

UNTERSUCHUNGEN AN FRAKTIONIERTEN PLÄTTCHENHOMOGENATEN*—II

ÜBER VORKOMMEN UND EIGENSCHAFTEN VON STRUKTUR- GEBUNDENEN ADENINNUKLEOTIDEN

E. WEBER, H. E. BRAUN, H. MONDT und H. TOWLIATI

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

(Received 1 September 1969; accepted 12 November 1969)

Abstract—From homogenized platelets from pig blood a fraction (P_1), was obtained through centrifugation at 3000 g (30 min) which contained 86 per cent of the structure-bound ATP of the homogenate. Aliquots of this fraction were incubated in 30 min at 0° or 37° with and without various additives and then separated into sedimentable and soluble parts. There followed a determination of the stationary concentrations of ATP, ADP and AMP in sediment and supernatant of the fraction.

The effect of these adenine nucleotides of various buffer systems, cations, SH-group inhibitors, cysteine, inhibitors of oxidative phosphorylation, EDTA, amine liberators, proteases, membrane-damaging substances, as well as osmolytic was investigated.

Substances which lower the ATP level in the sediment were seen to produce the same effect on ADP and, with the exception of cysteine, on AMP (56 mM K^+ , cysteine, mersalyl, monooiodoacetic acid, NEM, reserpine 10^{-3} M, tyramine, prenylamine, Triton, lipase and phospholipase D as well as osmolytic). With the exception of NEM, reserpine, phospholipase D and osmolytic, these substances lead to an accumulation of ATP in the supernatant of P_1 . Other substances raise the ATP content in the supernatant of P_1 but did not lower the stationary ATP concentration in the sediment (Ca^{2+} , EDTA, chlorpromazine and pheoxybenzamine). Substances which cause a higher concentrations of ATP in the supernatant of P_1 show the same effect on ADP. An accumulation of ATP in the supernatant is followed by a sinking of the AMP content. Exceptions are potassium (56 mM) and tyramine, whereby the AMP concentration rises, as well as Triton. Weak effects on the structure-bound nucleotides were observed after addition of calcium, magnesium, phenoxybenzamine and sodium azide. As the concentrations used Na^{2+} , 2,4 dinitrophenol, the ferments trypsin, thrombin and lysozyme, and ouabain failed to influence the examined parameters.

The results obtained with fraction P_1 show an ATPase activity, which may be related to the liberation of structure-bound adenine nucleotides from blood platelets. The effect in this adenine nucleotide pool of various substances conform only partially to amine-containing organelles in other cells.

IN EINER vorausgegangenen Mitteilung haben wir beschrieben, daß nach Auf trennung von Homogenaten aus Schweineplättchen durch Differentialzentrifugation in einer

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

der vier gewonnenen Fraktionen (P_1) 86 % des ATP- und 56 % des Serotoninbestandes neben 15 % des Gesamt-Proteins gefunden wurden.¹ Es handelt sich dabei um nahezu den gesamten strukturgebundenen Anteil (87 % bei ATP und Serotonin), und um etwa die Hälfte des in intakten Plättchen vorkommenden ATP. In der gleichen Fraktion P_1 wiesen wir elektronenoptisch die Strukturen nach, die nach neueren Ergebnissen als die serotoninhaltigen Vesikel angesehen werden müssen.²⁻⁴ Unsere Ergebnisse stimmen mit Angaben von Baker *et al.*⁵, Born⁶ und Da Prada *et al.*⁷ überein, nach denen in mit Hilfe von Dichtegradienten aufgetrennten Plättchenhomogenaten ein sedimentierbarer Pool von ATP vorkommt, in dem jeweils auch Serotonin angereichert ist.

Baker *et al.*⁵ beschrieben in einer kurzen Notiz, daß sich ATP und Serotonin vorwiegend gemeinsam am Boden der 2 M-Saccharoseschicht lokalsierten. Dieser Befund wurde von Born⁶ ausführlicher dargestellt. Da Prada *et al.*⁷ isolierten mit ähnlicher Technik eine einheitliche Fraktion, bestehend aus bläschenartigen Gebilden, umgeben von einer einfachen Membran und teilweise mit dichtem osmiophilen Material angefüllt. In dieser Fraktion war rund 100mal mehr Serotonin, Histamin und ATP bezogen auf den Proteingehalt enthalten als in den übrigen Fraktionen.

In Fraktion P_1 fanden wir neben ATP auch ADP und AMP. In der hier vorliegenden Arbeit sind Experimente dargestellt, in denen das Verhalten dieser drei Adeninnukleotide in Fraktion P_1 unter der Einwirkung verschiedener Agenzien bzw. Eingriffe geprüft wurde. Die Fortführung dieser Untersuchungen hat ergeben, daß mit großer Wahrscheinlichkeit die Serotonin und ATP enthaltenden Strukturen identisch sind.^{8, 9} Die hier vorgebrachten Resultate tragen demnach zur Charakterisierung der Serotoninvesikel von Blutplättchen bei und gestatten es, sie mit amintragenden Strukturen anderer Provenienz zu vergleichen. Gleichzeitig ermöglichen sie Aussagen über Eigenschaften einer in P_1 vorkommenden ATPase-Aktivität.

METHODE

Die Isolierung der Plättchen aus Blut von Schlachtschweinen, die Herstellung der Homogenate und der Fraktion P_1 erfolgte wie bei Weber *et al.*³² (Mitteilung I) beschrieben.

Jeweils 1·6 ml der Fraktion P_1 wurden mit kleinen Volumina konzentrierter Lösungen der zu untersuchenden Substanzen versetzt. Jede Probe wurde mit dem Suspensionsmilieu (1 Vol.-Teil Trismaleatpuffer 0·5 M, pH 7·4 + 4 Vol.-Teile 0·9 % NaCl-Lösung + NaCl in Substanz zur Erreichung von 300 mOsmol) auf je 2·0 ml aufgefüllt und 30 Minuten bei 37° im Wasserbad inkubiert. Die Kontrollansätze enthielten neben 1·6 ml Fraktion P_1 0·4 ml Suspensionsmilieu. Die als 0°-Kontrollen bezeichneten Proben wurden über die gleiche Zeit im Eisbad gehalten. Nach Abkühlung der inkubierten Ansätze bei 0° wurden alle Proben 30 Minuten bei 4300 g zentrifugiert.

