

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 273—277, Mai 1970

Untersuchungen am ribosomalen Ferritin normaler, cirrhotischer und carcinomatöser menschlicher Lebern

Von W. DOMSCHKE, J. G. MEYER-BERTENRATH, D. DEMMER und G. F. DOMAGK

*Aus der Abteilung für Enzym-Chemie des Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität Göttingen
und dem Zentrallaboratorium des Stadtkrankenhauses Hanau*

(Eingegangen am 5. Dezember 1969)

Es wird über die Isolierung einer ribosomalen Chromoproteidfraktion aus normalen, cirrhotischen und carcinomatösen menschlichen Lebern berichtet; diese Fraktion läßt sich als Ferritin klassifizieren. Das als integrierender Ribosomenbestandteil aufzufassende ribosomale Ferritin zeigt je nach Ursprung aus normalen oder pathologisch veränderten Lebern Unterschiede in seinem Eisengehalt und seiner Eiweißstruktur, die sich in Form von Veränderungen seines diskelektrophoretischen Verhaltens, seines Molekulargewichtes und seiner Aminosäurezusammensetzung nachweisen lassen.

Studies on the ribosomal ferritin from normal, cirrhotic and cancerous human livers

The isolation of a ribosomal chromoprotein fraction from normal, cirrhotic and cancerous human liver is described. This fraction was characterized as a ferritin. The ferritin, which is considered to be an integrating component of ribosomes, shows changes in iron contents and protein structure, depending on its origin from normal or pathological livers. The differences in protein structure were shown by polyacrylamide gel electrophoresis, molecular weight determination and amino acid analysis.

Bei Untersuchungen an Rattenleberribosomen gelang durch Gelfiltration an Sepharose in einem EDTA-haltigen Puffermilieu die schonende Darstellung eines ribosomalen Chromoproteidanteiles, der als besondere Ferritinfraktion gekennzeichnet (1) und dessen Beteiligung am Aufbau intakter Rattenleberribosomen und ihrer Untereinheiten durch diskelektrophoretische Analysen deutlich gemacht werden konnte (2). Diese ribosomale Ferritinfraktion unterliegt charakteristischen Veränderungen im Rahmen der experimentellen, durch die hepatotropen Substanzen N-Nitrosomorpholin, Diäthyl-nitrosamin oder Thioacetamid induzierten Carcinogenese (3, 4).

In der vorliegenden Arbeit wird über die Präparation des ribosomalen Ferritins aus menschlicher Leber berichtet; außerdem werden seine unterschiedlichen Eigenschaften je nach Ursprung aus normaler, cirrhotischer und carcinomatöser Leber dargestellt.

Material und Methoden

Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen wurden an menschlichen Lebern durchgeführt, die dankenswerterweise vom Pathologischen Institut der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. J. LINZBACH) beurteilt und zur Verfügung gestellt wurden. Ribosomenpräparationen wurden an normalem Lebergewebe und an Lebern vorgenommen, bei denen die histologische Diagnose „progrediente Lebercirrhose“ bzw. „primäres hepatozelluläres Leber-Carcinom“ gestellt worden war.

Ribosomenpräparation

Die Ribosomenpräparation aus menschlichem Lebergewebe wurde in Anlehnung an die von KORNER (5) angegebene Methodik durchgeführt. Dabei wurde die Lebern in 0,25M Saccharose enthaltendem 0,05M Tris-Puffer, pH 7,6, 0,025M KCl, 0,005M Tris-Puffer, pH 7,6, 0,025M KCl, 0,005M MgCl₂ („LK-Puffer“ (6)) homogenisiert (Potter-Elvehjem-Homogenisator) und an-

schließend bei 12500 U./Min. (20000 g) 15 Min. zentrifugiert (Spinco-Ultrazentrifuge, L 2 65, Rotor 30, Fa. Beckman Instruments, München).

