Aminosäuren in normalen menschlichen Thrombozyten

Aus der Med. Univ.-Klinik Marburg/Lahn (Direktor: Prof. Dr. H. E. Bock)

Wolfgang Gerok und Rudolf Gross

Proteine sind für die Struktur und Funktion der Thrombozyten von wesentlicher Bedeutung. Da der Proteinstoffwechsel mit dem Stoffwechsel der Aminosäuren (AS) eng verknüpft ist, erschien es aufschlußreich, die AS der Thrombozyten quantitativ zu bestimmen. Qualitative Untersuchungen über die freien AS in Thrombozyten sind von Hino (1) durchgeführt worden. Bestetti und Crosti (2) haben im Hydrolysat der nicht fraktionierten Thrombozytenproteine 16 verschiedene AS papierchromatographisch qualitativ nachgewiesen. Quantitative Untersuchungsergebnisse liegen unseres Wissens bisher nicht vor.

Methodik: Für die Gewinnung der Thrombozyten wurde das Blut von gesunden Blutspendern mittels V2A-Kanülen und dem Plastikgerät „Donafix" (Fa. Braun, Melsungen) durch leichten Unterdruck in silikonisierte Konservenflaschen eingeleitet. Die Flaschen enthielten 1% Dinatriumaethylendiaminotetraacetat („Sequestrene" Alrox oder „Titriplex III" Merck) in 0.7% Kochsalzlösung: die Mischung mit Blut erfolgte im Verhältnis 1 Teil Lösung auf 9 Teile Blut. Diese Mischung wurde sofort bei + 4° C 10 Min. mit 1000 r (= 100 g) zentrifugiert, das überstehende thrombozytenhaltige Plasma vorsichtig abpipettiert, die Thrombozytenzahl bestimmt. Das thrombozytenhaltige Plasma wurde erneut bei + 4° C 15 Min. mit 3000 r (1000 g) zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Sediment in einem kleineren Volumen thrombozytenfreien Plasmas so resuspendiert, daß Konzentrationen um 2 Mill./mm³ entstanden. Die Thrombozytenzahl wurde bei allen diesen Schritten im Phasenkontrastmikroskop nach der Methode von Feissly und Lüdin bestimmt. Das thrombozytenfreie Plasma für Verdünnung und für die Differenzbestimmungen (s. u.) wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (+ 4° C) mit 10 000 r für 30 Min. (10 900 g) gewonnen. Dieses Plasma enthielt in allen Versuchen < 200 Thrombozyten oder sichtbare Thrombozytentrümmer/mm³.

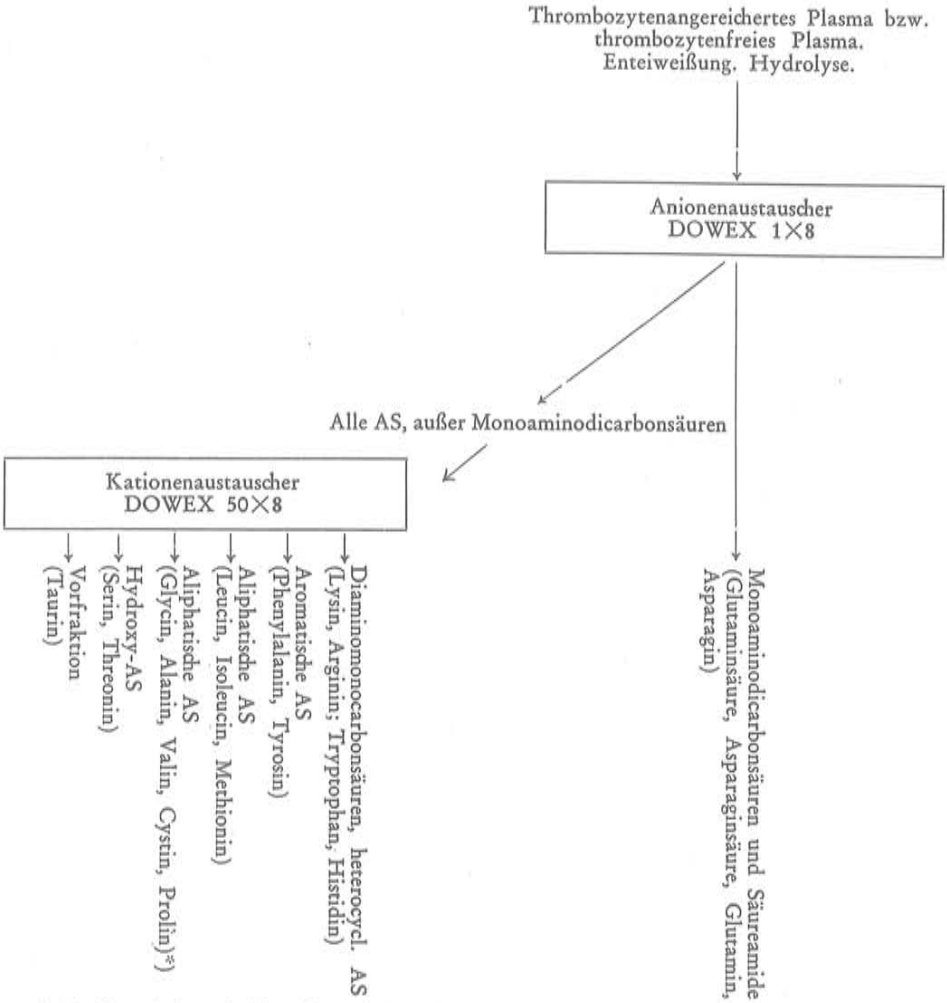
Vor der Elutionschromatographie der AS wurden die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt. Die Säureamide der Monoaminodicarbonsäuren (Glutamin, Asparagin) und die mit Trichloressigsäure nicht gefällten Peptide wurden durch Kochen mit 2n HCl hydrolysiert. Dauer der Hydrolyse 3 Stunden, Temperatur des Sandbades 120° C. An der Säule eines Anionenaustauschers (Dowex 1×8, 200—400 mesh) wurden zunächst durch Elution mit Azetatpuffer von pH 4,2 bzw. 5,8 die Monoaminodicarbonsäuren von den übrigen AS getrennt. Die letzteren wurden an der Säule eines Kationenaustauschers (Dowex 50×8, 200—400 mesh) durch Elution mit Zitratpufferlösungen von abgestuftem pH und 0,2n NaOH in 5 AS-Gruppen aufgegliedert (Einzelheiten des Verfahrens siehe Gerok [3]). An der Kationenaustauschersäule wurde außerdem eine ninhydrinpositive Fraktion isoliert, die vor den AS im Eluat erschien und deshalb als AS-Vorfraktion bezeichnet wurde.

