

174. Dissoziation des Thrombosthenins in seine zwei Komponenten Untersuchung ihrer Adenosintriphosphatase-Aktivität

von M. Bettex-Galland, H. Portzehl und E. F. Lüscher

Herrn Prof. F. LEUTHARDT zum 60. Geburtstag gewidmet

(27. V. 63)

Die wachsende Erkenntnis der Bedeutung der Blutplättchen für die Blutstillung hat im Laufe der letzten Jahre zu einer bemerkenswerten Intensivierung der Erforschung dieser kleinsten zellulären Elemente des Blutes geführt.

Zwei auffallende und wichtige Eigenschaften der Plättchen stehen dabei im Vordergrund des Interesses: Einmal ihre Fähigkeit, morphologische Veränderungen, die als «visköse Metamorphose» bezeichnet werden, einzugehen, und andererseits ihre Eigenart, die Retraktion des Blutgerinnsels zu bewirken. In beiden Fällen handelt es sich bemerkenswerterweise um die Leistung mechanischer Arbeit. In diesem Zusammenhang kommt dem Vorliegen beträchtlicher Mengen eines kontraktilen Proteins in den Plättchen Bedeutung zu. Dieses Material, das 1959 erstmals in menschlichen Blutplättchen gefunden wurde¹⁾, ist seither als Thrombosthenin bezeichnet worden²⁾. GRETTE hat kürzlich seine Anwesenheit in Schweineplättchen bewiesen³⁾.

Thrombosthenin ist bei Ionenstärken unter 0,2 unlöslich; der Niederschlag kontrahiert sich in Anwesenheit von ATP⁴⁾. Darüber hinaus erweist sich Thrombosthenin als eine ATP-ase, die ATP in ADP und anorganisches Phosphat zu spalten vermag²⁾. Alle diese Eigenschaften weisen auf eine enge Verwandtschaft mit den Aktomyosinen hin. Die relativ geringe ATP-ase-Aktivität lässt das Thrombosthenin ähnlicher dem von HOFFMANN-BERLING⁵⁾ beschriebenen kontraktilen Protein aus Tumorzellen als den besser untersuchten Muskelaktomyosinen erscheinen.

Thrombostheninlösungen zeigen auf Zusatz von ATP einen typischen Abfall der Viskosität, d. h. sie zeigen wie die Muskelaktomyosine sog. «ATP-Empfindlichkeit»^{1) 2)}. Als Erklärung für dieses Verhalten wird allgemein eine Dissoziation des Aktomyosin-Komplexes in seine Bausteine Aktin und Myosin angenommen. Mit Erfolg ist seither der Versuch unternommen worden, auch Thrombosthenin in die entsprechenden Komponenten aufzuspalten und diese einzeln zu untersuchen⁶⁾. In Anlehnung an das Aktin und Myosin des Muskels wurden die Thrombosthenin-Bausteine als «Thrombosthenin A» und «Thrombosthenin M» bezeichnet. Über die Isolierung und die Eigenschaften dieser Komponenten, insbesondere ihre ATP-ase-Eigenschaften wird hier berichtet werden.

¹⁾ M. BETTEX-GALLAND & E. F. LÜSCHER, *Nature* 184, 276 (1959).

²⁾ M. BETTEX-GALLAND & E. F. LÜSCHER, *Biochim. biophys. Acta* 49, 536 (1961).

³⁾ K. GRETTE, *Acta physiol. scand.* 56, Supplementum 195 (1962).

⁴⁾ Abkürzungen: ATP Adenosintriphosphorsäure; ADP Adenosindiphosphorsäure; EDTA Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatrium-Salz; P_i anorganisches Phosphat.

⁵⁾ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. biophys. Acta* 19, 453 (1956).

⁶⁾ M. BETTEX-GALLAND, H. PORTZEHL & E. F. LÜSCHER, *Nature* 193, 777 (1962).

Material und Methoden. – *Blutplättchen*: Konzentrierte Suspensionen, enthaltend 20–30 · 10⁶ Plättchen/mm³ wurden aus plättchenreichem Plasma durch Zentrifugation bei 1500 g während 30 Min. erhalten, wobei nach früher beschriebenen Angaben vorgegangen wurde⁷⁾.

