

UNTERSUCHUNGEN AN FRAKTIONIERTEN PLÄTTCHENHOMOGENATEN*—IV QUANTITATIVE BEZIEHUNGEN BEI DER FREISETZUNG VON STRUKTURGEBUNDENEN ATP UND SEROTONIN

E. WEBER, H. TOWLIATI und B. SCHMIDT

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
Abteilung für Klinische Pharmakologie
und dem
Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg

(Received 29 September 1969; accepted 2 December 1969)

Abstract—Particles sedimented from platelet homogenates by 30 minutes centrifugation at 3000 *g* contain structure-bound serotonin and ATP in molar relation 0.31. During incubation at 37°, these substrates were released in the same proportion under various conditions (without and with addition of EDTA, tyramine or prenylamine). Identical results are obtained with purified fractions. The findings indicate that in platelets structure-bound serotonin and ATP occur in the same storage organelle, from which they can be released together.

IN EINER aus Plättchenhomogenaten bei 3000 *g* absetzbaren Fraktion fanden wir praktisch den gesamten strukturegebundenen Anteil an ATP und Serotonin, und elektronenoptisch ließen sich serotoninhaltige Vesikel nachweisen. Auch bei weiterer Auftrennung im Saccharosedichtegradienten konnten beide Substrate nicht voneinander abgetrennt werden.¹ Bei der näheren Untersuchung zur Charakterisierung dieser Strukturen unter verschiedenen Bedingungen fiel ein gleichsinniges Verhalten des granulären Serotonins und ATP auf: Substanzen oder Eingriffe, die zu einer Entleerung oder Reduktion des Serotoningehaltes in diesen Strukturen geführt hatten, bewirkten entsprechende Verschiebungen des ATP-Bestandes.^{2, 3} Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die getesteten Substanzen bzw. Eingriffe und ihren Effekt auf die ATP- und Serotoninkonzentrationen, wie sie sich aus unseren vorausgegangenen Mitteilungen ergibt. Es schien lohnend, in weiteren Versuchen zu prüfen, welche quantitativen Beziehungen bestehen. Zu diesem Zweck verglichen wir die molaren Quotienten von Serotonin und ATP in frisch gewonnener Fraktion P₁ mit den molaren Verhältnissen der im Verlauf von Inkubationsvorgängen frei gewordenen Serotonin- und ATP-Mengen. Zur Ausschaltung des Einflusses von in Fraktion P₁ befindlichen Organellen anderer Art wurden entsprechende Experimente an Vesikelfractionen durchgeführt, die mit Hilfe von Saccharosedichtegradienten weitmöglichst gereinigt worden waren.

Verwendete Substanzen. Die angewandten Substanzen sind in vorangegangenen Arbeiten beschrieben.^{2, 3}

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

TABELLE 1. ÜBERSICHT ÜBER DIE WIRKUNG DER TABELLIERTEN VERSUCHSBEDINGUNGEN AUF STRUKTURGEBUNDENES SEROTONIN UND ATP IN EINER AUS PLÄTTCHENHOMOGENATEN DURCH 30 MINUTEN ZENTRIFUGIEREN BEI 3000 g GEWONNENEN FRAKTION P₁

			Verlust an gebundenem Serotonin ATP	
Tris-HCl-gepufferte NaCl-Lösung		0.01 M	+	+
Imidazol-gepufferte NaCl-Lösung		0.02 M	+	+
K ⁺		5.6 mM	0	0
K ⁺		56.0 mM	+	+
Mg ⁺⁺	<	10 ⁻² M	0	0
Ca ⁺⁺		10 ⁻² M	0	0
Tyramin	10 ⁻⁴ M;	10 ⁻² M	+	+
Prenylamin	10 ⁻⁴ M;	5 × 10 ⁻⁴ M	+	+
Prenylamin		10 ⁻⁵ M	0	0
Phenoxybenzamin	10 ⁻⁵ M; 10 ⁻⁴ M;	10 ⁻³ M	0	0
Monojodessigsäure		10 ⁻² M	+	+
Mersalyl		10 ⁻³ M	+	+
N-Äthylmaleimid (NEM)		10 ⁻² M	+	+
Thrombin		5 E/ml	0	0
Trypsin	<	500 E/ml	0	0
Lysozym		500 E/ml	0	0
Digitonin		10 ⁻⁵ M	0	0
Digitonin	7 ×	10 ⁻³ M	+	+
Lipase		0.1 mg/ml	+	+
Phospholipase D		0.05 E/ml	0	0
Osmolyse		—	+	+

Substratverlust: +; keine Veränderungen der Substratkonzentrationen: 0. Als Bezugswerte dienten Proben, die ohne weitere Zusätze in Trismaleat-gepuffelter NaCl-Lösung inkubiert wurden.

