

Die proteolytische Wirkung des Thrombins

Von

M. Pantlitschko und E. Gründig

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 29. Januar 1957)

1. Es wird eine Methode beschrieben, mit deren Hilfe es gelingt, die proteolytische Wirkung des Thrombins auf andere Substrate als Fibrinogen qualitativ und quantitativ zu verfolgen.
2. Heparin hemmt die proteolytische Aktivität des Thrombins.
3. Durch Serum wird Thrombin erst, wie das Ferment der Leukozyten, in höheren Konzentrationen gehemmt.

Die Wirkung des Thrombins bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin war lange Zeit ungeklärt. Die Annahme, daß Thrombin als proteolytisches Ferment die Umwandlung herbeiführt, wurde schon 1908 von *Mellanby*¹ geäußert. Es konnte jedoch kein exakter Nachweis für die proteolytische Wirkung erbracht werden² und in den folgenden Jahren wurden die verschiedensten Theorien über die Wirkung des Thrombins entwickelt, die jedoch nicht experimentell erhärtet werden konnten. Noch 1938 berichtet *Jaques*³ in einer Arbeit, daß der gesamte in Fibrinogen bestimmbare Stickstoff in dem Fibrin wiedergefunden werden kann und hat daraus den Schluß gezogen, daß eine proteolytische Wirkung des Thrombins bei dem Fibrinogen-Fibrin-System auszuschließen sei.

¹ *J. Mellanby*, *J. Physiol.* **38**, 28 (1908).

² *R. N. Lyons*, *Austral. J. Exper. Biol. Med. Sci.* **23**, 131 (1945). — *P. R. Morrison* und *C. L. Sudden*, *Amer. J. Physiol.* **170**, 147 (1952). — *J. D. Ferry* und *P. R. Morrison*, *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 388 (1947). — *E. Woehlich*, *Ergebn. Physiol.* **43**, 174 (1940). — *T. Astrup*, *Adv. Enzym.* **10**, 1 (1950). — *W. F. H. M. Mommaerts*, *J. Gen. Physiol.* **29**, 103 (1946). — *R. Marbet* und *A. Winterstein*, *Exper.* **10**, 273 (1954).

³ *L. B. Jaques*, *Biochemic. J.* **32**, 181 (1938).

Durch Anwendung der Aminosäuren-Endgruppenbestimmung nach *Sanger* konnten erstmals von *Baily, Bettelheim, Lorand* und *Middlebrook*⁴ neue Beweise für die proteolytische Wirkung des Thrombins bei der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung erbracht werden. In späteren Arbeiten^{5, 6} wurde das als Fibrinopeptid bezeichnete Spaltprodukt näher untersucht, papierelektrophoretisch in 2 Komponenten getrennt und darin der Gehalt an einzelnen Aminosäuren bestimmt. Diese Untersuchungen der proteolytischen Aktivität des Thrombins beschränken sich auf Fibrinogen als Substrat, da mit Hilfe dieser Methode an anderen Substraten (Myosin, Ovalbumin) eine solche Wirkung nicht nachgewiesen werden konnte. Man zog daraus den Schluß, daß Thrombin eine ausgeprägte Substratspezifität besitze.

Der Nachweis der proteolytischen Wirkung von bekannten Fermenten ist, wenn verschiedene Eiweißkörper als Substrat verwendet werden, großen Schwierigkeiten unterworfen, da die Trennung des nichtangegriffenen Eiweißes von seinen Spaltprodukten sehr diffizil ist. Diese Schwierigkeit wird bei der Untersuchung von nicht näher bekannten, proteolytisch wirksamen Fermenten besonders groß, da man über die Bruchstücke und deren Abtrennungsmöglichkeiten a priori nichts aussagen kann. Unsere Versuche, die proteolytische Wirkung des Thrombins auf Casein, Ovalbumin, Edestin, Serumalbumin mit Hilfe der üblichen Methoden (Fällung mit 8% TCE, Bestimmung des Stickstoffes nach *Kjeldahl*, Bestimmung des Tyrosins, Tryptophans mit UV-Spektrophotometrie bzw. mit dem *Folinschen* Reagens) nachzuweisen, waren alle erfolglos. Mit Hilfe der quantitativen Bestimmung der Konzentration von Eiweiß durch Elektrophorese an möglichst einheitlichen Eiweißkörpern gelang es uns zum Ziel zu kommen.