Thrombosthenin: Den Plättchensuspensionen wurde konzentrierte WEBER-EDSALL-Lösung zugesetzt (3 M KCl; 0,05 M Na₂CO₃; 0,2 M NaHCO₃), so dass die Endkonzentration an KCl 0,5 M beträgt. Die Plättchen wurden sodann durch Zugabe von 0,1% Digitonin lysiert. Das Gemisch wurde über Nacht bei 0° stehengelassen und dann 60 Min. bei 20000 g zentrifugiert. Nach Zusatz desselben Volumens Glycerin (MERCK, *pro analysi*, $d = 1,23$) kann das Überstehende während 2–3 Wochen bei –5° aufbewahrt werden. Die weitere Reinigung des Thrombosthenins vollzieht sich durch zwei Umfällungen der Rohextrakte (oder der Glycerinlösungen) mit bidestilliertem Wasser, indem die Ionenstärke auf 0,05 μ gesenkt wird. Nach jedem Ausfällen wird der Niederschlag durch Erhöhen der Ionenstärke auf 0,4 μ wieder gelöst. Hierzu dient eine gepufferte KCl-Lösung folgender Zusammensetzung: 2,9 M KCl; 0,2 M Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,0.

So hergestellte Thrombostheninlösungen weisen eine Konzentration von ca. 1% auf; ihre ATP-Empfindlichkeit beträgt ~90%. Die mittlere ATP-Spaltung, gemessen bei pH 7, 0,08 μ und 20°, beträgt 0,0057 μ M P_i/Min. × mg Protein (4 Versuche mit Doppelbestimmungen).

Thrombosthenin M wird aus einer Thrombostheninlösung bei $\mu = 0,05$ und 10⁻³ M ATP durch 10⁻⁶ M Polyäthensulfonat (HOECHST, MG. = 30000) ausgefällt. Zur Entfernung des ATP und des Polyäthensulfonates wird der Niederschlag in gepuffertem KCl bei 0,4 μ gelöst, bei 0,05 μ umgefällt und schliesslich zu ca. 1-proz. Lösung in KCl-Puffergemisch bei 0,4 μ gelöst. Die Ausbeute, bezogen auf das Thrombosthenin, beträgt 10–20%.

Thrombosthenin A: Zur Herstellung wurde im Prinzip nach BARANY, BARANY und GUBA⁸⁾ vorgegangen. Das Acetontrockenpulver wurde bei 0° hergestellt, und in einigen Fällen wurden Zentrifugationen durch Dialysen ersetzt, um Materialverluste zu verringern.

Als Ausgangsmaterial dient ein zweimal mit dem 10fachen Volumen 0,15 M NaCl enthaltend 1% EDTA ausgewaschenes Plättchensediment. Diese Plättchenmasse wird im gleichen Volumen einer 0,4-proz. NaHCO₃-Lösung aufgeschlämmt, der zudem 0,1% EDTA (pH = 7) zugesetzt sind. Diese Suspension wird 2 Min. bei 15000 U./Min. mechanisch homogenisiert, dann mit dem vierfachen Volumen derselben Hydrogencarbonatlösung verdünnt und 18 Std. gegen bidestilliertes Wasser, das dreimal gewechselt wird, dialysiert. Die dialysierte Suspension wird darauf bei 15000 g 30 Min. zentrifugiert und der Niederschlag einmal mit Wasser ausgewaschen. Dann wird das Sediment zweimal bei –5° mit vorgekühltem Aceton extrahiert und schliesslich an der Luft getrocknet und bei –5° über CaCl₂ aufbewahrt.

Das Acetontrockenpulver wird mit 15 Volumteilen, bezogen auf Trockengewicht, folgender Lösung versetzt und extrahiert: KJ 0,3 M; ATP 5 × 10⁻⁴ M; Phosphatpuffer pH 7, 0,02 M. Nach 60minütigen Stehen bei Zimmertemperatur wird zentrifugiert und das Überstehende bei 0° 48 Std. dialysiert. Zusammensetzung der Aussenlösung (2 Wechsel): 0,1 M KCl; 0,001 M MgSO₄; 0,016 M NaHCO₃. Die Proteinkonzentration des so erhaltenen Thrombosthenin-A beträgt in der Regel weniger als 1%. Je nach Notwendigkeit wird die Ionenstärke durch Zugabe der gepufferten KCl-Lösung eingestellt. Das Thrombosthenin A spaltet kein P_i aus ATP und ist ATP-unempfindlich.