1·5 ml des abgenommenen Überstandes wurden mit 0·3 ml HClO₄ (18 %) enteiweißt und mit 0·18 ml K₂CO₃-Lösung (40 %) neutralisiert. Dem Sediment wurden 1·65 ml HClO₄ (6 %) und 0·35 ml K₂CO₃ (40 %) zugefügt. In den nach Zentrifugieren erhaltenen klaren Überständen erfolgte eine enzymatische Bestimmung des ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes unter Verwendung der entsprechenden Biochemica-Testkombinationen (C. F. Boehringer u. Söhne, GmbH, Mannheim) und Einführung einiger Modifikationen. Es wurde die Konzentration des Triaethanolamin-HCl-

Puffers erhöht (auf 0·8 M bzw. 1·3 M) und für die Bestimmung von ATP Hydrazinsulfat zugefügt.

Verwendete Substanzen

E. Merck AG, Darmstadt: Saccharum album p.A.; Monojodessigsäure p.A.; Natriumazid, 2·4(alpha)-Dinitrophenol; EDTA ("Titriplex III"); Ouabain (g-Strophanthin, krist. puris.); Digitonin krist.

Serva-Entwicklungsabor, Heidelberg: L-Cystein × HCl × H₂O, reinst; Mersalyl-Natrium, reinst, Theophyllin-frei; Triton-X-100; Lipase rein aus Schweinepankreas.

C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim: Lysozym kristallines Trockenpulver, etwa 17,000 E/mg; Phospholipase D, etwa 0·5 E/mg; ATP, krist. Di-Natriumsalz.

Behringwerke AG, Marburg: Serumalbumin vom Rind, reinst; Thrombinum purum.

Fluka AG, Buchs/Schweiz: Tyraminhydrochlorid; Trypsin, 3 mal kristallisiert salzfrei mit 10,000 BAEE-Einheiten/mg.

Ciba AG, Wehr/Baden: Reserpin-Phosphat, lyophil.

Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Hoechst: Prenylamin ("Segontin-Glukonat-Lösung").

Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen: Chlorpromazin ("Megaphen").

Sigma, St. Louis/U.S.A.: N-Aethylmaleimid.

Smith, Kline and French, Labs, Philadelphia/U.S.A.: Phenoxybenzaminhydrochlorid ("Dibenzylin").

ERGEBNISSE

In frisch gewonnener Fraktion P₁ fand sich niemals ATP allein, sondern stets ein Gemisch von ATP, ADP und AMP, im molaren Verhältnis 4:2:1 (Tabelle 1). Schon

TABELLE 1. DIE VERTEILUNG DER ADENINNUKLEOTIDE IN DER FRAKTION P₁ UNMITTELBAR NACH IHRER GEWINNUNG (0°) SOWIE NACH 30 MINUTEN INKUBATION BEI 37° IN TRIS-MALEAT-GEPUFFERTER KOCHSALZLÖSUNG

		0°	37°
Sediment	ATP	0·354 ± 0·015	0·292 ± 0·013
	ADP	0·155 ± 0·009	0·113 ± 0·006
	AMP	0·035 ± 0·003	0·032 ± 0·002
	ΣAdNt	0·544	0·437
Überstand	ATP	0·145 ± 0·011	0·028 ± 0·004
	ADP	0·090 ± 0·005	0·067 ± 0·007
	AMP	0·088 ± 0·011	0·260 ± 0·014
	ΣAdNt	0·323	0·355
Ges. AdNt		0·867	0·792

Die Auf trennung in Sediment und Überstand erfolgte durch 30 Minuten Zentrifugieren bei 4200 g. Angaben in μMol Adeninnukleotid/1·6 ml P₁ ± mittlerer Fehler des Mittelwertes. Durchschnittswerte aus 37 Experimenten. Der durchschnittliche Gehalt an Eiweiss betrug 5 mg/1·6 ml Fraktion P₁, so daß die angegebenen Zahlen, durch 5 dividiert, den molaren Gehalt der einzelnen Substanzen/mg Eiweiss ergeben.

unmittelbar nach der Herstellung erwiesen sich nurmehr 71% des ATP als sedimentierbar.* Auch in diesem Anteil lag etwa doppelt so viel ATP wie ADP vor. Starke Veränderungen spielten sich im Verlauf einer 30 Minuten-Inkubationsperiode bei 37° ab: Während die sedimentierbaren Adeninnukleotide nur wenig abnahmen,

* Ein Freiwerden der Adeninnukleotide vor der Gewinnung der Fraktion P₁ würde ihre Erfassung in dieser Fraktion ausschließen.

erfolgte im Überstand eine Verringerung besonders des ATP (rund 80%), weniger des ADP-Gehaltes (rund 30%), bei einer Anhäufung von AMP um etwa das Dreifache der 0°-Kontrolle. Das molare Verhältnis im Sediment aber blieb trotz der Inkubation gewahrt. Die starke Anhäufung von AMP im Überstand beweist, daß es zu einem Abbau der tri- und diphosphorylierten Adeninnukleotide zugunsten von AMP kam. Dieser Abbau läßt sich nicht allein auf spontane Hydrolyse der Verbindungen zurückführen, da diese sich in dem untersuchten Zeitraum, wie Kontrollversuche ergaben, weit weniger auswirkte, nämlich für ATP nur um 1–2%. Es muß demnach mit dem Vorliegen Adeninnukleotide-abbauender Fermente, insbesondere ATPasen, gerechnet werden.

Ein Vergleich der Gesamtnukleotide bei 0° und 37° zeigte einen durchschnittlichen Verlust von 9% bei der höheren Inkubationstemperatur und weist auf einen über die Stufe von AMP hinausgehenden Abbau der Nukleotide hin.

In Vorversuchen zeigte sich, daß der strukturgebundene Nukleotidanteil bei Inkubation besser erhalten blieb, wenn die Elektrolytlösung mit Trismaleat gepuffert wurde, als bei Verwendung von Tris-HCl- oder Imidazol-Puffer. Bei Inkubationsende fanden sich—in der aufgeführten Reihenfolge jeweils im Mittel aus 3 Versuchen 80.4%, 76.5 bzw. 54.5% ATP der 0°-Kontrolle wieder. Zusatz von Albumin zu Ansätzen in Trismaleat-gepuffertem Elektrolytmilieu (Endkonzentrationen von 0.2%, 0.5% und 1%) blieben ohne Auswirkung auf die oben geschilderten Resultate.

1. Die Wirkung von Liberatoren biogener Amine

Tyramin und Prenylamin setzten in Abhängigkeit von der angewandten Menge die Konzentration des strukturgebundenen Anteils der Adeninnukleotide deutlich herab (Tabelle 2a und b). Bei Reserpin fand sich dieser Effekt erst bei einer Endkonzentration von 10^{-3} M angedeutet (Tabelle 2c), während Phenoxybenzamin (10^{-5} – 10^{-3} M) ohne nachweisbare Wirkung blieb (Tabelle 2d), desgleichen Chlorpromazin (10^{-4} M) (Tabelle 2e).