METHODE

1. Herstellung und Reinigung der Fraktionen

Die Isolierung der Blutplättchen, die Herstellung der Homogenate, die Gewinnung der Fraktion P₁ und ihre Auftrennung im Saccharosedichtegradienten (Gradient I) erfolgte wie bei Weber *et al.*⁴ beschrieben. Zur weiteren Reinigung der Serotonin-vesikel-haltigen Fraktion wurde in einigen Fällen die mit Hilfe des Saccharosedichtegradienten gewonnenen drei partikelhaltigen Banden verworfen und das am Boden der Röhrchen befindliche Sediment in 1.5 molarer Saccharose aufgenommen und auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (Gradient II) überschichtet (1.25 ml 1.5 M Saccharose; 0.75 ml 2.0 M Saccharose; 1.75 ml 2.25 M Saccharose und 1.25 ml 2.5 M Saccharose). Nach Anwendung von 100000 g über 60 Minuten in einem SWL-39-Schwingkopf (Spinco-Ultrazentrifuge L, Beckman Instruments, München) lagen wieder drei partikelhaltige Banden und ein Sediment vor.

2. Durchführung der Inkubationen

Zu je 0.8 ml Fraktion P₁ wurden 0.2 ml Trismaleat-gepufferte Kochsalzlösung im Eisbad zugefügt. Bei der Prüfung der verschiedenen Agenzien ersetzten wir in der Kälte 0.1 ml der NaCl-Lösung durch—nach Möglichkeit isotone—Lösungen dieser Stoffe. Sofort sowie nach 15 Minuten Inkubation bei 37° erfolgte eine Trennung der

Proben in Sediment und Überstand durch scharfes Zentrifugieren (30 Minuten bei 15000 g). Im Überstand führten wir Serotonin-, im Sediment ATP-Bestimmungen mit den bei Weber *et al.* (Mitteilung I)⁴ angegebenen Methoden durch. Es wurde jeweils die im Verlauf der Inkubationsvorgänge in den Überstand gelangende molare Serotoninmenge mit dem im gleichen Zeitraum im Sediment verlorengegangenen ATP-Anteil zueinander in Beziehung gesetzt.

Die partikelhaltigen Banden und das Sediment des Saccharosedichtegradienten

TABELLE 2. ÜBERSICHT ÜBER DIE MOLAREN QUOTIENTEN VON ABGEGEBENEM SEROTONIN UND ATP AUS SEDIMENTIERBAREN ANTEILEN DER FRAKTION P_1 WÄHREND DER INKUBATION BEI 37°

(a) Inkub.- Periode (Min)	S/ATP				Mittelwert
	1	2	3	4	
0-15	0.32	0.28	0.39	0.28	0.32
0-30	0.28	0.27	0.23	0.36	0.29
15-30	0.22	0.27	0.14	0.34	0.24

(b) Inkub.- Periode (Min)	S/ATP			Mittelwert
	1	2	3	
0-15	0.73	0.46	0.61	0.59
0-30	0.49	0.44	0.34	0.42
15-30	0.30	0.42	0.20	0.31

(c) Inkub.- Periode (Min)	Versuchs- bedingungen					Mittelwert
			1	2	3	
0-15	Spontan		0.43	0.63	0.23	0.43
0-15	Tyramin	10^{-2} M	0.40	0.24	0.33	0.32
0-15	Tyramin	5×10^{-3} M	0.25	0.26	0.30	0.27
0-15	Tyramin	10^{-3} M	0.39	0.41	0.42	0.41
15-15*	Tyramin	10^{-2} M	0.39	0.20	0.37	0.32
15-15*	Tyramin	5×10^{-3} M	0.21	0.21	0.33	0.25
15-15*	Tyramin	10^{-3} M	0.13	0.32	0.71	0.39

(d) Inkub.- Periode (Min)					Mittelwert
			1	2	
0-15	Spontan		0.61	0.58	0.59
0-15	Prenylamin	5×10^{-4} M	0.30	0.20	0.25
0-15	Prenylamin	10^{-4} M	0.46	0.36	0.41
0-15	Prenylamin	10^{-5} M	0.75	0.49	0.62
15-15*	Prenylamin	5×10^{-4} M	0.29	0.17	0.23
15-15*	Prenylamin	10^{-4} M	0.43	0.30	0.36
15-15*	Prenylamin	10^{-5} M	0.88	0.34	0.61

(a) Die Proben enthielten keine weiteren Zusätze.