Der Überstand wurde mit 1/9 seines Volumens frisch bereiteter 5proz. Na-Desoxycholat-Lösung in 0,03M Tris-Puffer, pH 8,2, (5) versetzt und die durch Na-Desoxycholat-Zusatz aus der Mikrosomenfraktion freigesetzten Ribosomen durch 60 Min. Zentrifugation bei 65000 U./Min. sedimentiert, an Sephadex G-200 (Säule 3 x 50 cm, LK-Puffer-Milieu) durch Gelfiltration gereinigt und durch erneutes 60 Min. Zentrifugieren bei 65000 U./Min. gewonnen. Die Menge der erhaltenen Ribosomen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt (7).

Präparation der ribosomalen Ferritinfraktion

Suspensionen gereinigter Ribosomen (s. o.) wurden auf eine Sepharose-4B-Säule (2,5 x 150 cm) aufgetragen und in einem 0,004M EDTA-haltigen (8) Puffermilieu filtriert (0,05M Tris-Puffer pH 7,6, 0,025M KCl, 0,005M EDTA). Die Extinktion des Eluates bei 254 nm wurde laufend registriert (Durchflußphotometer Uvicord der Fa. LKB, Stockholm). Die im Eluat auftretenden Fraktionen I und II wurden 100 Min. bei 65000 U./Min. zentrifugiert. Die nicht wie im Falle der Fraktion I kompakt sedimentierte Fraktion II (ribosomale Ferritin-Fraktion) wurde anschließend durch Chromatographie an Sephadex G-25 coarse (Säule 1,5 x 20 cm) entsalzt und dann lyophilisiert. So präpariertes ribosomales Ferritin ließ sich in trockener Form bei 4° über Monate ohne feststellbare Veränderungen aufbewahren. Alle beschriebenen Manipulationen wurden im Kühlraum bei 4° durchgeführt.

Analytische Methoden

Proteinbestimmungen erfolgten nach der Biuret-Methode (9). *RNA-Bestimmungen* wurden mit der Orcin-Methode mit gereinigter Hefe-RNA als Standard durchgeführt (10). Das *Ferritineisen* ließ sich nach dem von DRYSDALE und MUNRO (11) angegebenen modifizierten Bipyridyl-Verfahren quantitativ erfassen. Zur Durchführung der *Diskelektrophorese* verwandten wir das von WILLIAMS und REISFELD (12) angegebene Gelsystem. Acrylamid liegt dabei in einer Konzentration von 7,5% vor. Die Elektrophorese lief 2,5 Stdn. bei einer Stromstärke von 3 mA pro Gelröhrchen. Die Anfärbung der diskelektrophoretisch getrennten Proteine erfolgte mit Amidoschwarz 10 B (1% in 7proz. Essig-

säure). RNA wurde mit einer von PEACOCK und DINGMAN (13) angegebenen Methyleneblaulösung färberisch dargestellt. Nach einem von ORNSTEIN (14) entwickelten Verfahren ließ sich mit 2,4-Dinitrosonaphthalin-1,3-diol eine spezifische Eisenfärbung durchführen.

Die densitometrische Auswertung der Diskelektropherogramme erfolgte bei 578 nm mit dem Scanner der Firma Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

Hochspannungselektrophoresen des ribosomalen Ferritins wurden mit dem High Voltage Electrophorator GME der Firma Gilson Medical Electronics France durchgeführt. Dabei wurde das in Wasser gelöste Eisenprotein auf Chromatographiepapier (90 × 10 cm; Bögen der Nr. 2316, Firma Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Pyridinacetat pH 4,7 (100 ml Pyridin + 100 ml Eisessig + 7,8 l Wasser) über 90 Min. bei 3000 V. Zur Färbung wurde eine Lösung von 0,3% Ninhydrin in Aceton verwandt.

Molekulargewichtsbestimmungen wurden durch Gelfiltration über Sephadex G-200 vorgenommen (Säulenmaße 1,5 × 29 cm; 0,05M Tris-Puffer, pH 7,5/0,1M KCl; Eichsubstanzen s. Abb. 5). Für die **Aminosäureanalysen** stand uns der Aminosäureanalysator Unicrom der Firma Beckman Instruments, München, zur Verfügung.