ent wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Die Konzentration des α-Amino-N in den Eluatfraktionen bestimmten wir kolorimetrisch mit Hilfe der Ninhydrinreaktion in der Modifikation nach Rosen (4). Außerdem wurde nach der Methode von Troll und Lindsey (5) die Iminosäure Prolin bestimmt. Aus der Differenz der AS-Konzentration im thrombozytenfreien und thrombozytenangereicherten Plasma und der Thrombozytenzahl konnte der AS-Gehalt der Thrombozyten berechnet werden. Der Analysengang ist in Tab. 1 schematisch dargestellt.

Zur Charakterisierung der AS-Vorfraktion wurde das zugehörige Eluat durch Verdrängungschromatographie an einem Anionenaustauscher „entsalzt" und auf Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 mit dem Lösungsmittel Butanol-Essigsäure Wasser (4 : 1 : 5 Vol. Tl.) in absteigender Technik papierchromatographisch analysiert (Einzelheiten des Verfahrens siehe Gerok [3]).

Tab. 1



*) Prolin wird nach Troll und Lindsey (7) gesondert bestimmt.

Ergebnisse

Das Ergebnis der AS-Gruppenanalysen von 7 gesunden Versuchspersonen zeigt Tab. 2. Von den AS der Thrombozyten gehört der größte molare Anteil zu der Gruppe der Monoaminodicarbonsäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) und zur Gruppe der aliphatischen Monoaminomonocarbonsäuren (Glycin, Alanin, Valin, Cystin). Alle übrigen AS-Gruppen sind in den Thrombozyten nur in geringer Menge enthalten. Unter den ninhydrinpositiven Substanzen der Thrombozyten überwiegt die sog. AS-Vorfraktion; ihre Konzentration, berechnet auf Grund der Extinktion bei der Ninhydrinreaktion, ist größer als die Gesamtkonzentration der AS. Die papierchromatographische Analyse ergab, daß die AS-Vorfraktion zum überwiegenden Teil oder ausschließlich eine Substanz enthält, die im Lösungsmittel Butanol-Essigsäure-Wasser den gleichen chromatographischen Rf-Wert wie Taurin aufweist. Andere ninhydrinpositive Substanzen konnten bei der Papierchromatographie der AS-Vorfraktion nicht nachgewiesen werden. Ein hoher Tauringehalt der Thrombozyten ist auch von Frendo et al. (6) und von Hino (1) beobachtet worden.

