

Zur Wirkungsspezifität der Serumfaktoren S1 und S2

Stimulation of Embryonic Rat Cells in Culture by Calf Serum, VIII
Specificity of Serum Factors S1 and S2

W. Frank, H.-J. Ristow und J. Veser

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, Tübingen

(Z. Naturforsch. **29 c**, 169–173 [1974] ; eingegangen am 14. Dezember 1973)

Rat Fibroblasts, Growth Stimulation, Serum Factors, Specificity

Embryonic rat fibroblasts which have been stopped in G_1 by incubation in serum-free medium can be triggered to proceed through their cell cycle by the serum proteins S1 and S2. To determine the specificity of these serum factors, a wide variety of compounds have been tested: Proteolytic and lipolytic enzymes, hormones, serum proteins, prostaglandins etc. Slight effects could be detected with α_2 -Macroglobulin-Schultze and Prostaglandin F_{2a} in combination with insulin. Stimulation of the cells comparable to that obtained with S1 can be achieved by treating the cells for 10 min with low concentrations of trypsin followed by incubation in serum-free medium containing insulin. The effect of trypsin can be completely abolished by soybean trypsin inhibitor.

Sekundärkulturen embryonaler Rattenfibroblasten häufen sich in der G_1 -Phase der Zellzyklus an, wenn sie in serumfreiem Medium inkubiert werden¹. Durch Zugabe von Serum oder der Serumfaktoren S1 und S2² können die Zellen wieder zum Wachstum stimuliert werden; sie beginnen dann nach 8–10 Stunden mit der DNA-Synthese, erreichen das Maximum nach 18–21 Stunden und gelangen nach Durchlaufen der S- und G_2 -Phase in die Mitose.

In den letzten Jahren sind viele ruhende Zellsysteme beschrieben worden, bei denen durch spezifische und unspezifische Stimuli die Zellen aktiviert werden können. Ein gut untersuchtes Beispiel sind die konfluenten, „kontaktgehemmten“ Kulturen. BHK, 3T3 und viele andere Zellstämme besitzen unter optimalen Wachstumsbedingungen eine charakteristische Sättigungsdichte. Nach Erreichen dieser Dichte nimmt die Zahl der DNA-synthetisierenden Zellen ebenso wie der Mitoseindex stark ab, und es werden nur noch absterbende Zellen durch neue ersetzt. Von Todaro u. Mitarb.³ war beschrieben worden, daß dicht gewachsene Kulturen von 3T3-Zellen durch Serumzusatz zu einer neuen Zellzyklusrunde mit DNA-Synthese und nachfolgender Mitose angeregt werden können. Nach neueren Befunden können der Zusatz von Insulin⁴ oder die Behandlung der Zellen mit RNase und Hyaluronidase⁵ dieselbe

Wirkung ausüben. Über die Wirkung von Proteasen wurden unterschiedliche Ergebnisse berichtet^{6–8}.

Ruhende Lymphozyten können durch eine Reihe unspezifisch wirkender Substanzen zur DNA-Synthese angeregt werden; hierunter finden sich auch Adrenalin⁹, Prostaglandin E_1 ¹⁰, Poly-L-Lysin¹¹ und Natriumperjodat¹². Bei isolierten Fettzellen wirkt eine kurzzeitige Inkubation mit Phospholipase C ebenso wie Insulin aktivierend auf den Glukose- und Aminosäure-Stoffwechsel¹³.

Auch für „normale“ Säugetierzellen (Zellen mit diploidem Chromosomensatz und zeitlich begrenztem Wachstum) in Kultur wurden viele Substanzen beschrieben, die in bezug auf die Anregung der Zellen zu kontinuierlichem Wachstum Serum ersetzen können (Zusammenfassung ref. 14). Eine davon ist das α_2 -Makroglobulin-Schultze¹⁵, das durch Dextran oder Ficoll substituiert werden kann und in Verbindung mit dem α_1 -sauren Glycoprotein bei embryonalen Mauszellen maximal aktiv ist¹⁶. Dieses α_2 -Makroglobulin wurde als Zinkprotein identifiziert¹⁷; Zinkmangel aber kann das Wachstum bestimmter Zelltypen in Kultur hemmen¹⁸.

Als Haftungs- und Ausbreitungsfaktor wurde Carbamylphosphat identifiziert, das an ein α -Globulin des Serums angeheftet ist¹⁹. Weiterhin wurde kürzlich Putrescin als wachstumsstimulierender Faktor aus konditioniertem Medium isoliert²⁰. Dieses biogene Amin wird von menschlichen Fibroblasten in Zellkultur produziert und ins Medium abgegeben.