Proteinhydrolysen wurden durch 21stdg. Erhitzen der mit 6N HCl im Vakuum eingeschmolzenen Proben erreicht; die anschließende Entfernung der Salzsäure erfolgte mit dem Schüttelevaporator Frequentax der Firma E. Schütt jun., Göttingen.

Cysteinbestimmungen wurden nach Oxydation des Eisenproteids mit Perameisensäure (15) und anschließender HCl-Hydrolyse im Aminosäureanalysator durchgeführt.

Tryptophan wurde nach der spektrophotometrischen Methode von BARMAN und KOSHLAND (16) bestimmt.

Ergebnisse

Ribosomales Ferritin aus normaler menschlicher Leber

Die Chromatographie von gereinigten Ribosomen-suspensionen über Sepharose 4B in EDTA-haltigem Puffermilieu ergibt, wie in Abbildung 1 dargestellte

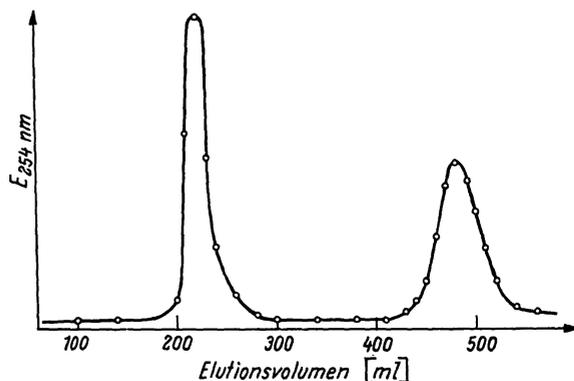


Abb. 1

Elutionsdiagramm bei Chromatographie von menschlichen Leberribosomen in EDTA-haltigem Puffer (s. Methodik) an Sepharose-4B (Säule 2,5 × 150 cm; Fließgeschwindigkeit: 0,25 ml/Min.). Aufgegeben wurden Ribosomen entsprechend einer Extinktion bei 260 nm von 600,0. Der zuerst von der Säule eluierte Peak wird im Text Fraktion I, der folgende Fraktion II genannt

Elutionsbild. Die im Eluat erscheinenden Fraktionen I und II wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und dann analysiert.

Fraktion I

In der farblosen Fraktion I läßt sich RNA (4,4 mg/ml) und Protein (7,2 mg/ml), nicht jedoch Eisen nachweisen.

Der sich aus diesen Daten ergebende RNA/Protein-Quotient von 0,61 ist deutlich kleiner als der von uns für die entsprechende Fraktion aus Rattenleberribosomen bestimmte Wert von 0,91 (1). Möglicherweise ist diese relative Abnahme des RNA-Anteiles in dieser Fraktion menschlicher Ribosomen durch RNase-Wirkung in dem verwendeten Sektionsgut bedingt. In der Fraktion I lassen sich auch bei diskelektrophoretischer Analyse in Polyacrylamidgel durch positive Färbung mit Amidoschwarz 10B wie auch mit der Methyleneblaulösung nach PEACOCK und DINGMAN (13) Proteine und RNA nachweisen. Diese Befunde werden in einer gesonderten Mitteilung dargestellt werden, in der der in Fraktion I enthaltene Nucleoproteidanteil menschlicher Ribosomen näher charakterisiert wird.