In vier weiteren Versuchen, in denen nur der ATP-Gehalt des Sedimentes gemessen worden war, zeigte dieser nach Anwendung von 10^{-3} M Phenoxybenzamin gegenüber

TABELLE 2 (a)–(e). BESTAND AN ADENINNUKLEOTIDEN IN FRAKTION P₁ NACH 30 MINUTEN INKUBATION BEI 37° IN TRIS-MALEAT-GEPUFFERTER KOCHSALZLÖSUNG UNTER ZUSATZ VERSCHIEDENER LIBERATOREN BIOGENER AMINE

(a)	n = 1	Kontrolle	Tyramin (M)			
			10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
Sediment	ATP	0.274	0.290	0.269	0.205	0.046
	ADP	0.117	0.106	0.107	0.083	0.017
	AMP	0.034	0.039	0.038	0.029	0.018
	ΣAdNt	0.425	0.435	0.414	0.317	0.081
Überstand	ATP	0.009	0.009	0.016	0.028	0.049
	ADP	0.028	0.025	0.028	0.083	0.133
	AMP	0.243	0.254	0.254	0.320	0.264
	ΣAdNt	0.280	0.288	0.298	0.431	0.446
	Ges. AdNt	0.705	0.723	0.712	0.748	0.527

(b)	n = 3	Kontrolle	Prenylamin (M)		
			10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Sediment	ATP	0.300	0.292	0.196	0.009
	ADP	0.115	0.114	0.074	0.012
	AMP	0.024	0.023	0.021	0.005
	ΣAdNt	0.439	0.429	0.291	0.026
Überstand	ATP	0.015	0.009	0.033	0.187
	ADP	0.044	0.041	0.101	0.245
	AMP	0.295	0.283	0.195	0.151
	ΣAdNt	0.354	0.333	0.329	0.583
Ges.AdNt		0.793	0.762	0.620	0.609

(c)	n = 3	Kontrolle	Reserpin (M)		
			10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Sediment	ATP	0.323	0.321	0.331	0.283
	ADP	0.136	0.131	0.129	0.112
	AMP	0.031	0.033	0.033	0.028
	ΣAdNt	0.490	0.485	0.473	0.423
Überstand	ATP	0.015	0.013	0.008	0.011
	ADP	0.039	0.039	0.037	0.059
	AMP	0.295	0.294	0.295	0.303
	ΣAdNt	0.349	0.346	0.340	0.373
Ges.AdNt		0.839	0.831	0.813	0.796

(d)	n = 2	Kontrolle	Phenoxybenzamin (M)		
			10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Sediment	ATP	0.180	0.175	0.169	0.181
	ADP	0.060	0.058	0.056	0.062
	AMP	0.021	0.021	0.022	0.024
	ΣAdNt	0.261	0.254	0.247	0.267
Überstand	ATP	0.031	0.043	0.087	0.098
	ADP	0.079	0.089	0.110	0.103
	AMP	0.222	0.205	0.142	0.107
	ΣAdNt	0.332	0.337	0.339	0.308
Ges.AdNt		0.593	0.591	0.586	0.575

(e) n = 3		Kontrolle	Chlorpromazin (10^{-4} M)
Sediment	ATP	0.236	0.222
	ADP	0.103	0.092
	AMP	0.028	0.025
	Σ AdNt	0.367	0.339
Überstand	ATP	0.041	0.068
	ADP	0.085	0.113
	AMP	0.246	0.234
	Σ AdNt	0.372	0.415
Ges. AdNt		0.739	0.754

Die Auf trennung in Sediment und Überstand erfolgte durch 30 Minuten Zentrifugieren bei 4200 g. Angaben in μ Mol Adeninnukleotid/1.6 ml P₁. Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl (n) von Versuchen.

den Kontrollen einen Anstieg um durchschnittlich 18 %. Die um ein- bzw. zwei Zehnerpotenzen niedrigere Konzentrationen an Phenoxybenzamin verursachten dagegen keine Abweichungen von den Kontrollen.

Es fiel weiterhin auf, daß es im Überstand der mit Chlorpromazin, Prenylamin und Phenoxybenzamin versetzten Proben zu einer Anhäufung von ATP und ADP bei gleichzeitigem Absinken des AMP-Gehaltes kam. Ausnahme hiervon bildete lediglich Reserpin.* Nach Tyramin nahm nicht nur ATP und ADP, sondern auch AMP im Überstand zu. Nennenswerte Veränderungen der Gesamtsumme an Nukleotiden waren lediglich nach Anwendung derjenigen Konzentrationen an Tyramin und Prenylamin zu verzeichnen, die zu starken Verlusten am strukturgebundenen Anteil geführt hatten.

2. Verschiedene Fermente

Die beiden Proteasen Thrombin und Trypsin führten in keinem Fall zu einer Abnahme des strukturgebundenen ATP, wie es nach den an intakten Blutplättchen gewonnenen Ergebnissen zu erwarten gewesen wäre (Tabelle 3a und 3b). Auch im Überstand fanden sich keine eindeutigen Verschiebungen, gemessen an den Kontrollwerten. Die Kombination der Enzyme mit Calcium, die an intakten Plättchen zu einer Verstärkung der proteolytischen Effekte führte, ergab Veränderungen in der Art, wie sie durch Calciumionen allein hervorgebracht wurden. Dieses kann gleichzeitig als Beweis dafür herangezogen werden, daß eine nennenswerte Verunreinigung der Fraktion P₁ durch intakte Blutplättchen nicht vorliegt.

Lysozym blieb ebenso wie die Proteasen ohne Einfluß auf die gemessenen Parameter (Tabelle 3b). Lipase dagegen führte in vier Versuchen ohne Ausnahme zu einer starken Senkung der Spiegel der drei strukturgebundenen Adeninnukleotide (Tabelle 3c).

3. Membranschädigende Stoffe bzw. Eingriffe

Aus Tabelle 4a geht hervor, daß destilliertes Wasser als Inkubationsmilieu schon bei 0° ein nahezu vollständiges Verschwinden der strukturgebundenen Adeninnukleotide hervorruft. ATP und ADP häuften sich im Überstand des Aqua dest.-Milieus bei

* Die Zunahme von ADP im Überstand nach 10^{-3} M Reserpin ist durch einen extrem hohen Wert in einem Versuch bedingt, so daß ihr kaum Bedeutung zugemessen werden kann.