Es stellte sich nun die Frage, ob nicht irgendwelche anderen Substanzen — abgesehen von den Serumproteinen S1 und S2 — die embryonalen Rattenfibroblasten ebenfalls in der G_1 -Phase zu triggern vermögen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Anzahl verschiedenartiger Verbindungen auf ihre wachstumsstimulierende Wirkung hin untersucht.

Material und Methoden

Zellkulturen

Primärkulturen embryonaler Rattenfibroblasten wurden von der Extremitäten- und Rückenmuskulatur 19 Tage alter Embryonen angelegt²¹. Die Zellen wurden in Roux-Flaschen in einem modifizierten Eagle-Medium²² unter Zusatz von 10 Prozent Kälberserum gezüchtet und alle 2–3 Tage passagiert. Für die Experimente wurden die Zellen der ersten bis dritten Passage in Falcon-Plastik-Kulturschälchen (60·15 mm; 5,0 ml Medium) in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Schälchen angezüchtet.

Einbau von [3H]Thymidin

Die Zellen wurden einen Tag nach dem Anzüchten in den Kulturschälchen für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert, um sie in der G_1 -Phase anzusammeln. Dann wurde das Medium abgesaugt und frisches, serumfreies Eagle-Medium zupipettiert, in dem die zu testenden Substanzen gelöst waren; die Kontrollen erhielten Medium mit 10 Prozent Kälberserum. Nach 21 Stunden wurde Methyl[3H]Thymidin (1,0 μ Ci/ml Medium; spez. Akt. 5 Ci/mmol; Amersham UK) zugegeben, das Medium nach 60 min abgegossen und der Zellrasen mit 3,0 ml kalter, 7-prozentiger TCA-Lösung fixiert. Die Zellen wurden mit einem Gummiwischer abgekratzt, auf Sartorius-Membranfilter (ϕ 2,5 cm; 0,45 μ Porenweite) gesaugt und mit 7-prozentiger TCA gewaschen. Die Filterplättchen wurden in Plastik-Szintillatorfläschchen überführt, getrocknet, mit 5,0 ml Toluol-haltiger Zählerflüssigkeit versetzt und die Tritium-Aktivitäten im Packard-Tricarb-Szintillationszähler 3375 gemessen. Bei den Versuchen mit Phospholipase C, Trypsin und Perjodat wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten (s. Tabn. I u. III) mit den entsprechenden Substanzen inkubiert, dann wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen, weitere 21 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 60 min mit [3H]Thymidin markiert, wie oben beschrieben. Um einen Anhalt für den Zellverlust zu bekommen, wurden die Zellen für diese Versuche über mehrere Tage

mit [^{14}C]Thymidin (0,3 m μ Ci/ml) markiert, bevor sie in Kulturschälchen angezüchtet wurden.

Autoradiographie

Die Zellen wurden in Plastik-Kulturschälchen vorinkubiert, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, mit 5 μ Ci Methyl[3H]Thymidin (5 Ci/mmol) pro Schälchen 1 Stunde markiert und nach Abgießen des Kulturmediums mit 5-prozentiger Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Die fixierten Zellen wurden 18 Stunden in fließendem Wasser, anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Ilford-Emulsion beschichtet. Nach etwa 8-tägiger Expositionsdauer wurden die Photoschichten entwickelt, die Zellen mit Acridin-Orange angefärbt²³ und die Markierungsindices bestimmt.