Fraktion II

Die rostbraun gefärbte Fraktion II enthält Protein (5,4 mg/ml) und Eisen (1,4 mg/ml), RNA läßt sich nicht nachweisen. Der Eisengehalt von 20,6% (g/g) entspricht den von anderen Autoren für Ferritin angegebenen Werten (17–19). Abbildung 2 zeigt das

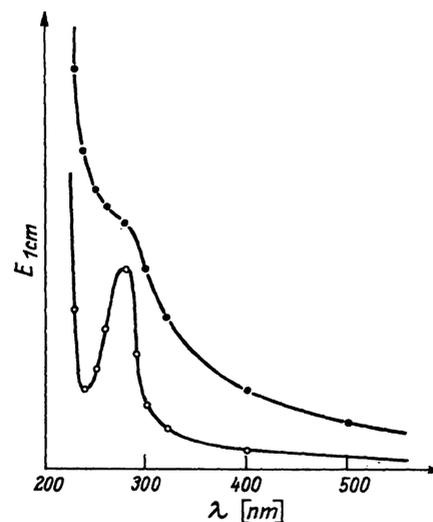


Abb. 2

Absorptionsspektrum der Fraktion II (Chromoprotein, —●—, 5 mg/ml) und ihrer durch Natriumdithionit (0,22 mg Na-Dithionit/mg Chromoprotein) reduzierten Form (—○—). Die Spektren entsprechen dem Ferritin bzw. Apoferritin

Absorptionsspektrum einmal der unbehandelten und dann der mit Natriumdithionit (20) bzw. Ascorbinsäure (21) reduzierten Fraktion II. Das für die nicht vorbehandelte Fraktion II dargestellte Spektrum ist nahezu identisch mit dem von DRYSDALE und MUNRO (11) veröffentlichten Ferritin-Spektrum. Die mit Natriumdithionit bzw. Ascorbinsäure behandelte Fraktion II zeigt das gleiche spektrale Verhalten wie Apoferritin: Ausbildung eines ausgeprägten Absorptionsmaximums bei 280 nm (11).

Molekulargewichtsbestimmungen durch Gelfiltration (Sephadex G-200) an der mit Natriumdithionit reduzierten Fraktion II ergaben Werte von 485000, die den von ROTHEN (22) für menschliches Apoferritin mitgeteilten Daten entsprechen.

Durch Zugabe von Cadmiumsulfat zur Fraktion II bis

zu einer Endkonzentration von 5% konnten wir die Ausbildung von kleinen braunen Kristallen mit abgerundeten Ecken anregen, die bei dieser Kristallisationsmethodik (19) als charakteristisch für menschliches Ferritin beschrieben werden (17, 23).

Nach diesen Befunden erscheint es gerechtfertigt, die Chromoproteidfraktion II als Ferritin zu klassifizieren. Bei Bestimmungen der Sedimentationskonstanten in der analytischen Ultrazentrifuge war ROTHEN (22) eine starke Heterogenität des Ferritins aufgefallen, die sich in der Ausbildung breitbasiger Gipfel bei der Sedimentation äußerte. Diese Heterogenität stellten auch wir bei Saccharose-Gradientenzentrifugation der Ferritinanteile von Rattenleberribosomen in Form pH-abhängiger Assoziation bzw. Dissoziation fest (1). Diese Befunde veranlaßten uns, mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese (90 Min.; 3000 V; 4°) eine Auftrennung des ribosomalen Ferritins aus menschlicher Leber zu versuchen. Unter diesen Bedingungen stellte sich jedoch das ribosomale Ferritin nur in Form einer einzigen, kathodisch wandernden Bande dar.

In weiteren Versuchen ließen wir nach Besetzung der SH-Gruppen des Ferritins durch Äthyleniminierung (24) nach dem Verfahren von RUTNER und LANE (25) Natriumdodecylsulfat auf das Eisenprotein einwirken und konnten bei anschließender Chromatographie an Sephadex G-200 im Eluat zwei Gipfel registrieren