TABELLE 3 (a)–(c). DAS VERHALTEN DER ADENINNUKLEOTIDE IN FRAKTION P₁ UNTER DEM EINFLUß VERSCHIEDENER FERMENTE

(a)	n = 4	Kontrolle	Thrombin (5 E/ml) + Ca (10 ⁻² M)
Sediment	ATP	0.507	0.523
	ADP	0.184	0.206
	AMP	0.032	0.025
	ΣAdNt	0.723	0.754
Überstand	ATP	0.016	0.025
	ADP	0.032	0.030
	AMP	0.152	0.154
	ΣAdNt	0.200	0.209
Ges. AdNt		0.923	0.963
			0.965

(b)	n = 2	Kontrolle	Trypsin (500 E/ml)	Lysozym (500 E/ml)
Sediment	ATP	0.368	0.390	0.365
	ADP	0.139	0.156	0.139
	AMP	0.022	0.030	0.029
	ΣAdNt	0.529	0.576	0.533
Überstand	ATP	0.030	0.019	0.017
	ADP	0.066	0.048	0.062
	AMP	0.335	0.325	0.333
	ΣAdNt	0.431	0.391	0.412
Ges. AdNt		0.960	0.967	0.945

(c)	n = 4	Kontrolle	Lipase (0.1 mg/ml)
Sediment	ATP	0.276	0.150
	ADP	0.084	0.046
	AMP	0.030	0.021
	ΣAdNt	0.390	0.217
Überstand	ATP	0.035	0.051
	ADP	0.085	0.103
	AMP	0.319	0.284
	ΣAdNt	0.439	0.438
Ges. AdNt		0.829	0.655

Sonstige Bedingungen s. Legende zu Tabelle 2(a)–2(e).

TABELLE 4 (a). ALIQUOTE TEILE DES AUS PLÄTTCHENHOMOGENAT ABGESETZTEN SEDIMENTES ZUR P₁-HERSTELLUNG WURDEN ENTWEDER WIE ÜBLICH MIT TRIS-MALEAT-GEPUFFERTER NaCl-LÖSUNG ("ISOTON") ODER MIT DESTILLIERTEM WASSER ("H₂O"), Z.T. UNTER ZUSATZ VON EDTA (10⁻² M) AUFGENOMMEN UND 30 MINUTEN BEI 0° ODER 37° GEHALTEN

(a)	n = 3	0°		37°		+ EDTA (37°)	
		Isoton.	H ₂ O	Isoton.	H ₂ O	Isoton.	H ₂ O
Sediment	ATP	0.483	0.044	0.429	0.011	0.491	0.023
	ADP	0.201	0.026	0.179	0.012	0.195	0.019
	AMP	0.018	0.013	0.024	0.005	0.016	0.005
	ΣAdNt	0.702	0.083	0.632	0.028	0.702	0.047
Überstand	ATP	0.089	0.446	0.031	0.053	0.131	0.551
	ADP	0.071	0.302	0.049	0.215	0.090	0.379
	AMP	0.039	0.048	0.187	0.303	0.031	0.047
	ΣAdNt	0.199	0.796	0.267	0.571	0.252	0.977
Ges. AdNt		0.901	0.879	0.899	0.599	0.954	1.024

Weitere Bedingungen s. Legende von Tabelle 2(a)–2(e).

TABELLE 4 (b)–(c). DIE BEEINFLUSSUNG DER ADENINNUKLEOTIDE IN FRAKTION P₁ DURCH VERSCHIEDENE MEMBRANSCHÄDIGENDE AGENZIEN. WEITERE BEDINGUNGEN S. LEGENDE VON TABELLE 2 (a)–(e)

(b)	n = 2	Kontrolle	Ouabain (10 ⁻⁵ M)	(n = 3)		Triton (5%)
				Kontrolle	Digitonin (10 ⁻⁵ M)	
Sediment	ATP	0.235	0.241	0.602	0.570	0.008
	ADP	0.068	0.069	0.225	0.220	0.003
	AMP	0.027	0.022	0.028	0.024	0.000
	ΣAdNt	0.330	0.332	0.855	0.814	0.011
Überstand	ATP	0.016	0.017	0.022	0.017	0.058
	ADP	0.051	0.046	0.029	0.027	0.291
	AMP	0.293	0.295	0.174	0.115	0.167
	ΣAdNt	0.360	0.358	0.225	0.159	0.516
Ges. AdNt		0.690	0.690	1.080	0.973	0.527
(c)	n = 3	Kontrolle	P-Lipase D (0.05 E/ml)			
				ATP	0.279	0.247
				ADP	0.087	0.067
				AMP	0.032	0.025
ΣAdNt		0.398		0.339		
Überstand		ATP	0.018	*		
				*		
				*		
				ΣAdNt	0.406	
Ges. AdNt		0.804				

* wegen störender Beeinflussung der Meßmethode durch Phospholipase D keine Angaben möglich.

Eisbadtemperaturen und unter EDTA (10^{-2} M) auch bei 37° an. Dagegen blieben bei dieser Temperatur die im Überstand vorhandenen nukleotidabbauenden Fermente offensichtlich auch im hypotonen Milieu weitgehend aktiv. Etwa ein Drittel der Gesamtnukleotide wurde dabei über die AMP-Stufe hinaus abgebaut. EDTA unterdrückte diesen Effekt.

Ouabain (10^{-5} M) zeigte keinerlei, Digitonin, in gleicher Konzentration angewandt, keine sicheren Effekte (Tabelle 4b). In einem weiteren Versuch führte 6.9×10^{-3} M Digitonin zu einem Verlust von 92.4% des strukturgebundenen ATP. Triton in einer Endkonzentration von 5% löste ATP völlig von seiner Bindung an die Struktur unter Anhäufung von ADP im Überstand ab (Tabelle 4b). Schon 0.1% Triton bewirkte eine Abnahme von 29% ATP im Sediment.

Die geringe Abnahme der absetzbaren Adeninnukleotide nach Phospholipase D ist durch das Resultat von nur einem von drei Versuchen bedingt und erscheint deshalb wenig sicher (Tabelle 4c). Auffällig war hier dagegen der extreme Abfall der Nukleotide im Überstand, der sich als störende Beeinflussung der Bestimmungsmethode herausstellte.

4. Zur Charakterisierung der ATPase-Aktivität

Aus den bisher geschilderten Ergebnissen ergibt sich zwingend die Anwesenheit eines oder mehrerer ATP-abbauender Enzyme in Fraktion P₁. Aus den in Tabelle 1 angegebenen Werten sowie früher beschriebenen Daten läßt sich eine mittlere Abbaurate von $0.072 \mu\text{Mol ATP}/\text{mg Protein}/60 \text{ min}$ bei 37° errechnen.

Auch die beiden anderen, aus den Plättchenhomogenaten gewonnenen partikelhaltigen Fraktionen wiesen eine ATPase-Aktivität auf, die imstande war, innerhalb 30 Minuten bei 37° mehr als $0.269 \mu\text{Mol}$ zugefügtes ATP/ 1.6 ml Fraktion vollständig abzubauen. Lediglich in der löslichen Fraktion war keinerlei ATP-spaltende Aktivität enthalten.