Versuchsmethodik

Zur Verwendung kamen elektrophoretisch möglichst einheitliche Eiweißkörper. Das α -Casein wurde aus handelsüblichem „Casein nach *Hammarsten*“ nach der Methode von *Hipp, Groves, Custer* und *McMeekin*⁷ dargestellt. Es bestand aus 86% α -Casein und wurde unter Toluol in feuchtem Zustand am Eis aufbewahrt. β -Laktoglobulin wurde in kristallisiertem Zustand nach der Methode von *Sørensen* und *Palmer*⁸ dargestellt. Es zeigte dieselben Eigenschaften, wie von den Autoren angegeben, bestand aber, wie bereits *Jacobsen*⁹ zeigte, elektrophoretisch aus 2 Komponenten. Eine genaue Ein-

⁴ *K. Baily, F. R. Bettelheim, L. Lorand* und *W. R. Middlebrook*, *Nature* **167**, 233 (1951).

⁵ *E. L. Durrum*, *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2943 (1950).

⁶ *F. R. Bettelheim* und *K. Baily*, *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 578 (1952).

⁷ *N. S. Hipp, M. L. Groves, S. H. Custer* und *T. L. McMeekin*, *J. Dairy Sci.* **35**, 272 (1952).

⁸ *M. Sørensen* und *A. H. Palmer*, *C. r. trav. lab. Carlsberg* **21**, 283 (1938).

⁹ *C. F. Jacobsen*, *C. r. trav. lab. Carlsberg* **26**, 461 (1949).

wage der Substrate war nicht möglich, so daß der Gehalt an Eiweiß mit der Biuretmethodem bestimmt werden mußte. Im allgemeinen betrug die Endkonzentration an Eiweiß im Versuchsansatz 0,5%. Als Puffer verwendeten wir Phosphatpuffer mit pH 7,2 und einer Ionenstärke von 0,1 bzw. 0,2. Die Elektrophoresen wurden zum Teil in einem *Antweiler-* (Dauer 20 Min., 45 Volt, 2,5 mA) und in einem *Perkin-Elmer-Tiselius-*Apparat durchgeführt. Bei den ersten Versuchen wurde der Ansatz nach der Bebrütung gegen den Puffer dialysiert, später unterließen wir die Dialyse, da kein Unterschied gegenüber den dialysierten Versuchsansätzen festzustellen war. Als Ferment wurde Topostasin¹⁰ der Firma Hoffmann-La Roche verwendet. Die Einwage wurde in Phosphatpuffer pH 7,2 und $\mu = 0,2$ gelöst und der Substratlösung zugesetzt. Die Thrombinlösung wurde in silikonsierten Gefäßen am Eis aufbewahrt und behielt so ihre proteolytische Aktivität durch mehrere Tage.

Versuchsergebnisse

In der Abb. 1 geben wir eine typische Reihe von Elektrophorese-diagrammen, wie man sie bei der Einwirkung von Thrombin auf α -Casein

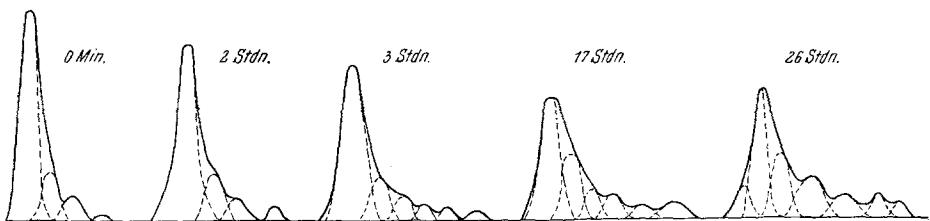


Abb. 1

erhält, wieder. Es kommt zu einer Verringerung der Hauptkomponente, wobei Spaltprodukte mit anderen elektrophoretischen Eigenschaften im Diagramm sichtbar werden.