Die untersuchten Substanzen stammten von folgenden Firmen: Rinderserumalbumin, kristallin, elektrophoretisch rein, Behringwerke Marburg; Ficoll, mittleres MG 400 000, Pharmacia Uppsala; Insulin, 23 IU/mg, Serva, Heidelberg; Adrenalin, Serva, Heidelberg; Prostaglandin A_1 , synthetisch, Ajinomoto Co., Tokyo; Prostaglandin E_1 , synthetisch, Ajinomoto Co., Tokyo; Prostaglandin E_2 , synthetisch, Ajinomoto Co., Tokyo; Prostaglandin F_{1a} , synthetisch, Ajinomoto Co., Tokyo; Prostaglandin F_{2a} , synthetisch, Ajinomoto Co., Tokyo; Trypsin TR SF 1G A, 185 U/mg, Worthington, Freehold, New Jersey; Trypsin (Rind), polymergebunden, 1,5–2,0 U/mg, Merck, Darmstadt; Phospholipase C, 1,5 U/mg, Worthington, Freehold, New Jersey; Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen, chromatographisch einheitlich, Serva, Heidelberg; Ovomucoid, Serva, Heidelberg; Acetylcholin, Serva, Heidelberg; Eserin, Serva, Heidelberg; Putrescin, Fluka, Eschborn/Taunus; Spermin, Fluka, Eschborn/Taunus; Spermidin, Serva, Heidelberg; Carbamylphosphat, Dinatriumsalz, Sigma Chem. Corp., St. Louis, Mo.; Imidazol p.a., Merck, Darmstadt; Natriumperjodat, Merck, Darmstadt; Zinksulfat $\cdot 7H_2O$, Darmstadt.

α_2 -Makroglobulin und Fetuin wurden uns von den Behringwerken, Marburg, freundlicherweise überlassen.

Kristallines Rinderinsulin wurde nach den Angaben von Cuatrecasas²⁴ an Sepharose-4B (Pharmacia) gekoppelt. Die Vernetzung von Rinderinsulin durch Glutaraldehyd erfolgte nach Heinzel, Griminger und Kallee²⁵.

Ergebnisse und Diskussion

Die in Tab. I aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die Stimulierung der embryonalen Rattenfibroblasten

Tab. I. [^3H]Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von embryonalen Rattenfibroblasten, die durchschnittlich 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten, für die angegebenen Zeiten (10 min oder 21 Stunden) in Medium mit der entsprechenden Substanz inkubiert und nach 21 Stunden (Zeitpunkt der höchsten Thymidineinbauraten bei den Kontrollen mit [^3H]Thymidin (1 $\mu\text{Ci/ml}$ Medium; spez. Akt. 5 Ci/mmol) für 60 min markiert worden waren. Der Einbau in Gegenwart von 10 Prozent Kälberserum im gleichen Ansatz ist gleich 100 Prozent gesetzt. Der [^3H]Thymidin-Einbau in Kulturen, die mit Medium ohne Zusatz inkubiert wurden, beträgt 5 bis 10 Prozent der Einbauraten in Gegenwart von 10 Prozent Kälberserum (durchschnittlich 5000 ipm).

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$ Medium]	Konzentration [M]	Dauer der Einwirkung [Stunden]	Prozent Stimulierung des [^3H]Thymidineinbaues nach 21 Stdn. (10 Prozent Kälberserum = 100)
Serumalbumin	20	$3,0 \cdot 10^{-7}$	21	<10
Rind	50	$7,5 \cdot 10^{-7}$	21	<10
Insulin	1	$1,6 \cdot 10^{-7}$	21	10
	10	$1,6 \cdot 10^{-6}$	21	14
α_2 -Makroglobulin	10	$1,2 \cdot 10^{-8}$	21	<10
Schultze	20	$2,4 \cdot 10^{-8}$	21	<10
	50	$6,0 \cdot 10^{-8}$	21	<10
	100	$1,2 \cdot 10^{-7}$	21	<10
α_2 -Makroglobulin	20	$2,4 \cdot 10^{-8}$	21	23
Schultze	50	$6,0 \cdot 10^{-8}$	21	23
+ Insulin (10 $\mu\text{g/ml}$)				
α_2 -Makroglobulin	6,4	10^{-8}	21	60
S1				
α_2 -Makroglobulin	6,4	10^{-8}	21	83
S1 + Insulin (10 $\mu\text{g/ml}$)				
Insulin mit	0,73		21	<10
Glutaraldehyd	7,3		21	<10
vernetzt	73,0		21	<10
Insulin an	1,2		21	17
Sephrose 4B	12,0		21	22
gekoppelt				
Adrenalin		10^{-7}	21	<10
		10^{-6}	21	<10
		10^{-5}	21	<10
Fetuin	50		21	<10
	200		21	11
	400		21	11
Ficoll	100		21	<10
	10^3		21	<10
	10^4		21	<10
Carbamyl-	1	$8,3 \cdot 10^{-6}$	21	<10
phosphat	20	$1,7 \cdot 10^{-4}$	21	<10
	100	$8,4 \cdot 10^{-4}$	21	<10
	500	$4,2 \cdot 10^{-3}$	21	<10
Heparin	385		21	<10
	1925		21	<10