(b) Alle Proben enthielten EDTA in einer Endkonzentration von 10^{-2} M.

(c) Die Proben enthielten keine Zusätze ("spontan") bzw. Tyramin in der angegebenen Konzentration.*

(d) Die Proben enthielten keine Zusätze ("spontan") bzw. Prenylamin in der angegebenen Konzentration.*

* Hier wurde derjenige Anteil an Serotonin und ATP zueinander in Beziehung gesetzt, der über die innerhalb von 15 Min spontan abgegebene Menge hinaus unter dem Einfluß von Tyramin zusätzlich frei wurde.

(Gradient I), zumeist aus zwei 5 ml-Röhrchen, wurden mit Trismaleat-gepufferter Kochsalzlösung auf 5 ml verdünnt. Für die Inkubationsversuche wurde verfahren wie für Fraktion P₁ beschrieben. Aus den partikelhaltigen Banden und dem Sediment des Gradienten II wurden lediglich die molaren Quotienten des Serotonin- und ATP-Gehaltes nach geringfügiger Verdünnung durch Trismaleat-gepufferte Kochsalzlösung in der Kälte bestimmt.

ERGEBNISSE

Die unter verschiedenen Bedingungen gewonnenen Werte für das molare Verhältnis der abgegebenen Serotonin- und ATP-Mengen sind der Tabelle 2a–2d zu entnehmen. Von den insgesamt tabellierten 72 Einzelwerten bewegen sich 64 zwischen 0·1 und 0·5; nur 8 liegen höher. Eine sichere systematische Änderung des Quotienten wird nirgends erkennbar.

Die verhältnismässig große Streuung erklärt sich daraus, daß jeder Quotient auf 4 Messungen basiert und daß die zu bestimmenden Absolutmengen niedrig liegen. Dazu kommt, daß die prozentuale Veränderung im ATP-Anteil bei der Abgabe gering ist. Das Ausmaß der Streuung bewegt sich innerhalb der Spanne, die aus vergleichbaren Arbeiten der Literatur hervorgeht.

In weiteren Versuchen wurde Fraktion P₁ im Saccharosedichtegradienten in drei partikelhaltige Banden und ein Sediment aufgetrennt (Gradient I). Strukturgebundenes Serotonin und ATP fand sich in Übereinstimmung mit früher mitgeteilten Befunden¹ überwiegend im Sediment, daneben in geringerem Ausmaß auch in dem untersten Band. Das Sediment besteht—wie elektronenoptische Bilder zeigen—vorwiegend aus serotoninhaltigen Vesikeln.⁵ Tabelle 3 zeigt, daß auch aus diesen, weitgehend gereinigten Subfraktionen Serotonin und ATP im gleichen molaren Verhältnis frei werden wie in den mit Fraktion P₁ durchgeführten Versuchen.

TABELLE 3. DAS MOLARE VERHÄLTNISS VON SEROTONIN UND ATP, WELCHES INNERHALB EINER 15 MINUTEN-INKUBATIONSPERIODE BEI 37° AUS 2 UNTERFRAKTIONEN DER IM DICHTEGRAIDENTEN (GRADIENT I) AUFGETRENNTEN FRAKTION P₁ ABGEGEBEN WURDE

	Spontan		Prenylamin (10 ⁻⁴ M) Zitrat
	Zitrat	EDTA	
Band III	0·19	0·32	0·29
Sediment	0·56	0·29	0·15

Mittelwerte aus je 2 Versuchen.

Sedimente, die durch Auftrennung der Fraktion P₁ im Dichtegradienten erhalten worden waren, wurden in einem zweiten, gegenüber dem ersten etwas modifizierten, diskontinuierlichen Saccharosegradienten (Gradient II) weiter differenziert. Es stellten sich wiederum drei verschieden stark getrübe Zonen und ein Sediment dar. Die Analyse ergab, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen des ersten Dichtegradienten in allen vier Subfraktionen sowohl Serotonin wie auch ATP enthalten war. Das molare Verhältnis dieser beiden Substrate ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die Werte liegen zwischen 0·19 und 0·50 und damit in dem Bereich, den wir in den anderen Experimenten beobachteten.