Nahezu die gesamte ATP-Menge, die nach 30 Minuten bei 37° in P₁ nachweisbar war, ließ sich sedimentieren (88%), und scheint so dem Angriff der ATPasen entzogen zu sein. Anders dagegen von außen zugeführtes, das fast vollständig gespalten wurde (Tabelle 5). Weitere Versuche ergaben, daß die Enzymaktivität fest an der Struktur

TABELLE 5. DER ATP-GEHALT IN DER DURCH ZENTRIFUGIEREN IN SEDIMENT UND ÜBERSTAND AUFGETRENNNTEN FRAKTIION P₁ NACH 30 MINUTEN INKUBATION BEI 37°

	Sediment	Überstand
Ohne Zusatz	0.294	0.023
+ ATP	0.313	0.088

Zu Inkubationsbeginn wurde jeweils einer Probe $0.270 \mu\text{Mol ATP}$ zugefügt. Angaben in $\mu\text{Mol ATP}/1.6 \text{ ml Fraktion P}_1$.

haftet. Auch nach zweimaligem Waschen wurde zugesetztes ATP zu 55% und damit kaum weniger als durch das frisch gewonnene Sediment (58%) gespalten. Der Überstand der ersten Waschung baute nur 16.3%, derjenige nach der zweiten Waschung nur 4.1% des zugegebenen ATP ab.

Zusatz von Kaliumionen in physiologischen Konzentrationen (5·6 mM) veränderte die Werte gegenüber Ergebnissen mit kaliumfreien Lösungen praktisch nicht. Erst eine Erhöhung der Kaliumionen auf das Zehnfache (unter entsprechender Reduktion der Natriumionen zur Erhaltung der Osmolarität) erbrachte neben einem geringfügigen Abfall der Nukleotide im Sediment deren Anhäufung im Überstand (Tabelle 6a). Nach Zusatz von Magnesiumionen (10^{-2} M) fand sich eine zwar nur geringfügige, aber in insgesamt 5 Versuchen ausnahmslos wiederkehrende Anhebung der Konzentrationen der drei Adeninderivate im Sediment.* Eine Erhöhung dieser Werte trat bei einer Endkonzentration an Magnesiumionen von 10^{-3} M in keinem von zwei Versuchen auf (Tabelle 6b).

TABELLE 6 (a)-(d). DER GEHALT AN ADENINNUKLEOTIDEN IN FRAKTION P₁ NACH ANWENDUNG VERSCHIEDENER AN ATPASEN ANGREIFENDER SUBSTANZEN.

(a)	n = 3	Kontrolle	K ⁺ (5·6 mM)	K ⁺ (56 mM)
Sediment	ATP	0·363	0·366	0·315
	ADP	0·139	0·150	0·120
	AMP	0·036	0·036	0·029
	ΣAdNt	0·538	0·552	0·464
Überstand	ATP	0·027	0·021	0·048
	ADP	0·053	0·047	0·089
	AMP	0·178	0·161	0·230
	ΣAdNt	0·258	0·229	0·367
Ges.AdNt		0·796	0·781	0·831

(b)	Kontrolle (n = 3)	Mg ²⁺ (10^{-2} M)	Kontrolle (n = 4)	Ca ²⁺ (10^{-2} M)
Sediment	ATP	0·256	0·324	0·382
	ADP	0·127	0·129	0·154
	AMP	0·026	0·033	0·037
	ΣAdNt	0·409	0·486	0·573
Überstand	ATP	0·031	0·017	0·100
	ADP	0·112	0·039	0·081
	AMP	0·127	0·212	0·152
	ΣAdNt	0·270	0·268	0·333
Ges.AdNt (37°)		0·679	0·754	0·906
Ges.AdNt (0°)			0·874	

* Die beiden nicht aufgeführten Versuche sind nicht in die Tabelle aufgenommen worden, weil ihre Unvollständigkeit die Aufstellung der Bilanz nicht erlauben würde.

(c)	n = 3	Kontrolle	EDTA (10 ⁻² M)	Kontrolle	N ⁻³ (10 ⁻² M)
Sediment	ATP	0.319	0.320	0.261	0.284
	ADP	0.123	0.120	0.116	0.131
	AMP	0.031	0.026	0.042	0.032
	ΣAdNt	0.473	0.466	0.419	0.447
Überstand	ATP	0.050	0.338	0.020	0.032
	ADP	0.106	0.201	0.058	0.062
	AMP	0.237	0.061	0.297	0.259
	ΣAdNt	0.393	0.600	0.375	0.353
Ges.AdNt		0.866	1.066	0.794	0.800

(d)	Kontrolle (n = 4)	Cystein (10 ⁻² M)	MJE (10 ⁻² M)	Kontrolle (n = 3)	NEM (10 ⁻² M)	Mersaryl (10 ⁻² M)
Sediment	ATP	0.257	0.036	0.047	0.319	0.091
	ADP	0.114	0.040	0.020	0.123	0.031
	AMP	0.026	0.018	0.019	0.031	0.018
	ΣAdNt	0.397	0.094	0.086	0.473	0.140
Überstand	ATP	0.027	0.604	0.051	0.050	0.051
	ADP	0.096	0.237	0.221	0.106	0.329
	AMP	0.152	0.081	0.057	0.237	0.092
	ΣAdNt	0.275	0.922	0.329	0.393	0.472
Ges.AdNt		0.672	1.016	0.415	0.866	0.612

* Wegen störender Beeinflussung der Methode durch Mersaryl keine Angaben möglich.
Weitere Bedingungen s. Legende von Tabelle 2(a)–(c).

Calciumionen (10⁻² M) riefen im Sediment ähnliche Erscheinungen hervor wie Mg²⁺. Im Überstand dagegen fiel eine starke Inhibition des ATP-Abbaus um fast das Sechsfache gegenüber dem Kontrollwert auf. ADP lag hier ebenfalls vermehrt vor bei gleichzeitiger Verringerung von AMP. Die aufgeführten Effekte waren bei 10⁻³ M weniger ausgeprägt (Tabelle 6b).

Auch nach Zugabe von EDTA (10⁻² M) fand sich bei praktisch unveränderten Werten der strukturgebundenen Adeninnukleotide eine deutliche Hemmung der ATPase-Aktivität im Überstand um den Faktor 6, desgleichen eine Vermehrung der ADP- und eine Reduktion der AMP-Werte (Tabelle 6c).