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$ Medium]	Konzentration [M]	Dauer der Einwirkung [Stunden]	Prozent Stimulierung des [^3H]Thymidineinbaues nach 21 Stdn. (10 Prozent Kälberserum = 100)
Imidazol		10^{-4}	21	<10
		10^{-3}	21	<10
		10^{-2}	21	<10
Zn^{2+}		10^{-10}	21	<10
		10^{-9}	21	<10
		10^{-8}	21	<10
		10^{-7}	21	<10
Putrescin		10^{-8}	21	<10
	5	10^{-8}	21	<10
		10^{-7}	21	<10
	5	10^{-7}	21	<10
		10^{-6}	21	<10
Spermin		10^{-8}	21	<10
	5	10^{-8}	21	<10
		10^{-7}	21	<10
	5	10^{-7}	21	<10
		10^{-6}	21	<10
		10^{-5}	21	<10
Acetylcholin (+ Eserin)		10^{-7}	21	<10
	5	10^{-7}	21	<10
		10^{-6}	21	<10
	5	10^{-6}	21	<10
		10^{-5}	21	<10
NaJO_4		10^{-4}	21	<10
	5	10^{-4}	21	<10
		10^{-3}	21	<10
NaJO_4		10^{-5}	10 min	<10
	5	10^{-5}	10 min	<10
		10^{-4}	10 min	<10
	5	10^{-4}	10 min	<10
		10^{-3}	10 min	<10

sten in der G_1 -Phase kein unspezifischer Proteineffekt ist und auch nicht durch Änderung des kolloidosmotischen Druckes des Kulturmediums erzielt werden kann. Fetuin und reines α_2 -Makroglobulin-Schultze – beide Proteine sind in der Literatur als wachstumsstimulierende Faktoren beschrieben – haben in unserem System keine Wirkung; ebenso unwirksam sind biogene Amine.

In einer früheren Arbeit² war Insulin als essentieller Cofaktor des α_2 -Makroglobulins S1 identifiziert worden²; Insulin allein erwies sich praktisch als unwirksam. Damals war die Frage diskutiert worden, ob für die Wirksamkeit des Insulins ein makromolekularer Träger notwendig ist. Nach den Ergebnissen in Tab. I scheint dies nicht der Fall zu sein. Insulin, an Sepharose gekoppelt, ist ebenso

wenig aktiv wie mit Glutaraldehyd vernetztes Insulin.

Eine geringe Wirkung ($1/5$ von der des Serums) war bei der Kombination von Insulin mit α_2 -Makroglobulin-Schultze zu erhalten, das nach einigen Autoren Insulin binden soll^{26, 27}.

Da die Prostaglandine eine Vielzahl physiologischer Funktionen ausüben, wurde auch diese Gruppe von Wirkstoffen untersucht (Tab. II).

Tab. II. [^3H]Thymidineinbau (Prozent der Stimulierung) in die säureunlösliche Fraktion von embryonalen Rattenfibroblasten unter dem Einfluß von synthetischen Prostaglandinen. Experimentelle Daten wie Tab. I.

Substanz	Prostaglandine			
	Konzentration [M]			
	$5,7 \cdot 10^{-8}$	$5,7 \cdot 10^{-7}$	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$5,7 \cdot 10^{-5}$
Pg-A ₁	<10	<10	<10	<10
+ Insulin (1 $\mu\text{g/ml}$)	<10	<10	—	—
Pg-E ₁	<10	<10	11	<10
+ Insulin (1 $\mu\text{g/ml}$)	<10	12	—	—
Pg-E ₂	<10	10	19	<10
+ Insulin (1 $\mu\text{g/ml}$)	12	17	—	—
Pg-F _{1a}	<10	13	13	10
+ Insulin (1 $\mu\text{g/ml}$)	12	18	—	—
Pg-F _{2a}	<10	10	17	23
+ Insulin (1 $\mu\text{g/ml}$)	13	22	—	—

Durch F_{2a} ließen sich die Zellen geringgradig stimulieren, allerdings lag die benötigte Prostaglandin-Konzentration von $5,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ weit über der physiologischen. Bei Zugabe von 1 μg Insulin pro ml Medium konnte derselbe Effekt bei einer um 2 Zehnerpotenzen geringeren Konzentration erreicht werden. Zur Zeit kann die Möglichkeit noch nicht ausgeschlossen werden, daß Prostaglandine an S1 gebunden sind und ihre Wirkung durch den Proteinrest potenziert wird. Quantitative Prostaglandin-Analysen müssen diese Frage klären.