Myosin aus Kaninchen-Skelettmuskel wurde nach der KJ-Methode von SZENT-GYÖRGYI⁹⁾ hergestellt. Diese Lösung kann bei –5° nach Zusatz desselben Volumens Glycerin (MERCK, *pro analysi*, $d = 1,23$) aufbewahrt werden. Vor Gebrauch wird sie bei 0,025 μ gefällt und der Niederschlag bei der gewünschten Ionenstärke gelöst.

Aktin aus Kaninchenmuskel wurde ebenfalls nach der Methode von BARANY *et al.*⁸⁾, ohne vorherige Extraktion des Myosins, isoliert.

Bestimmung des anorganischen Phosphates (P_i) nach MARTIN & DOTY¹⁰⁾.

ATP-Empfindlichkeit: Die Viskositätsmessungen wurden in einem Kapillarviskosimeter bei 20° und $\mu = 0,55$ ausgeführt. Aus den erhaltenen Werten wurde die ATP-Empfindlichkeit nach den Angaben von PORTZEHL, SCHRAMM & WEBER¹¹⁾ errechnet.

⁷⁾ M. BETTEX-GALLAND & E. F. LÜSCHER, *Thromb. Diath. haem.* 4, 178 (1960).

⁸⁾ M. BARANY, K. BARANY & F. GUBA, *Nature* 179, 818 (1957).

⁹⁾ A. G. SZENT-GYÖRGYI, *J. biol. Chemistry* 192, 361 (1951).

¹⁰⁾ J. B. MARTIN & D. M. DOTY, *Analyt. Chemistry* 21, 965 (1949).

Resultate und Diskussion. – Die aus dem Viskositätsverhalten nach ATP-Zusatz erwartete Aufspaltung des Thrombosthenins in zwei dem Aktin und Myosin des Muskelaktomyosins vergleichbare Komponenten wird durch die Isolierung derselben bestätigt. Thrombosthenin A und Thrombosthenin M können aus menschlichen Blutplättchen unter Verwendung der vom Muskel her bekannten Methoden extrahiert werden.

Der Effekt von Polyäthensulfonat: Die Zugabe von Polyäthensulfonat zu Muskelaktomyosin bewirkt, dass schon bei geringeren Ionenstärken unter ATP-Einfluss eine Dissoziation des Komplexes eintritt¹²⁾. Es zeigt sich, dass derselbe Effekt auch gegenüber Thrombosthenin beobachtet werden kann; auch hier wirkt das Polyäthensulfonat als «Interaktionsinhibitor».

Die Isolierung von Thrombosthenin M stellt eine Nutzenanwendung dieses dissoziationsfördernden Effekts des Polyäthensulfonates dar. Die beim Muskel übliche fraktionierte Extraktion des Myosins basiert auf der geordneten Faserstruktur der Fibrillen. Eine solche Struktur fehlt bei den Blutplättchen völlig. Die auf die hier beschriebene Weise erhaltenen Thrombosthenin-M-Präparate zeigen immer noch eine Verunreinigung durch Thrombosthenin A, die daran erkenntlich ist, dass eine residuelle ATP-Empfindlichkeit von 10–20% nachweisbar bleibt. Diese Verunreinigung hält sich wahrscheinlich in bescheidenen Grenzen, genügen doch beim Muskelmyosin 5% Aktin, um Empfindlichkeiten in der Grössenordnung von 10–30% hervorzurufen¹³⁾.

Das Überstehende der Thrombosthenin-M-Fällung sollte *Thrombosthenin A* enthalten. Dies wurde wie folgt bewiesen: Das Überstehende der Polyäthensulfonatfällung wurde mit Hilfe von «Carbowax» auf ein kleines Volumen eingengt. ATP und Fällungsmittel wurden durch Dialyse oder durch Passage durch eine Sephadex-G-25-Kolonie entfernt. Die Zugabe einer solchen Lösung zu Thrombosthenin M steigert die ATP-Empfindlichkeit bis auf 80%. Thrombosthenin-A-Präparate, nach dieser oder nach der Methode von BARANY *et al.*⁸⁾ hergestellt, zeigen allein keine ATP-Empfindlichkeit.

ATP-ase-Aktivitäten: In der Tabelle sind die relativen ATP-ase-Aktivitäten von verschiedenen Kombinationen im System Thrombosthenin M und A sowie Muskelmyosin bzw. Aktin aufgetragen.