Beim Einsatz von vier Stoffen, Cystein, Mersaryl,* Monojodessigsäure und N-Aethylmaleimid, welche SH-Gruppen beeinflussen, ergab sich ein übereinstimmendes Verhalten der Adeninnukleotide im Sediment bei verschiedenartiger Beeinflussung des im Überstand befindlichen Anteils (Tabelle 6d). Im Sediment kam es nach Zusatz der vier aufgeführten Substanzen (Endkonzentration jeweils 10⁻² M) ausnahmslos in jedem Einzelversuch zu erheblichen Verlusten an ATP, ADP und AMP. Cystein verursachte in allen Experimenten im Überstand einen extremen Anstieg der ATP-Werte um durchschnittlich den Faktor 22. Die anderen drei Substanzen müssen

* Wegen störender Beeinflussung der Bestimmungsmethoden war nach Mersaryl lediglich die Beurteilung des ATP-Gehaltes möglich.

TABELLE 7. DIE DURCH DIE TABELLIERTEN SUBSTANZEN VERURSACHTE ABNAHME AN ATP, ADP UND AMP IM SEDIMENT DER FRAKTION
 P_1 IST IN PROZENTEN DER PARALLEL OHNE ZUSÄTZE GEFÜHRten KONTROLLANSÄTZE ANGEgeben

	0° - 37° ("Kontrollen")	SH-Gruppen-Hemmer			Aminfreisetzende Stoffe			Membranschädigende Stoffe			
		K^+ 56 mM	Cystein 10^{-2} M	Mercapto- säyl 10^{-2} M	NEM 10^{-2} M	Resci- pin 10^{-3} M	Tyra- min 10^{-3} M	Prenyl- amin 10^{-4} M	Tri- ton 5%	Osmo- lyse 10^{-3} M	P-Lipase D 10^{-3} M
ATP	84	13.3	85.8	92.9	81.6	71.7	14	20.9	34.8	99	97
ADP	76	14.0	64.1	97.8	82.6	74.6	17.7	25.3	36.2	99	93
AMP	91	9.5	—	100.0	25.3	43.6	16.2	17.4	15	100	80
										29.7	20.8

ebenfalls als Hemmer der vorliegenden ATP-spaltenden Fermente angesehen werden, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie Cystein. Auch ADP häufte sich im Überstand an, während AMP in allen Fällen gegenüber den entsprechenden Kontrollen deutlich abgefallen war, am wenigsten nach Anwendung von Cystein.

Die Anhäufung von ATP im Überstand wird im Fall von NEM und Mersalyt aus den Angaben der Tabelle nicht deutlich, weil durch einen außergewöhnlich hohen ATP-Wert mit $0.098 \mu\text{Mol}/1.6 \text{ ml P}_1$ der höchste von allen überhaupt gemessenen Kontrollen ($n = 37$) in einem der drei Kontrollversuche der mittlere ATP-Gehalt dieser Gruppe stark angehoben ist.

In Experimenten mit Natriumazid (10^{-2} M) zeichnete sich die Tendenz eines geringfügigen Anstieges von ATP und ADP im Sediment sowie eine Abnahme von AMP im Überstand ab. Dagegen trat in allen Einzelversuchen deutlich ausgeprägt eine Hemmung der ATP-lytischen Enzyme ein (Tabelle 6c).

Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol konnte wegen störender Farbeffekte bei der angewandten Konzentration von 10^{-2} M nur im Sediment beurteilt werden. Es zeigten sich keine Unterschiede zu den Kontrollen.

DISKUSSION

Aus den im Ergebnisteil dargestellten Befunden gehen mehrere Gesetzmäßigkeiten hervor:

(1) Alle Substanzen,* die im Sediment von P_1 den ATP-Spiegel senken, rufen den gleichen Effekt an ADP und—mit einer Ausnahme (Cystein)—auch an AMP hervor (56 mM Kalium, Cystein, Monojodessigsäure, NEM, Reserpin 10^{-3} M , Tyramin, Prenylamin, Triton, Lipase und Phospholipase D sowie Osmolyse) (s. hierzu Tabelle 7).

(2) Die meisten dieser Substanzen führen im Überstand von P_1 zu einer Anhäufung von ATP, wenn auch in unterschiedlichem Maße. Ausnahmen bilden nur Reserpin und Osmolyse.

(3) Daneben gibt es Stoffe, die den ATP-Gehalt im Überstand von P_1 anheben, aber die stationären ATP-Konzentrationen im Sediment nicht senken. Das trifft für Calcium, EDTA, Chlorpromazin und Phenoxybenzamin zu.

(4) Substanzen,† die eine Anreicherung von ATP im Überstand induzieren, bewirken dort auch eine Anhebung der ADP-Konzentrationen bei gleichzeitiger Verminderung des AMP-Gehaltes.

Ausnahmen bildeten Kalium (56 mM) und Tyramin, die trotz ihres ATPase-hemmenden Effektes einen Anstieg von AMP im Überstand verursachten, sowie Triton, nach dessen Zugabe die AMP-Konzentrationen durchschnittlich nur 4% unter dem Niveau der Kontrollen lagen.

(5) Eine bessere Erhaltung‡ von ATP im Sediment von P_1 war angedeutet nach Zugabe von Ca^{2+} , Mg^{2+} , 10^{-3} M Phenoxybenzamin und Natriumazid zu beobachten. Um sichere Effekte handelt es sich hierbei nicht. Allerdings spricht—soweit gemessen—die Parallelität des Verhaltens der ADP- und AMP-Konzentrationen im Sediment für die Realität des Ergebnisses.

* Hinsichtlich Mersalyt vergl. die Fußnote auf S. 7.

† Hinsichtlich Mersalyt vergl. die Fußnote auf S. 7.

‡ Eine Neubildung von ATP lässt sich gegen die genannte Möglichkeit in unserer Versuchsanordnung nicht abgrenzen.

Es lassen sich demnach bei den Inhibitoren der ATPase(n) zwei Gruppen unterscheiden: Die erste umfaßt solche, welche die stationären Konzentrationen der strukturgebundenen Adeninnukleotide weitgehend unverändert lassen (Calcium, EDTA, Chlorpromazin, Phenoxybenzamin und Azid), die zweite wird von denjenigen gebildet, die zusätzlich zu einem Verlust an den genannten Adeninnukleotiden führen (Kalium 56mM, Cystein, Mersalyl, Monojodessigsäure, Tyramin, Prenylamin, Triton und Lipase). Die Anhäufung von ATP im Überstand ist nicht durch das Freiwerden des Nukleotids aus Speicherstrukturen zu erklären, da selbst größere Mengen zugesetztes ATP durch die im Überstand vorhandenen ATPasen unter den angewandten Bedingungen abgebaut werden.