TABELLE 4. DER MOLARE QUOTIENT SEROTONIN/ATP IN FRISCH GEWONNENEN FRAKTIONEN EINES DICHTEGradienten (GRADIENT II), IN DEM DAS SEDIMENT DES IN TABELLE 3 ERWÄHNTEN GRADIENTEN WEITER DIFFERENZIIERT WURDE

	1	2	3	4	Mittelwert
Band I	0.30	0.24	0.50	0.50	0.38
Band II	0.40	0.24	0.45	0.48	0.39
Band III	0.38	0.27	0.48	0.19	0.33
Sediment	0.26	0.27	0.40	0.21	0.29

DISKUSSION

Die im Ergebnisteil angeführten, unter variierten Bedingungen in Fraktion P_1 oder den Subfraktionen beobachteten molaren Quotienten von in das Außenmilieu frei werdendem Serotonin und ATP liegen fast ausschließlich zwischen 0.1 und 0.5. Auf 10 Moleküle ATP, die sich von sedimentierbaren Strukturen ablösen, werden demnach 1–5 Moleküle Serotonin frei, unabhängig von den angewandten Versuchsbedingungen. Setzt man in frisch gewonnener Fraktion P_1 die molaren Serotonin- und ATP-Mengen zueinander in Beziehung, so ergibt sich ein Quotient von 0.31. Auch in den weitgehend gereinigten, die serotoninhaltigen Vesikel aufweisenden Subfraktionen, liegen die Quotienten sowohl nach Auftrennung im ersten wie auch im zweiten Dichtegradienten zwischen 0.1–0.5, im Mittel bei 0.35. Damit besteht eine Übereinstimmung der Größenordnung der Quotienten sowohl der stationären Konzentrationen in den Vesikelfractionen wie auch der durch verschiedene Manipulationen freigesetzten Serotonin- und ATP-Mengen. Dieses scheint uns ein überzeugender Hinweis dafür zu sein, daß

- (1) strukturgebundenes ATP und Serotonin auch in Blutplättchen in einer gemeinsamen Organelle vorkommen und
- (2) unter der Einwirkung verschiedener Agenzien oder unter bestimmten Umständen auch gemeinsam abgegeben werden, und zwar in dem Verhältnis, in dem sie natürlicherweise im Speichergranum vorliegen.

Blutplättchen unterscheiden sich damit in dieser Hinsicht nicht grundsätzlich von anderen, biogene Amine enthaltenden Strukturen.^{6–11}

Es sind für verschiedene Typen solcher Speicherorganellen konstante Beziehungen zwischen Amin- und ATP-Gehalt beschrieben worden. Am längsten bekannt und am besten untersucht sind in dieser Hinsicht die chromaffinen Grana des Nebennierenmarkes. In diesen Speicherstrukturen vom Rind wurden molare Quotienten Katecholamine/ATP von 4–5 gefunden. Diese bleiben nach Freisetzung von Aminen und ATP sowohl *in vitro* wie *in vivo* unter verschiedenen Bedingungen erhalten, so daß auch die abgegebenen Substratmengen im gleichen molaren Verhältnis zueinander stehen (Übersicht s. bei^{12–15}). Katecholamin- und ATP-haltige Partikel aus Milznerven und Ganglien sowie teilweise gereinigte Vesikel aus Rattenherzen weisen gleiche Werte auf wie die Grana aus dem Nebennierenmark vom Rind.^{8–10, 16} Poisner und Douglas¹⁷ ermittelten dagegen ein molares Verhältnis von Vasopressin und ATP in Speichergrana des Hypophysenhinterlappens von 20:6. Auch in Katecholamin-haltigen Nebennierenmarkgrana bestimmter Spezies, z.B. von Hühnern, wurden höhere Quotienten gemessen als 4.¹⁸ Das Vorkommen eines Amin-ATP-Quotienten unter 4 in isolierten Strukturen wurde von Philippu und Przuntek¹¹ beschrieben. Sie fanden in Nor-

adrenalin-speichernden Vesikeln des Hypothalamus in 5 Versuchen einen mittleren Wert von 0.56 ± 0.009 .