Wie aus Tab. III hervorgeht, findet sich vor allem bei kurzzeitiger Behandlung mit Trypsin in einem Konzentrationsbereich um 10 γ/ml eine stimulierende Aktivität, wie sie auch von verschiedenen Arbeitsgruppen an einem anderen System beschrieben wurde^{6, 7}. Diese stimulierende Aktivität kann durch Sojabohnen-Trypsininhibitor weitgehend unterdrückt werden. Es verbleibt eine Restaktivität,

Tab. III. [^3H]Thymidineinbau und Markierungsindex nach Behandlung der embryonalen Rattenfibroblasten mit verschiedenen Enzymen bzw. Proteaseinhibitoren. Experimentelle Daten wie Tab. I, nur daß zum Zeitpunkt der Stimulierung kein Mediumwechsel durchgeführt wurde, sondern die Substanzen — in Phosphat-Puffer gelöst — zu dem Medium in den Kulturschälchen hinzugegeben wurden.

Enzyme und Enzyminhibitoren				
Enzym bzw. Enzyminhibitor	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$ Medium]	Dauer der Einwirkung	Prozent der Stimulierung [^3H]Thymidin-Gesamteinbau	Markierungsindex
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (SBTI)	100	21 h	21	
Ovomucoid	40	21 h	<10	
Phospholipase C	2	21 h	17	23
Phospholipase C	4	21 h	20	23
Phospholipase C	8	21 h	28	31
Phospholipase C	12	21 h	29	23
Phospholipase C	16	21 h	26	15
Phospholipase C mit Insulin	10 1	21 h	52	
Trypsin	1	10 min	<10	<10
Trypsin	5	10 min	21	10
Trypsin	7,5	10 min	44	42
Trypsin	10	10 min	58	36
Trypsin	15	10 min	57	<10
Trypsin mit SBTI	10 100	10 min	18	
Trypsin mit Insulin	10 1	10 min 21 h	59	
Trypsin mit Insulin	10 10	10 min 21 h	81	
Trypsin (gebunden)	100	10 min	<10	
Trypsin (gebunden)	500	10 min	14	
Trypsin (gebunden)	1000	10 min	14	

die auch mit Sojabohnen-Trypsininhibitor allein zu beobachten ist. Der Konzentrationsbereich, in dem Trypsin seine optimale stimulierende Aktivität entfaltet, ohne die Zellen irreversibel zu schädigen, scheint sehr eng zu sein und wesentlich von äußeren Bedingungen (z. B. mögliche Temperaturschwankungen bei Zugabe und Entfernung des Trypsins) abzuhängen. Der Prozentsatz der Stimulierung kann deshalb auch von Versuch zu Versuch gewisse Schwankungen aufweisen (bis zu 30 Prozent). Dieses ist besonders gut an den Markierungsindices nach Autoradiographie abzulesen. Auch kann der Zell-

verlust — berechnet nach der ^{14}C -Radioaktivität — bei guter Stimulierung durch das Trypsin bis zu 35 Prozent betragen.

Eine zusätzliche Steigerung der stimulierenden Wirkung des Trypsins kann erreicht werden, wenn während der Trypsineinwirkung und während der Nachinkubation Insulin zusätzlich in das Inkubationsmedium gegeben wird. Darüber hinaus übt das Insulin noch eine gewisse stabilisierende Wirkung auf die Zellen aus, da diese bei mikroskopischer Betrachtung morphologisch noch mehr den mit 10 Prozent Kälberserum inkubierten Zellen ähneln und der in der Regel durch die Trypsinbehandlung zu beobachtende Zellverlust bei Zusetzen von Insulin gewöhnlich geringer ausfiel. Wird Trypsin an einen hochmolekularen Träger gebunden, besitzt es praktisch keine stimulierende Aktivität.

Wie aus Tab. III weiter zu entnehmen ist, können die Zellen auch durch Phospholipase C aktiviert werden. Der Effekt beträgt unter optimalen Bedingungen 30 Prozent von dem des Kälberserums, wenn das Enzym für 21 Stunden dem serumfreien Medium zugesetzt wird. Durch Zugabe von Insulin läßt sich hier ebenfalls eine weitere Steigerung erzielen.