Die aufgefundenen ATPase-Aktivität wird durch die genannten Substanzen quantitativ verschieden stark gehemmt. Am wirksamsten erweisen sich Cystein, EDTA, Ca^{2+} , sowie die drei Amine freisetzenden Stoffe Prenylamin, Tyramin und Phenoxybenzamin. Ohne Einfluß bleiben Natrium- und Magnesiumionen, Reserpin, Ouabain, Digitonin, sowie die Fermente Trypsin, Thrombin, Lysozym und Phospholipase D.

Die Frage nach der Einheitlichkeit der von uns aufgefundenen ATPase-Aktivität muß zunächst offen bleiben. Ein Vergleich der von verschiedenen Untersuchern an ATPasen aus Blutplättchen erhobenen Befunden mit unseren Ergebnissen ist der unterschiedlichen Bedingungen wegen kaum durchführbar (Literaturübersicht s. bei Bettex-Galland und Maupin,¹⁰ Marcus und Zucker,¹¹). Sicher ist jedoch, daß die in Fraktion P₁ beobachtete ATPase-Aktivität nicht identisch ist mit dem von Bettex-Galland und Lüscher¹² beschriebenen Thrombosthenin.

Diese Autoren fanden z.B. Thrombosthenin in Plättchenlysaten nach Anwendung von 20 000 g über 60 Minuten im Überstand wieder (Bettex-Galland und Lüscher,¹³ während die von uns beschriebene Aktivität aus Plättchenhomogenaten nach Zentrifugieren mit 3000 g (30 Minuten) sedimentiert. Auch in ihrer Beeinflussbarkeit durch Calcium- und Magnesiumionen unterscheiden sich beide ATPase-Arten.

Beim Vergleich von ATPasen aus Mitochondrien, Zellaußenmembranen, aminspeichernden Vesikeln und mikrosomalen Membranen mit der in Fraktion P₁ vorliegenden Enzymaktivität wurde eine vollkommene Übereinstimmung der Eigenschaften in keinem Fall gefunden. Allerdings schränken auch hier die verschiedenartigen Versuchsbedingungen, zu denen sich Organ- und Speziesdifferenzen hinzugesellen, diese Beurteilung ein.

Die Bedeutung der hier untersuchten ATPase-Aktivität könnte im Zusammenhang mit neueren Ergebnissen von Poisner und Trifaro¹⁴ gesehen werden, die dafür sprechen, daß eine ATPase, die den Katecholamingrana als zugehörig postuliert wird, ein wichtiges Glied im Ablauf der zur Aminfreisetzung notwendigen Reaktionskette bildet. Außer in isolierten chromaffinen Grana des Nebennierenmarkes (Hillarp,¹⁵ Banks,¹⁶) wurden ATPasen auch in Noradrenalin-haltigen Vesikeln des Herzens, des sympathischen Ganglion stellatum in postganglionären sympathischen Rindermilznerven sowie in den Vasopressingrana aus dem Hinterlappen der Rinderhypophyse nachgewiesen.¹⁷⁻²⁰

Eingangs wurde die mögliche Verwandtschaft der in Blutplättchen nachgewiesenen serotonininhaltigen Vesikel mit dem Organellentyp, der in verschiedenen, amintragenden Zellen des Nebennierenmarks, des Zentralnervensystems und in vegetativen Nervenfasern vorkommt, erwähnt. Als Objekt für Untersuchungen über das *in vitro*-Verhalten von ATP in solchen isolierten Strukturen dienten vorwiegend chromaffine Grana aus dem

Nebennierenmark von Rindern. Inkubation bei 37° führte—neben einer Abgabe von Katecholaminen, auf die wir an anderer Stelle zurückkommen⁸—zu einem Verlust an ATP (Literaturübersicht siehe bei Holtz u. Palm,²¹). Eine stärkere bis vollständige Abnahme des ATP-Gehaltes wurde nach Zusatz von Prenylamin^{22, 23}, 4×10^{-4} M Phenoxybenzamin^{24, 25} sowie Reserpin^{23, 26} gefunden. Da Prada *et al.*²⁷ beobachteten in isolierten Serotonin-Organellen aus Kaninchenplättchen übereinstimmend mit unseren Befunden ebenfalls keine nennenswerte Veränderung des ATP-Gehaltes. Tyramin dagegen setzte, wie Schümann und Philipp²⁸ zeigten, wohl die Katecholamine frei, bewirkte aber keinen Abfall des ATP-Bestandes. Es bestehen demnach Unterschiede in der Beeinflußbarkeit des ATP-Spiegels von chromaffinen Grana und dem in Fraktion P₁ befindlichen strukturgebundenen ATP-Pool von Blutplättchen. Letzterer wurde weder durch Phenoxybenzamin (10^{-5} – 10^{-3} M), noch durch Reserpin (bis 10^{-4} M) verkleinert, während Tyramin im Bereich von 10^{-4} – 10^{-2} M eine konzentrationsabhängige Abnahme hervorrief.

Untersuchungen von Holmsen und Mitarbeitern,^{29, 30} ergaben, daß neben dem ATP und ADP im zytoplasmatischen Raum, welches leicht markiertes Adenosin, Adenin oder Orthophosphat mit dem äußeren Milieu austauscht, ein weiterer, schwer zugänglicher ATP-und ADP-Pool besteht. Dieser umfaßt nach Auf trennung in einem Saccharosedichtegradienten den Hauptanteil an partikelgebundenem ATP, ADP und Serotonin. Nach Holmsen *et al.*³⁰ macht dieser Pool etwa 60% des ATP- und ADP-Bestandes intakter Plättchen aus, ein Wert, der mit unseren entsprechenden Daten (rund 50%) gut übereinstimmt. Auch ATP katecholaminhaltiger Grana des Nebennierenmarkes inkorporiert ³²P-markiertes Phosphat wesentlich langsamer als mitochondrales ATP.³¹ Holmsen und Mitarbeiter wiesen weiterhin nach, daß im Verlauf von Thrombin-oder Kollageneinwirkung lediglich der nicht zu markierende Bestand an ATP und ADP aus Blutplättchen frei wird. Dieses ist ein Befund, der mit den Degranulierungsvorgängen in Plättchen (bei erhaltener Außenmembran!) und den hier entwickelten Vorstellungen in guter Übereinstimmung steht.

Zusammenfassung—Aus homogenisierten Plättchen aus Schweineblut wurde durch Absetzen bei 3000 g (30 Minuten) eine Fraktion (P₁) gewonnen, in der 86% strukturgebundenes ATP des Homogenates enthalten waren. Aliquote Teile dieser Fraktion wurden 30 Minuten bei 0° oder 37° ohne und mit verschiedenen Zusätzen inkubiert und anschließend in sedimentierbare und lösliche Anteile aufgetrennt. Es erfolgte eine Bestimmung der stationären Konzentrationen an ATP, ADP und AMP in Sediment und Überstand der Fraktion.