Aus dem Verhältnis 4:1 von pressorischen Aminen zu ATP in Nebennierenmark-grana wurde geschlossen, daß die vier sauren Valenzen des ATP mit jeweils einem basisch reagierenden Katecholaminmolekül eine Verbindung eingehen. Auf diese Weise entstünde ein elektrostatisch neutraler, osmotisch nur wenig wirksamer Komplex, der die Speicherungsform der beiden Substrate darstellt (Literaturübersicht s. bei Holtz und Palm¹³). Ob eine entsprechende Interpretation im Falle der Serotonin-vesikel der Plättchen zutrifft, kann nicht entschieden werden. Wenn ja, so läge ein beträchtlicher Überschuß an ATP vor, dessen Bedeutung wiederum ungeklärt bliebe. Pletscher¹⁹ hat soeben eine auf Untersuchung von hochmolekularen Serotonin-Mg-Komplexen in der Ultrazentrifuge basierende Alternative vorgeschlagen.

In allerjüngster Zeit wurde von Da Prada und Pletscher²⁰ in isolierten Serotonin-Organellen aus Kaninchenblutplättchen ein molares Verhältnis dieses Amins zu ATP von 2.5 gemessen. Holmsen *et al.*²¹ fanden dagegen in den entsprechenden, isolierten Strukturen aus menschlichen Plättchen einen mit unseren Angaben gut übereinstimmenden Quotienten von 0.2. Darüber hinaus beobachteten diese Autoren unter der Einwirkung von Collagen und Thrombin auf intakte Plättchen eine Abgabe von Serotonin und ATP im gleichen Verhältnis wie es in den speziellen Speicherorganellen vorkommt. Gleichzeitig konnten sie anhand von radiochemischen Experimenten nachweisen, daß unter diesen Bedingungen nur dieser ATP-Pool aus den Plättchen freigesetzt wird.

Bisher ist nicht klar, ob die stark abweichenden Werte für die molare Serotonin-ATP-Beziehung speciesbedingt sind oder auf methodische Unterschiede zurückgeführt werden müssen. Es besteht die Möglichkeit, daß ein unterschiedlicher Sättigungsgrad von Plättchen verschiedener Säugerarten an Serotonin hierbei eine Rolle spielt. Wir haben uns mit diesem Problem nicht weiter auseinandergesetzt, weil es uns weniger darauf ankam, den absoluten Wert des Quotienten zu erfassen, als seine Konstanz unter verschiedenen Bedingungen, die zur Abgabe von Serotonin aus den isolierten Organellen führten, zu zeigen.

Die vielfach elektronenoptisch bewiesene Degranulierung von Blutplättchen im Verlauf der Einwirkung von Thrombin sowie die prinzipielle Ähnlichkeit von Serotoningrana mit Speicherorganellen, z.B. des Nebennierenmarkes, werfen die Frage auf, ob die Abgabe von Aminen aus Blutplättchen in ähnlicher Weise erfolgt wie aus dem Nebennierenmark. Nach De Robertis und Mitarb.²², De Robertis und Vaz Ferreira²³ bewegen sich katecholaminhaltige Grana des Nebennierenmarkes auf sekretorische Reize hin durch das Zytoplasma gegen die Zellmembran, fusionieren mit ihr und geben ihren Inhalt über einen als Exozytose zu interpretierenden Vorgang nach außen ab.

Wie im Nebennierenmark kommt es bei der Aminabgabe auch in den Plättchen selbst unter Thrombin- bzw. Kollageneinwirkung nicht zum Ausströmen des gesamten löslichen Zellinhaltes. Diese Stoffe führen vielmehr zu einer nur partiellen Permeabilitätssteigerung.²⁴⁻²⁷ Inwieweit die offensichtlich verwandten Phänomene sich im einzelnen entsprechen, kann heute noch nicht gesagt werden. Gewisse Unterschiede scheinen zu bestehen, so bleiben z.B. in degranulierten Blutplättchen, den bisher vorliegenden elektronenoptischen Bildern nach, keinerlei innere Membransysteme zurück. Dies könnte allerdings wiederum Folge eines über die Exozytose hinaus

speziell in Blutplättchen ablaufenden zytolysierenden Prozesses sein. Nach Befunden von White²⁸ kommt dem kanalikulären System, welches in Kontakt mit den Serotonin-Organellen zu stehen scheint, für die Abgabe von Serotonin Bedeutung zu.