Auch wenn Insulin allein, vernetzt oder an einen makromolekularen Träger gebunden, keine stimulierende Wirkung zeigt, könnte man auf Grund der Ergebnisse, die mit α_2 -Makroglobulin-Schultze, Prostaglandin, F_{2a} , Trypsin und Phospholipase C erzielt wurden, dennoch annehmen, daß Insulin das eigentlich wirksame Prinzip ist und durch die genannten Substanzen bei seiner Funktion unterstützt wird.

Wie sich jedoch bei weiteren Untersuchungen über die Wirkungsweise des Serumproteins S1 zeigte (unveröffentlichte Ergebnisse), wird die DNA-Synthese nach 21 Stunden im gleichen Ausmaß stimuliert, auch wenn Insulin bis zu 15 Stunden nach dem Serumfaktor dem Kulturmedium zugesetzt wird. Hieraus muß man schließen, daß Insulin nicht an dem eigentlichen Stimulierungsprozeß in der G_1 -

Phase beteiligt ist, sondern an anderen Stoffwechselvorgängen, die in den Zellen zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt aktiviert werden.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Frau S. Bernhard und Frl. U. Weisser danken wir für sorgfältige und geschickte Mitarbeit.

- ¹ W. Frank, H.-J. Ristow u. S. Zabel, *Eur. J. Biochem.* **14**, 392 [1970].
- ² R. Hoffmann, H.-J. Ristow, J. Vesper u. W. Frank, *Exp. Cell Res.* **85**, 275 [1973].
- ³ G. J. Todaro, G. K. Lazar u. H. J. Green, *J. cellular comparat. Physiol.* **66**, 325 [1965].
- ⁴ H. M. Temin, *J. Cell Physiol.* **69**, 377 [1967].
- ⁵ J. M. Vasiliev, J. M. Gelfand, V. J. Guelstein u. E. K. Fetisova, *J. Cell Physiol.* **75**, 305 [1970].
- ⁶ B. M. Sefton u. H. Rubin, *Nature [London]* **227**, 843 [1970].
- ⁷ M. M. Burger, *Nature [London]* **227**, 170 [1970].
- ⁸ R. D. Glynn, C. R. Thrash u. D. D. Cunningham, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **70**, 2676 [1973].
- ⁹ J. P. MacManus, J. F. Whitfield u. T. Youdale, *J. Cell Physiol.* **77**, 103 [1971].
- ¹⁰ J. F. Whitfield, J. P. MacManus, B. M. Braceland u. D. J. Gillan, *J. Cell Physiol.* **79**, 353 [1972].
- ¹¹ J. F. Whitfield, A. D. Perris u. T. Youdale, *Exp. Cell Res.* **53**, 155 [1968].
- ¹² A. Novogrodsky u. E. Katchalski, *FEBS Letters* **12**, 297 [1971].
- ¹³ M. Rodbell, *J. biol. Chemistry* **241**, 130 [1966].
- ¹⁴ A. M. Temin, R. W. Pierson jr. u. N. C. Dolak, *Growth, Nutrition and Metabolism in Cells in Culture*, **Vol. 1**, p. 49, Acad. Press, Inc., New York—London 1972.
- ¹⁵ H. E. Schultze, J. Göllner, K. Heide, M. Schönenberger u. G. Schwick, *Z. Naturforsch.* **10b**, 463 [1955].
- ¹⁶ G. M. Healy u. R. C. Parker, *J. Cell Biol.* **30**, 539 [1966].
- ¹⁷ A. F. Parisi u. B. L. Vallee, *Biochem.* **9**, 2421 [1970].
- ¹⁸ H. Rubin, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 712 [1972].
- ¹⁹ J. Michl, *Nature [London]* **207**, 412 [1965].
- ²⁰ P. Pohjanpelto u. A. Raina, *Nature New Biol.* **235**, 247 [1972].
- ²¹ J. Vesper u. W. Frank, *Z. Naturforsch.* **27b**, 1573 [1972].
- ²² W. Frank, H.-J. Ristow u. S. Schwalb, *Exp. Cell Res.* **70**, 390 [1972].
- ²³ O. A. Fabricius, *Microscop. Acta* **71**, 199 [1972].
- ²⁴ P. Cuatrecasas, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **63**, 450 [1969].
- ²⁵ W. Heinzel, H. Grimminger u. E. Kallee, *Diabetologia* **7**, 204 [1971].
- ²⁶ H. Dürr u. E. Kallee, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 629 [1971].
- ²⁷ W. Berson, *J. clin. Invest.* **35**, 170 [1956].