Da unsere Substrate, wie aus obiger Abb. 1 ersichtlich, elektrophoretisch nicht einheitlich waren, beziehen wir uns bei der quantitativen Auswertung der Diagramme nur auf die Hauptkomponente. Aus Abb. 2 kann man den Abbau in Prozenten bei gegebener Thrombinkonzentration zu verschiedenen Zeiten entnehmen.

Besonders bemerkenswert erscheint uns, daß der Gesamteiweißgehalt vor und nach der Bebrütung gleich ist. Wir finden darin unsere Annahme bestätigt, daß bei der Thrombineinwirkung auf α -Casein und β -Lactoglobulin nur Bruchstücke mit relativ hohem Molekulargewicht entstehen, die bei der normalen Enteiweißung mit TCE ausgefällt werden. Wie aus an dem gleichen Ansatz durchgeführten Analysen hervorgeht, kann man auch mit Hilfe der sehr empfindlichen UV-spektrophotometrischen Methode, obwohl, wie z. B. der 17-Stdn.-Wert zeigt, bereits 44% des

¹⁰ Für die Überlassung des Topostasins sind wir der Firma Hoffmann-La Roche zu Dank verpflichtet.

ursprünglich vorhandenen Eiweißes eine Veränderung erfahren haben, im enteiweißten Filtrat Tyrosin und Tryptophan nicht nachweisen. *Nitschmann* und *Bohren*¹¹ haben eine Methode ausgearbeitet, mit der sie die Primärreaktion der Labgerinnung verfolgten. Dabei konnten sie die Beobachtung von *Alais* und *Mitarb.*¹² bestätigen, daß bei Verwendung von kleineren TCE-Konzentrationen zur Fällung der gelabten Ansätze wesentlich mehr NPN in Lösung bleibt, als bei Enteiweißung mit höheren TCE-Konzentrationen. Aus diesem Grunde haben wir versucht, zu klären, ob durch Variation der zur Verwendung gelangenden TCE-Konzentration im Filtrat Bruchstücke gefunden werden können. Wir enteiweißten,

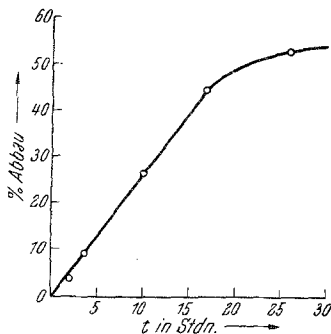


Abb. 2. Abhängigkeit des Abbaues von α -Casein durch Thrombin (159 γ /ccm) von der Zeit der Bebrütung

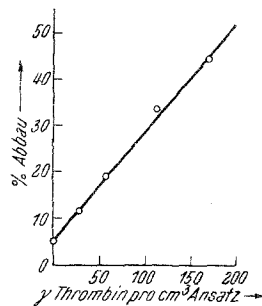


Abb. 3. Konzentrationsabhängigkeit des Abbaues von α -Casein durch Thrombin (Bebrütungsdauer 17 Stdn.)

bezogen auf die Endkonzentration mit 1, 2, 4, 8, 12% TCE, konnten aber im Filtrat keine Spaltprodukte nachweisen. In Abb. 3 geben wir den Abbau von α -Casein in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration bei einer Bebrütungsdauer von 17 Stdn. wieder. Die Gerade schneidet die X-Achse nicht im Nullpunkt. Wir erklären das mit der bereits von *Nitschmann* und *Bohren*¹¹ gefundenen Tatsache, daß α -Casein-Präparationen immer mit milcheigenem proteolytischen Ferment verunreinigt sind.

Bei Verwendung von β -Lactoglobulin als Substrat konnten wir ebenfalls die proteolytische Wirkung des Thrombins nachweisen, die jedoch geringer war als bei α -Casein.