ATP-ase-Aktivitäten der Kombinationen aus den Dissoziationsprodukten von Thrombosthenin und Aktomyosin

		Thrombosthenin A	Aktin
Thrombosthenin M	0,0032 (7)	0,0050 (3)	0,0068 (3)
Myosin	0,0148 (2)	0,0510 (1)	0,0997 (2)

Angegeben sind die Mittelwerte des abgespaltenen Phosphates in $\mu\text{M P}_i/\text{Min.} \times \text{mg Protein}$ bei $\mu = 0,08$, pH 7,0, 20°, unter Anwesenheit von 10^{-3}M Mg^{++} und 10^{-3}M ATP . Zahlen in Klammern geben Zahl der Doppelbestimmungen an. Alle Angaben sind bezogen auf die Konzentrationen von Thrombosthenin M bzw. Myosin.

¹¹⁾ H. PORTZEHL, G. SCHRAMM & H. H. WEBER, Z. Naturforsch. 5b, 61 (1950).

¹²⁾ M. BARANY & F. JAISLE, Biochim. biophys. Acta 41, 192 (1960).

¹³⁾ F. JAISLE, Biochem. Z. 321, 451 (1951).

In den Gemischen wurde ein Gewichtsverhältnis der beiden Proteine von etwa 1 : 1 bei leichtem Überschuss der M- bzw. der Myosin-Komponente angestrebt.

Es erhellt aus diesen Werten eindeutig, dass Myosin bzw. Thrombosthenin M die Träger der ATP-ase-Aktivität sind. Durch Zugabe von Aktin bzw. Thrombosthenin A wird diese Aktivität erheblich gesteigert. Bemerkenswert ist besonders, dass sich diese Rekombination zu wirksameren ATP-asen auch durch Überkreuzung der Komponenten bewerkstelligen lässt: Thrombosthenin M aus menschlichen Blutplättchen ist bei Anwesenheit von Kaninchenmuskel-Aktin eine mehr als doppelt so aktive ATP-ase als ohne dieses. Derselbe Effekt wird beobachtet bei Zugabe von Thrombosthenin A zu Myosin.

Immerhin wirkt Aktin in beiden Fällen besser, ohne dass heute schon eine Entscheidung möglich ist, ob dies eine Folge der angewendeten Herstellungstechnik unserer Thrombosthenin-A-Präparate oder eine besondere Eigenschaft derselben ist. Im letzteren Falle würde dies bedeuten, dass trotz der Möglichkeit von Kreuzreaktionen Unterschiede zwischen Thrombosthenin A und Aktin bestehen müssen, eine Frage, die mit anderen Methoden weiter verfolgt werden soll. Gesichert erscheint dagegen schon jetzt, gestützt auf die namhaften Unterschiede in der ATP-ase-Wirkung, die Nicht-Identität von Myosin und Thrombosthenin M.

Wir danken Fräulein M. SCHNEIDER für ihre wertvolle technische Hilfe bei dieser Arbeit. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und der KOMMISSION ZUR FÖRDERUNG DER EIWEIFSFORSCHUNG AN DER UNIVERSITÄT BERN sind wir für finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Thrombosthenin, das kontraktile Protein der Blutplättchen, kann wie das verwandte Aktomyosin aus Muskel in zwei Komponenten aufgespalten werden.

Thrombosthenin M (entsprechend dem Muskel-Myosin) wird aus Thrombosthenin bei niedriger Ionenstärke in unlöslicher Form abgespalten, wobei Gebrauch von der dissoziationsfördernden Wirkung des Interaktionsinhibitors Polyäthensulfonat gemacht wird.

Thrombosthenin A (entsprechend dem Muskel-Aktin) wird aus dem Aceton-trockenpulver gewaschener Plättchen durch Extraktion mit KJ-Lösung hergestellt.

Gleich wie das Myosin erweist sich auch Thrombosthenin M als der eigentliche Träger der ATP-ase-Wirkung. Durch Zugabe sowohl von Thrombosthenin A wie auch von Muskel-Aktin wird diese Fermentaktivität merklich verstärkt. In bescheidenerem Ausmass vermag auch Thrombosthenin A die ATP-ase-Aktivität von Myosin zu erhöhen.

Die ATP-ase-Wirkung von Thrombosthenin M einerseits wie auch der Verstärkereffekt von Thrombosthenin A stehen weit hinter denen der Muskelanalogen zurück. Der Schluss scheint berechtigt, dass es sich um zwar eng verwandte, jedoch nicht um identische Proteine handelt.

Theodor Kocher Institut
und Physiologisches Institut, Universität Bern