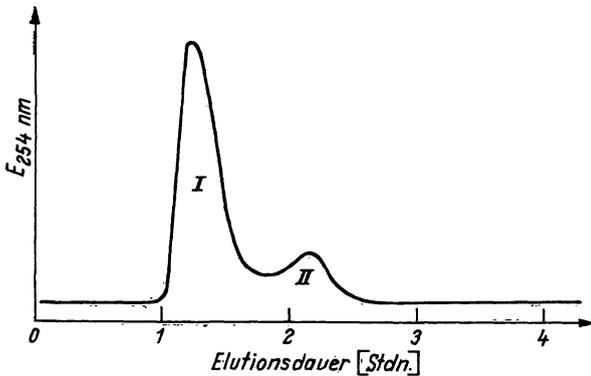


Abb. 3

Chromatographie des mit Natriumdodecylsulfat behandelten ribosomalen Ferritins an Sephadex G-200 (Säule: 1,5 x 25 cm; Fließgeschwindigkeit: 0,2 ml/Min.; Elutionspuffer: 0,03M Tris-HCl, pH 8,2, 0,1 mM EDTA, 0,5% Natriumdodecylsulfat)

(Abb. 3), während nicht vorbehandeltes ribosomales Ferritin als einheitliche Fraktion im Eluat erscheint. Die diskelektrophoretische Analyse der beiden nach Dodecylsulfat-Behandlung auftretenden Gipfelfraktionen ergibt Elektropherogramme, die dem in Abbildung 4 (oberes Diagramm) für intaktes Ferritin gezeigten Bild entsprechen. Ein Unterschied der beiden Fraktionen ist lediglich in dem in der 2. Fraktion mit 15% (g/g) deutlich geringeren Eisengehalt festzustellen (die 1. Fraktion enthält 24% (g/g) Eisen). Schließlich versuchten wir die Auftrennung des ribosomalen Ferritins durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel und konnten eine Dissoziation in vier Banden feststellen, von denen die am weitesten anodisch gewanderte am stärksten aus-

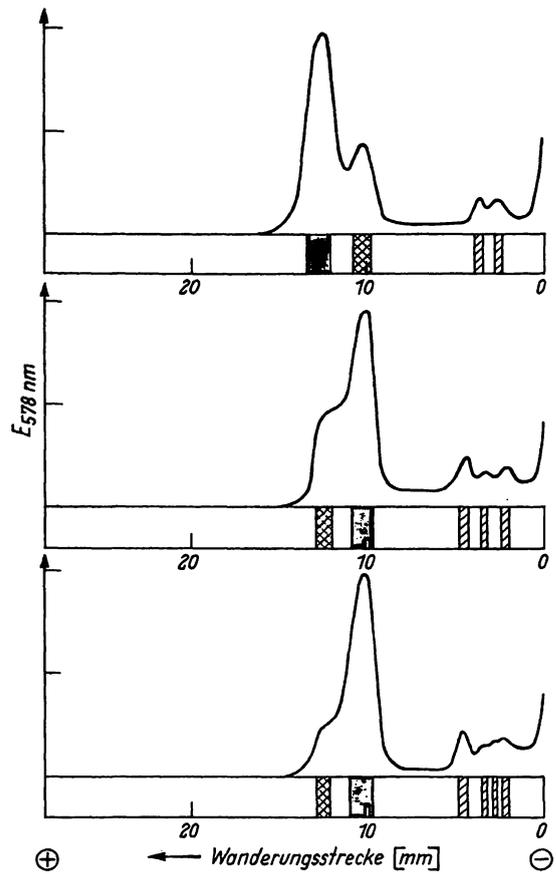


Abb. 4

Diskelektropherogramme und Densitogramme von ribosomalem Ferritin aus normalen (oberes Diagramm), cirrhotischen (mittleres Diagramm) und carcinomatösen (unteres Diagramm) menschlichen Lebern. Eingesetzt wurden jeweils 100 µg Chromoprotein. Amidoschwarzfärbung

■ = stark xx = mittelstark /// = schwach gefärbte Bande

geprägt ist (Abb. 4; oberes Diagramm). Das Bandenmuster ließ sich durch Eiweißfärbung mit Amidoschwarz 10B wie mit dem ORNSTEINSchen Eisenreagenz (14) in gleicher Weise darstellen, damit ist eine Kontamination durch Nicht-Ferritineiweiße ausgeschlossen.