Es wurde die Beeinflussung dieser Adeninnukleotide durch verschiedene Pufferelemente, Kationen, SH-Gruppeninhibitoren, Cystein, Hemmer der oxydativen Phosphorylierung, EDTA, Aminliberatoren, Proteasen, membranlabilisierende Stoffe sowie Osmolyse geprüft.

Es zeigte sich, daß Substanzen, die den ATP-Spiegel im Sediment senken, den gleichen Effekt an ADP und (Cystein ausgenommen) auch an AMP hervorrufen (56 mM K⁺, Cystein, Mersalyl, Monojodessigsäure, NEM, Reserpin 10^{-3} M, Tyramin, Prenylamin, Triton, Lipase und Phospholipase D sowie Osmolyse). Außer NEM, Reserpin, Phospholipase D und Osmolyse führen diese Substanzen zu einer Anhäufung von ATP im Überstand von P₁. Andere Stoffe heben den ATP-Gehalt im Überstand von P₁ an, senken aber nicht die stationären ATP-Konzentrationen im Sediment (Ca²⁺, EDTA, Chlorpromazin und Phenoxybenzamin). Substanzen, die zu höheren Konzentrationen von ATP im Überstand von P₁ führen, zeigen den gleichen Effekt gegenüber ADP. Eine Anreicherung von ATP im Überstand zieht ein Absinken des AMP-Gehaltes nach sich. Ausgenommen hiervon sind Kalium (56 mM) und Tyramin, bei denen die AMP-Konzentration ansteigt, sowie Triton.

Fragliche Effekte auf die strukturgebundenen Nukleotide wurden nach Zugabe von Calcium, Magnesium, Phenoxybenzamin und Natriumazid beobachtet. Ohne Einfluß auf die untersuchten Größen im geprüften Konzentrationsbereich blieben Na^+ , 2,4-Dinitrophenol, die Fermente Trypsin, Thrombin und Lysozym sowie Ouabain.

Die an Fraktion P₁ gewonnenen Ergebnisse beweisen das Vorkommen einer ATPase-Aktivität, deren mögliche Bedeutung für die Freisetzung von strukturgebundenen Adeninnukleotiden aus Blutplättchen diskutiert wird. Das Verhalten dieses Adeninnukleotid-Pools unter dem Einfluß verschiedener Stoffe deckt sich nur teilweise mit dem aminhaltiger Organellen anderer Zellen.

LITERATUR

1. E. WEBER und H. MONDT, *Klin. Wschr.* **45**, 165 (1967).
2. J. P. TRANZER, M. DA PRADA und A. PLETSCHER, *Nature, Lond.* **212**, 1574 (1966).
3. B. MAY, I. J. BAK und E. WESTERMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **257**, 313 (1967).
4. E. WEBER, E. MORGENTERN und E. WALTER, *Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten*. I. Int. Symp. Wien, 17.-20.6.1968 (Herausgeber: E. DEUTSCH, E. GERLACH und K. MOSER). G. Thieme Verlag, Stuttgart (1968).
5. R. V. BAKER, H. BLASCHKO und G. V. R. BORN, *J. Physiol., Lond.* **149**, 55 (1959).
6. G. V. R. BORN, *Hämostase-Thrombogenese-Pharmakologisch wirksame Gerinnungsprodukte*, Verhandl. 6. Symp. dtsch. Arbeitsgemeinschaft f. Blutgerinnungsforschung, Erlangen 19.-20.2.1962 (Herausgeber: S. WITTE). F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart S. 107 (1963).
7. M. DA PRADA, A. PLETSCHER, J. P. TRANZER und H. KNUCHEL, *Nature, Lond.* **216**, 1315 (1967).
8. E. WEBER, B. SCHMIDT, E. MORGENTERN und H. MONDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1929 (1970).
9. E. WEBER, H. TOWLIATI und B. SCHMIDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1943 (1970).
10. M. BETTEX-GALLAND und B. MAUPIN, *Hémostase* **1**, 375 (1961).
11. A. J. MARCUS und M. B. ZUCKER, *The Physiology of Blood Platelets*. Grune & Stratton, New York und London (1965).
12. M. BETTEX-GALLAND und E. F. LÜSCHER, *Biochim. biophys. Acta* **49**, 536 (1961).
13. M. BETTEX-GALLAND und E. F. LÜSCHER, *Adv. Protein Chem.* **20**, 1 (1965).
14. A. M. POISNER und J. M. TRIFARO, *Molec. Pharmac.* **3**, 561 (1967).
15. N. Å. HILLARP, *Acta physiol. Scand.* **42**, 144 (1958).
16. P. BANKS, *Biochem. J.* **95**, 490 (1965).
17. L. T. POTTER, *Pharmac. Rev.* **18**, 439 (1966).
18. A. PHILIPPU, R. PFEIFFER, H. J. SCHÜMANN und K. LICKFELD, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **258**, 251 (1967).
19. A. BURGER, A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **262**, 208 (1969).
20. A. M. POISNER und W. W. DOUGLAS, *Science, N.Y.* **160**, 203 (1968).
21. P. HOLTZ und D. PALM, *Brenzkatechinamine und andere sympathicomimetische Amine, Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie*, Bd. 58, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966).
22. U. S. v. EULER, L. STJÄRNE und F. LISHAIKO, *Life Sci.* **3**, 35 (1964).
23. A. PHILIPPU, D. PALM und H. J. SCHÜMANN, *Nature, Lond.* **205**, 183 (1965).
24. U. S. v. EULER und F. LISHAIKO, *Acta physiol. Scand.* **57**, 468 (1963).
25. U. S. v. EULER und F. LISHAIKO, *Int. J. Neuropharmac.* **2**, 127 (1963).
26. A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.* **247**, 295 (1964).
27. M. DA PRADA, A. PLETSCHER, J. P. TRANZER und H. KNUCHEL, *Life Sci.* **7**, 477 (1968).
28. H. J. SCHÜMANN und A. PHILIPPU, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **241**, 273 (1961).
29. H. HOLMSSEN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**, 239 (1965).
30. H. HOLMSSEN, H. J. DAY und E. STORM, *Biochim. biophys. Acta* in press.
31. W. H. PRUSOFF, H. BLASCHKO, M. G. ORD und L. A. STOCKEN, *Nature, Lond.* **190**, 354 (1961).
32. E. WEBER, E. WALTER, E. MORGENTERN, H. MONDT, U. ROSE und E. KNAUDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1893 (1970).