Tab. 2

	Thrombozytenzahl Mill./mm³	„AS-Vorfraktion"		Monoaminodicarbonsäuren		Hydroxy-AS		Aliph. Monoaminomonocarbon-Säuren I		Aliph. Monoaminomonocarbon-Säuren II		Aromat. AS		Diaminomonocarbons. Heterocycl. AS		Iminosäuren (Prolin)	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	2.53	1.02	403	0.33	130	0.13	51	0.26	103	0.12	47	0.04	16	0.11	43		
2	1.94	0.92	475	0.33	170	0.17	88	0.22	113	0.08	41	0.06	31	0.11	57		
3	2.34	1.36	581	0.39	167	0,18	77	0.30	128	0.16	68	0.10	43	0.15	64		
4	3.30	1.35	409	0.43	130	0.19	58	0.32	97	0.23	70	0.10	30	0.16	48		
5	2.73	1.16	425	0.31	114	0.17	62	0.23	84	0.08	29	0.04	15	0.19	70	0.05	18
6	4.20	1.34	319	0.55	131	0.29	69	0.58	138	0.18	43	0.06	14	0.29	69	0.09	21
7	3.40	1.82	535	0.49	144	0.14	41	0.15	44	0.14	41	0.04	12	0.12	35	0.04	12
Arithm. Mittel			456±33		141±8		64±6		101±11		48±6		23±4		55±5		17±3

I: Differenz der AS-Konzentration in Thrombozyten-freiem und Thrombozyten-angereichertem Plasma (mg% α-Amino-N).

II: AS-Gehalt der Thrombozyten (µg α-Amino-N in 10^{11} Thrombozyten.

In Tabelle 2 sind die Streuungen der Mittelwerte (σm) angegeben. Da in jeden Einzelwert der methodische Fehler bei der Thrombozytenzählung und die methodischen Fehler von 2 AS-Bestimmungen eingehen, ist diese Streuung relativ groß.

Die in den Thrombozyten besonders reichlich vorhandenen Monoaminodicarbonsäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure) können mit Hilfe von Trans-

ent wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

aminasen, die von Waller, Löhr, Grignani und Gross (7) in Thrombozyten nachgewiesen wurden, in die entsprechenden, im Zitronensäurezyklus wichtigen α-Ketosäuren (α-Ketoglutarsäure, Oxalessigsäure) übergeführt werden und umgekehrt. Taurin ist Endprodukt im Stoffwechsel der schwefelhaltigen AS. Es ist naheliegend, den auffallend hohen Tauringehalt der Thrombozyten so zu deuten, daß den schwefelhaltigen AS im Stoffwechsel der Thrombozyten eine besondere Bedeutung zukommt.

Untersuchungen über die AS in den Thrombozyten von Thrombozytopathien sind im Gang.

Zusammenfassung

Durch Eluationschromatographie an Ionenaustauschern wurden 6 AS-Gruppen und die Iminosäure Prolin in Thrombozyten quantitativ bestimmt. Der größte molare Anteil der AS entfällt auf die Gruppe der Monoaminodicarbonsäuren. Thrombozyten enthalten in hoher Konzentration Taurin.

Summary

Six groups of amino-acids and the imino-acid proline were quantitatively determined in platelets by elutionchromatography on ion exchange resins. On a molar basis, the group of monoamino-dicarbonic acids were the greatest group. Platelets were found to contain taurin in high concentration.

Résumé

Six groupes d'acides aminés et l'iminoacide proline ont été dosés quantitativement en faisant appel à la chromatographie sur échangeur d'ions. Les di-acides monoaminés forment le plus grand groupe, calculé sur une base molaire. Les thrombocytes contiennent de la taurine en forte concentration.

Den technischen Assistentinnen E. Staufenberg und R. Pagel danken wir für ihre fleißige und verständnisvolle Arbeit.

Literatur

(1) Hino, A.: J. Jap. Soc. Int. Med. 45, 601 (1950) cit. in Morita, H. (Persönl. Mitteilung).
(2) Bestetti, A. und Crosti, P. F.: Indagini chiruiche suke piastrine I. Aminoacidi e glucidi costitutivi piastrinici. Atti d. Soc. Lombard. Sc. Med. e Biol. 35: 278 (1955).
(3) Gerok, W.: Eine Methode zur quantitativen Aminosäurenbestimmung. Klin. Wschr. 36, 384 (1958).
(4) Rosen, H.: A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. of Biochem. and Biophys. 67, 10 (1957).
(5) Troll, W. und Lindsey, J.: A photometric method for the determination of proline. J. Biol. Chem. 215: 655 (1955).
(6) Frendo, J., Koj, A. und Zgliczynski, J. M.: Taurine in human blood platelets. Nature 183: 685 (1959).
(7) Waller, H. D., Löhr, G. W., Grignani, F., Gross, R.: Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten. Thromb. Diath. haem. 3, 520 (1959).