Vergleich der ribosomalen Ferritinfraktionen aus normaler, cirrhotischer und carcinomatöser menschlicher Leber

Diskelektrophoretische Analysen der Ferritinfraktionen

Die diskelektrophoretischen Analysen der ribosomalen Ferritinfraktion aus normalen, cirrhotischen und carcinomatösen Lebern ergeben die in Abbildung 4 dargestellten Elektropherogramme und Densitogramme. Im Vergleich zum normalen ribosomalen Ferritin sind die Bandenmuster bei den Ferritinfraktionen aus pathologisch alterierten Lebern quantitativ und qualitativ verändert. Während sich beim Ferritin normaler menschlicher Leberribosomen mit der Protein- wie mit der Eisenfärbung vier Banden darstellen lassen, wobei die am weitesten anodisch gewanderte Bande am stärksten ausgeprägt ist, sind beim ribosomalen Ferritin aus cirrhotischen Lebern fünf Banden nachzuweisen, außerdem ist die quantitative Relation der beiden schneller anodisch wandernden Banden zugunsten der zweiten

Bande verschoben. Das ribosomale Ferritin aus primär carcinomatösen Lebern spaltet sich in sechs Banden auf, die Ausprägung der am weitesten anodisch gewanderten Bande ist noch stärker zugunsten der nächsten Bande zurückgegangen.

Eisengehalte der Ferritinfraktionen

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von Protein- und Eisenbestimmungen an den ribosomalen Ferritinfraktionen aus normalen, cirrhotischen und carcinomatösen menschlichen Lebern zusammengestellt. Danach nimmt der Eisengehalt des ribosomalen Ferritins aus carcinomatösen Lebern relativ zu den Normalwerten ganz erheblich ab. Eine Abnahme nicht so großen Ausmaßes erfolgt beim ribosomalen Ferritin aus cirrhotischen menschlichen Lebern. Diese Ergebnisse stimmen mit den von WÖHLER (26) und GRANICK (27) am cytoplasmatischen Leberferritin festgestellten Befunden überein.

Molekulargewichte der Apoferritinfraktionen

Molekulargewichtsbestimmungen wurden durch Gelfiltration an Sephadex G-200 durchgeführt (Abb. 5). Verwendet wurden die aus den jeweiligen ribosomalen

Tab. 1
Protein- und Eisengehalte der ribosomalen Ferritinfraktionen (r-F) normaler, cirrhotischer und carcinomatöser menschlicher Lebern

	Protein mg/ml	Eisen mg/ml	Eisengehalt % (g/g)
r-Fnormal	5,4	1,4	20,6
r-Fcirrhose	6,6	1,24	15,9
r-Fcarcinom	8,8	0,88	9,1

Ferritinfraktionen durch Natriumdithionit-Behandlung (20) entstehenden Apoferritine. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit den in der Legende zu Abbildung 5

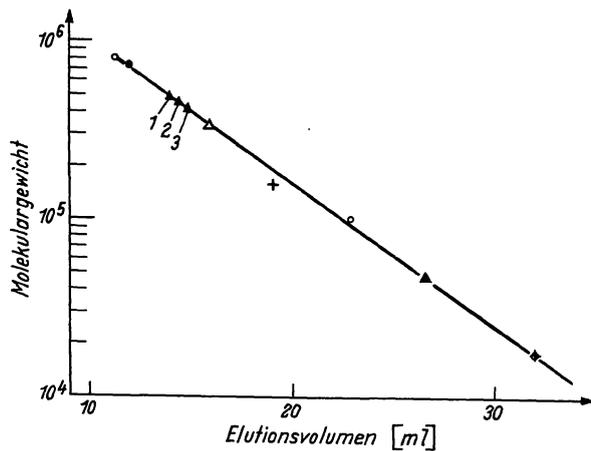


Abb. 5

Molekulargewichtsbestimmung der reduzierten Fraktion II (Apoferritin) durch Gelfiltration an Sephadex G-200 (Säule 1,5 x 29 cm; Puffer: 0,05M Tris-HCl, pH 7,5/0,1M KCl; Fließgeschwindigkeit: 0,54 ml/Min.)