Hemmung der proteolytischen Wirkung des Thrombins

Bekanntlich wird als die Hauptwirkung des Heparins bei der Blutgerinnung die Hemmung des Thrombins angesehen. Daneben werden dem Heparin noch andere Wirkungen zugeschrieben, die für unsere

¹¹ *Hs. Nitschmann* und *H. U. Bohren*, *Helv. Chim. Acta* **38**, 1953 (1955).

¹² *A. Alais* und *Mitarb.*, *Helv. Chim. Acta* **36**, 1953 (1953).

Fragestellung nicht wesentlich sind. Auf Grund der Antithrombinwirkung wurde mehrfach behauptet¹³, daß Heparin nicht nur Thrombin, sondern auch andere proteolytische Fermente zu hemmen imstande sei. Aus zahllosen ergebnislosen Versuchen¹⁴ mußten wir jedoch feststellen, daß dem Heparin keine Wirkung auf bekannte proteolytische Enzyme (untersucht wurden: Pepsin, Trypsin, Kathepsin, Papain) zukommt. Es erschien uns deshalb wichtig, zu untersuchen, ob mit unserer Versuchsanordnung der Nachweis der Hemmung der proteolytischen Aktivität des Thrombins zu erbringen war. Wie aus untenstehender Tabelle 1 ersichtlich, wird die proteolytische Wirkung des Thrombins bei Anwesenheit von Heparin vollkommen aufgehoben, so daß möglicherweise die Wirkung des Heparins auf das Thrombin in einer Hemmung der

Tabelle 1

Bebrütungszeit in Stunden	Gesamteiweiß- konz. in %	α -Casein Anteil in %	Abbau des α -Casein in %	Serum- verdünnung	Heparinkonz. γ pro cem Ansatz
0	0,80	73,2	0	—	—
23	0,82	46,8	37,5	—	—
0	0,79	73,3	0	1 : 100	—
23	0,81	64,2	12,2	1 : 100	—
0	0,42	73,4	0	—	—
18	0,40	58,2	20,6	—	—
0	0,49	72,0	0	—	833
18	0,50	71,4	0	—	833

proteolytischen Aktivität besteht. Vermutlich dürfte es sich um eine kompetitive Hemmung handeln, da man weiß, daß die hemmende Wirkung des Heparins auf die Blutgerinnung durch stark basische Eiweißkörper aufgehoben werden kann (Versuche, diese Frage zu klären, sind im Gange).

Da das Thrombin seine Wirkung bei der Blutgerinnung auch bei Anwesenheit von Plasma ausübt, untersuchten wir die Hemmwirkung von Serum auf Thrombin. In früheren Untersuchungen¹⁵ konnten wir zeigen, daß Trypsin durch Normalserum bis zu einer Konzentration von 1 : 1200 pro Kubikzentimeter Ansatz deutlich gehemmt wird. Das proteolytische Ferment der Leukozyten¹⁶, das ein ähnliches pH-Optimum

¹³ A. J. Glazko und J. H. Fergusson, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **45**, 43 (1945). — M. K. Horwitz, Science **92**, 89 (1940); Amer. J. Physiol. **129**, 385 (1940); J. Biol. Chem. **156**, 427 (1944). — M. Rocha e Silva und S. C. Andrade, Science **102**, 670 (1945). — J. A. Wells und Mitarb., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **58**, 57 (1945). — T. Astrup und N. Alkjaersig, Nature **169**, 314 (1952).

¹⁴ E. Kaiser und M. Pantlitschko, Scient. Pharmaceut. **21**, 292 (1953).

¹⁵ E. Kaiser und M. Pantlitschko, Klin. Med. **8**, 179 (1953).

¹⁶ M. Pantlitschko und K. Stattmann, Biochem. Z. **326**, 252 (1955).

besitzt wie das Trypsin, zeigte noch bei einer Serumverdünnung von 1:90 seine volle proteolytische Aktivität. Das Thrombin wird, wie aus Tabelle I hervorgeht, bei ähnlichen Serumkonzentrationen, wie das Leukozytenferment, gehemmt. Ob es sich um den gleichen Hemmkörper handelt, sollen spätere Untersuchungen ergeben.