gebildet werden soll, ist die physiologische Bedeutung dieses Effektes nicht klar, zumal sich hier Hydrocortison in seiner Wirkung von Corticosteron, mit dem es in vieler Hinsicht gleichgerichtet wirkt, deutlich unterscheidet. Entsprechende Befunde über eine unterschiedliche Wirkung auf Ribosomen liegen auch von anderer Seite vor²⁶.

- ¹ R. HARDELAND, DORIS HOHMANN u. L. RENSING, J. interdiscipl. Cycle Res., im Druck.
- ² A. V. LEBOUTON u. S. D. HANDLER, FEBS letters 10, 78 [1970].
- ³ A. V. LEBOUTON u. S. D. HANDLER, Experientia [Basel] 27, 1031 [1971].
- ⁴ L. E. SCHEVING, J. E. PAULY u. TIEN-HU TSAI, Amer. J. Physiol. 215, 1096 [1968].
- ⁵ PH. SIEKEVITZ u. G. E. PALADE, J. biophysic. biochem. Cytol. 7, 619 [1960a].
- ⁶ M. S. C. BIRBECK u. E. H. MERCER, Nature [London] 189, 558 [1961].
- ⁷ M. C. GANOZA u. C. A. WILLIAMS, Proc. nat. Acad. Sci. USA 63, 1370 [1969].
- ⁸ M. C. REDMAN, J. biol. Chemistry 244, 4308 [1969].
- ⁹ P. GAYE u. R. DENAMUR, Biochem. biophysic. Res. Commun. 41, 266 [1970].
- ¹⁰ J. K. CHRISTMAN u. J. GOLDSTEIN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 217, 346 [1970].
- ¹¹ M. TAKAGI u. K. OGATA, Biochem. biophysic. Res. Commun. 33, 55 [1968].
- ¹² M. TAKAGI, T. TANAKA u. K. OGATA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 217, 148 [1970].
- ¹³ J. DAILLIE, FEBS letters 13, 321 [1971].
- ¹⁴ D. A. SHAFRITZ u. K. J. ISSELBACHER, Biochem. biophysic. Res. Commun. 46, 1721 [1972].
- ¹⁵ CH. CHUAH u. I. T. OLIVER, Biochemistry 10, 2990 [1971].
- ¹⁶ B. R. FRIDLENDER u. F. O. WETTSTEIN, Biochem. biophysic. Res. Commun. 39, 247 [1970].
- ¹⁷ PH. SIEKEVITZ u. G. E. PALADE, J. biophysic. biochem. Cytol. 7, 631 [1960].
- ¹⁸ D. D. SABATINI, Y. TASHIRO u. G. E. PALADE, J. molecular Biol. 19, 503 [1966].
- ¹⁹ H. DAVID u. I. UERLINGS, Acta biol. med. german. 25, 343 [1979].
- ²⁰ D. J. WILLIAMS, D. GURARI u. B. R. RABIN, FEBS letters 2, 133 [1968].
- ²¹ D. J. WILLIAMS, FEBS letters 4, 103 [1969].
- ²² G. BLOBEL, J. molecular Biol. 26, 293 [1967b].
- ²³ H. C. PITOT u. C. PERAINO, Biochem. Clinics 3, 139 [1964].
- ²⁴ A. ARONSON, J. molecular Biol. 15, 505 [1966].
- ²⁵ W. CHEFRUKA u. Y. HAYASHI, Biochem. biophysic. Res. Commun. 24, 633 [1966].
- ²⁶ D. W. JAMES, B. R. RABIN u. D. J. WILLIAMS, Nature [London] 224, 371 [1969].
- ²⁷ R. J. MAYEVSKI u. G. LITWACK, Biochem. biophysic. Res. Commun. 37, 729 [1969].
- ²⁸ G. BLOBEL u. VAN R. POTTER, J. molecular Biol. 26, 279 [1967a].
- ²⁹ J. C. PRUDHOMME, M. GUELIN, L. GASSET u. J. DIALLE, Exptl. Cell Res. 63, 373 [1970].
- ³⁰ T. I. DIAMONDSTONE, Anal. Biochem. 16, 395 [1966].
- ³¹ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 [1951].
- ³² B. FISHMAN, R. J. WURTMAN u. H. N. MUNRO, Proc. nat. Acad. Sci. USA 64, 677 [1969].
- ³³ E. C. C. LIN u. W. E. KNOX, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 26, 85 [1957].
- ³⁴ F. T. KENNEY, Adv. Enzyme Reg. 1, 137 [1963].
- ³⁵ O. MÜLLER, C. JERUSALEM u. H. VON MAYERSBACH, Z. Zellf. 69, 438 [1966].
- ³⁶ H. P. ROHR, A. C. HUNDSTAD, L. BIANCHI u. H. ECKERT, Acta anat. 76, 102 [1970].
- ³⁷ A. CHEDID u. V. NAIR, Science [Washington] 175, 176 [1972].
- ³⁸ J. BECKMANN, unveröfftl. Untersuchungen.
- ³⁹ A. ROOBL u. B. R. RABIN, FEBS letters 14, 165 [1971].
- ⁴⁰ B. N. DIXIT, J. B. BUCKLEY, Life Sci. 6, 755 [1967].
- ⁴¹ R. DÖRING u. L. RENSING, Comparat. Biochem. Physiol., im Druck.