- 1 = r-Apoferritin aus normaler,
- 2 = r-Apoferritin aus cirrhotischer,
- 3 = r-Apoferritin aus carcinomatöser Leber

Referenzproteine:

- ⊕ Myoglobin (MG = 17800)
- ⊙ Ovalbumin (MG = 45000)
- Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (MG = 104000)
- + Aldolase (MG = 150000)
- △ Fibrinogen (MG = 330000)
- Ferritin aus Pferdemiß (MG = 750000)

Das Ausschlußvolumen wurde mit Blue Dextran 2000 (○) bestimmt

Aminosäure	Mol As/Mol r-AF	
	absolut	graph. Vergleich
Lysin	777	[Hatched bar]
	739	
	778	
Histidin	276	[Hatched bar]
	264	
	156	
Arginin	389	[Hatched bar]
	352	
	374	
Asparaginsäure	419	[Hatched bar]
	264	
	187	
Threonin	113	[Hatched bar]
	70	
	93	
Serin	164	[Hatched bar]
	106	
	156	
Glutaminsäure	450	[Hatched bar]
	387	
	280	
Prolin	205	[Hatched bar]
	141	
	436	
Glycin	164	[Hatched bar]
	211	
	187	
Alanin	235	[Hatched bar]
	299	
	218	
Valin	72	[Hatched bar]
	105	
	125	
Methionin	82	[Hatched bar]
	80	
	72	
Isoleucin	70	[Hatched bar]
	93	
	471	
Leucin	510	[Hatched bar]
	311	
	102	
Tyrosin	123	[Hatched bar]
	93	
	92	
Phenylalanin	123	[Hatched bar]
	125	
	21	
Cystein	35	[Hatched bar]
	43	
	89	
Tryptophan	44	[Hatched bar]
	26	
	26	

Tab. 2
Aminosäurezusammensetzung der ribosomalen Apoferritinfraktionen (r-AF) aus normalen, cirrhotischen und carcinomatösen menschlichen Lebern. Angegeben ist der Bruttogehalt an Aminosäuren (As) in Mol pro Mol jeweiligen Apoferritins

- [Hatched bar] = r-Apoferritin aus normalen
- [Diagonal lines] = r-Apoferritin aus cirrhotischen
- [White box] = r-Apoferritin aus carcinomatösen Lebern

angegebenen Eichsubstanzen. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Molekulargewichte vom Apoferritin normaler über das cirrhotischer zum Apoferritin carcinomatöser Lebern hin geringfügig abnehmen.

Aminosäurezusammensetzung der Apoferritinfraktionen

In Tabelle 2 sind die Resultate der Aminosäureanalysen an ribosomalen Apoferritinfraktionen aus normalen, cirrhotischen und carcinomatösen Lebern zusammengefaßt. Die Apoferritine wurden durch Reduktion der jeweiligen ribosomalen Ferritinanteile mit Natriumdithionit (20) gewonnen. Im Apoferritin aus normalen menschlichen Lebern waren die Aminosäuren Lysin, Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Alanin am häufigsten vertreten (vgl. 18, 28). Unter den in Tabelle 2 aufgeführten Veränderungen der Aminosäurezusammensetzungen von Apoferritinen aus patho-

logisch veränderten Lebern war das Fehlen des Methionin beim Apoferritin carcinomatöser Lebern besonders auffällig.