Zusammenfassung—Aus Plättchenhomogenaten durch 30 Minuten Zentrifugieren bei 3000 g abgesetzte Partikel enthalten strukturgebundenes Serotonin und ATP im molaren Verhältnis 0:31. Während der Inkubation bei 37° werden diese Substrate unter verschiedenen Bedingungen (ohne und mit Zusatz von EDTA, Tyramin oder Prenylamin) im gleichen Verhältnis frei. Identische Ergebnisse werden mit gereinigten Fraktionen erhalten. Die Befunde sprechen für das gemeinsame Vorkommen von strukturgebundenem Serotonin und ATP der Plättchen in einer Speicherorganelle, aus der sie zusammen nach außen abgegeben werden können.

LITERATURE

1. E. WEBER und H. MONDT, *Klin. Wschr.* **45**, 165 (1967).
2. E. WEBER, H. E. BRAUN, H. MONDT und H. TOWLIATI, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1913 (1970).
3. E. WEBER, B. SCHMIDT, E. MORGENSTERN und H. MONDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1929 (1970).
4. E. WEBER, E. WALTER, E. MORGENSTERN, H. MONDT, U. ROSE und E. KNAUDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1893 (1970).
5. E. WEBER, E. MORGENSTERN und E. WALTER, I. Internationales Symposium, Wien, 17.-20. Juni 1968. Herausgeber: E. DEUTSCH, E. GERLACH, K. MOSER, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1968).
6. H. BLASCHKO, G. V. R. BORN, A. D'IORIO und N. R. EADE, *J. Physiol. Lond.* **133**, 548 (1956).
7. B. FALCK, N. Å. HILLARP und B. HÖGBERG, *Acta Physiol. scand.* **36**, 360 (1956).
8. H. J. SCHÜMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path.* **233**, 296 (1958).
9. L. STJÄRNE, *Acta physiol. scand.* **62**, suppl. 228 (1964).
10. H. J. SCHÜMANN, K. SCHMIDT und A. PHILIPPU, *Life Sci.* **5**, 1809 (1966).
11. A. PHILIPPU und H. PRZUNTEK, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path.* **258**, 238 (1967).
12. P. HOLTZ und D. PALM, *Ergebnisse der Physiologie, Biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie* Band 58, Springer-Verlag, Berlin (1966).
13. P. BANKS, *Biochem. J.* **97**, 555 (1965).
14. P. BANKS, *Biochem. J.* **101**, 536 (1966).
15. W. W. DOUGLAS und A. M. POISNER, *J. Physiol. Lond.* **183**, 236 (1966).
16. U. S. v. EULER und N. Å. HILLARP, *Nature, Lond.* **177**, 44 (1956).
17. A. M. POISNER und W. W. DOUGLAS, *Science* **160**, 203 (1968).
18. W. R. BURACK, N. WEINER und P. B. HAGEN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **130**, 245 (1960).
19. A. PLETSCHER in G. V. R. BORN, *Blood platelets as pharmacological Systems*. Fourth International Congress on Pharmacology July 14-18, 1969 in Basel, Switzerland.
20. M. DA PRADA und A. PLETSCHER, *Br. J. Pharmac.* **34**, 591 (1968).
21. H. HOLMSEN, H. J. DAY und E. STORM, *Biochim. biophys. Acta.* **186**, 254 (1969).
22. E. DE ROBERTIS, W. W. NOWINSKI und F. A. SAEZ, in *Cell Biology*, S. 432, W. B. Saunders, Philadelphia (1965).
23. E. DE ROBERTIS und A. VAZ FERREIRA, *Exp. cell. Res.* **12**, 568 (1957).
24. K. GRETT, *Acta Physiol. scand.* **56**, Suppl. 195 (1962).
25. S. BUCKINGHAM und E. W. MAYNERT, *J. Pharmac. exp. Ther.* **143**, 332 (1964).
26. E. WEBER, *Habilitationsschrift Heidelberg* (1965).
27. M. G. DAVEY und E. F. LÜSCHER, *Thromb. Diath. Haemorrh.* **19**, 12 (1968).
28. J. G. WHITE, *Am. J. Pathol.* **53**, 791 (1968).