Diskussion

Auch aus menschlicher Leber läßt sich — wie für Rattenleber bereits beschrieben (1) — durch Gelfiltration von Ribosomenpräparationen in EDTA-haltigem Milieu eine ribosomale Ferritinfraktion gewinnen. Bei cirrhotischen und carcinomatösen Lebern konnten Veränderungen der Eiweißstruktur dieses ribosomalen Eisenproteids in Form seines veränderten diskelektrophoretischen Verhaltens, Molekulargewichts und seiner veränderten Aminosäurezusammensetzung nachgewie-

sen werden. Wahrscheinlich wird durch Defektbildung im Eiweißgerüst der Apoferritine deren Eisenbindungsfähigkeit herabgesetzt, wodurch die von uns festgestellte Abnahme des Eisengehalts beim ribosomalen Ferritin aus cirrhotischen und carcinomatösen Lebern bedingt sein könnte. Ebenfalls erniedrigte Eisengehalte fanden WÖHLER (26) und GRANICK (27) beim cytoplasmatisch lokalisierten Ferritin cirrhotischer und carcinomatöser Lebern.

Inwieweit die dargestellten Veränderungen der Struktur des ribosomalen Ferritins in einem kausalen Zusammenhang mit der alterierten Ribosomenfunktion im Rahmen der Cirrhose und des Carcinoms menschlicher Leber stehen, müssen weitere Untersuchungen klären.

Literatur

1. MEYER-BERTENRATH, J. G. und W. DOMSCHKE, I. Mitteilung: Z. Naturforsch. (im Druck). — 2. DOMSCHKE, W. und J. G. MEYER-BERTENRATH, II. Mitteilung: Z. Naturforsch. (im Druck).
3. DOMSCHKE, W. und J. G. MEYER-BERTENRATH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1164 (1969). — 4. DOMSCHKE, W. und J. G. MEYER-BERTENRATH, Naturwissenschaften 56, 564 (1969).
5. KORNER, A., Biochem. J. 81, 168 (1961). — 6. LITTLEFIELD, J. W. und E. B. KELLER, J. biol. Chemistry 224, 13 (1957). — 7. MEYER-BERTENRATH, J. G. und H. WÜRZ, Z. Naturforsch. 22b, 1153 (1967). — 8. PETERMANN, M. L., The Physical and Chemical Properties of Ribosomes, S. 133 bzw. 138, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1964). — 9. BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE und G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953). — 10. MEJBAUM, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939). — 11. DRYSDALE, J. W. und H. N. MUNRO, Biochem. J. 95, 851 (1965). — 12. WILLIAMS, D. E. und R. A. REISFELD, Ann. N. Y. Acad. Sc. 121, 373 (1964). — 13. PEACOCK, A. C. und C. W. DINGMAN, Biochemistry, USA 6, 1818 (1967). —
14. ORNSTEIN, L., Eastman Organic Chemicals Informational I 20—1164. — 15. HIRS, C. H. W., J. biol. Chemistry 219, 611 (1956). — 16. BARMAN, T. E. und D. E. KOSHLAND, Jr., J. biol. Chemistry 242, 5771 (1967). — 17. LAUFBERGER, V., Bull. Soc. chim. biol., Paris 19, 1575 (1937). — 18. KUHN, R., A. SÖRENSEN und L. BIRKHOFFER, Ber. dtsh. chem. Ges. 73, 823 (1940). — 19. GRANICK, S., J. biol. Chemistry 146, 451 (1942). — 20. GRANICK, S. und L. MICHAELIS, J. biol. Chemistry 147, 91 (1943). — 21. BIELIG, H. J. und E. BAYER, Naturwissenschaften 42, 466 (1955).
22. ROTHEN, A., J. biol. Chemistry 152, 679 (1944). — 23. GRANICK, S., Chem. Reviews 38, 379 (1946). — 24. RAFTERY, M. A. und R. D. COLE, Biochim. Biophys. Res. Commun. 10, 467 (1963).
25. RUTNER, A. C. und U. D. LANE, Biochim. Biophys. Res. Commun. 28, 531 (1967). — 26. WÖHLER, F. in W. KEIDERLING: Eisenstoffwechsel, S. 169—186, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959). — 27. GRANICK, S., J. biol. Chemistry 149, 157 (1943). — 28. GABRIO, B. W. und G. TISHKOFF, Science (Lancaster, Pa.) 112, 358 (1950).

Dr. W. Domschke
34 Göttingen
Physiolog.-Chem. Institut
Humboldtallee 7