

Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C from Bovine Blood Platelets. Inhibition by Calmodulin-Inhibitors – Activation by ATP and ADP

Hermann Benedikter, Gisela Knopki, and Paul Renz

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70

Z. Naturforsch. **40c**, 68–72 (1985); received April 24/September 18, 1984

Phospholipase C, Bovine Blood Platelets, Phosphatidylinositol, Allosteric Activation, Calmodulin

The phospholipase C-activity in crude extracts of bovine blood platelets is strongly inhibited by the calmodulin-inhibitors fluphenazine and calmidazolium in the mM range, and activated by ATP and ADP, but not by AMP. The activating effect is also shown by the nonhydrolysable ATP- and ADP-analogs α,β - and β,γ -methyleneadenosine 5'-triphosphate and α,β -methyleneadenosine 5'-diphosphate, thus indicating that it is an allosteric effect. The stimulation of the phospholipase C-activity by ATP is also detectable in some partially purified fractions of the crude platelet extract, but it is abolished on further purification of the enzyme.

Einleitung

Durch Einwirkung der Serin-Protease Thrombin auf Blutplättchen wird eine Phospholipase C aktiviert [1]. Diese spaltet Phosphatidylinositol hydrolytisch zum 1,2-Diacylglycerin und Inositolphosphat [2]. Das 1,2-Diacylglycerin enthält überwiegend an C-1 Stearinsäure und an C-2 Arachidonsäure [3]. Es wird durch eine Diglyceridlipase, eventuell unter Mitwirkung einer Monoglyceridlipase gespalten und dadurch Arachidonsäure freigesetzt [3–5]. Die Arachidonsäure kann auch aus anderen Phospholipiden, z.B. Phosphatidylcholin, durch eine Phospholipase A₂ freigesetzt werden [6, 7]. Die Arachidonsäure wird schließlich überwiegend zu dem hochwirksamen und kurzlebigen Thromboxan A₂ umgesetzt [8]. Die Phospholipase C ist auch an der Phosphatidylinositol-Antwort beteiligt, die bei einer Vielzahl sekretorischer Gewebe mit der Hormon-induzierten Mobilisierung von Calcium einhergeht [9, 10].

1982 wurden die Reinigung und einige Eigenschaften einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C aus Rinderblutplättchen beschrieben [11]. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die Phospholipase C-Aktivität in einem Rohextrakt aus Rinderblutplättchen in pH-abhängiger Weise

durch ATP und ADP bzw. durch nicht spaltbare Analoge von ATP und ADP aktiviert wird. Weiter konnten wir im Gegensatz zu der japanischen Arbeitsgruppe [11] eine ausgeprägte Hemmung der Phospholipase C durch Calmodulin-Inhibitoren demonstrieren.

Material und Methoden

AMP-CP, AMP-CPP, AMP-PCP und Rinderhirnextrakt (Brain-Extract Type I, enthält 10–20% Phosphoinositide und 50–60% Phosphatidylserin) waren von Sigma (München). L-Phosphatidyl[U-¹⁴C]inositol, hergestellt durch Inkubation von myo[U-¹⁴C]inositol mit Rinderhirnmikrosomen, wurde von Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen. Calmodulin und Calmidazolium (R 24 571) stammten von Boehringer (Mannheim). Fluphenazin war ein Geschenk der Firma von Heyden (Regensburg).

Herstellung des Substrats

2 g Rinderhirnextrakt (Sigma) und 10 μ Ci L-Phosphatidyl[U-¹⁴C]inositol wurden in 20 ml Chloroform gelöst. Es wurden 40 ml Methanol und 16 ml 25 mM Tris/HCl pH 8,0 zugegeben und gemischt. Nach Zugabe weiterer 20 ml Chloroform und 20 ml des Puffers wurde zur Phasentrennung zentrifugiert und die organische Phase abgetrennt [12]. Die wäßrige Phase wurde so oft mit Chloroform nachextrahiert, bis keine Radioaktivität mehr extrahierbar war. Die organischen Phasen wurden vereinigt und eingeeengt. Der Phosphatidylinositol wurde aus der Chloroform-

Abbreviations: AMP-CP, α,β -methyleneadenosine 5'-diphosphate; AMP-CPP, α,β -methyleneadenosine 5'-triphosphate; AMP-PCP, β,γ -methyleneadenosine 5'-triphosphate.

Reprint requests to Prof. Dr. P. Renz.

0341-0382/85/0100-0068 \$ 01.30/0

Lösung durch Zugabe von 10 Teilen (v/v) Aceton, das auf -20°C vorgekühlt war, gefällt. Der Niederschlag wurde wieder in Chloroform gelöst und mit 10 Teilen Isopropanol (-20°C) erneut ausgefällt. Der so erhaltene Phosphatidyl[U- ^{14}C]inosit wurde wieder in Chloroform gelöst ($70\text{ }\mu\text{mol/ml}$) und unter Stickstoff bei -20°C aufbewahrt.

Der Inositgehalt der Substratlösung wurde nach Hydrolyse mit 6 N HCl bestimmt [13, 14].

Herstellung des Rohextrakts aus Rinderblutplättchen

91 Rinderblut wurden mit 1,51 Antikoagulans (37 g Glucose, 12 g Citronensäure, 33 g tri-Natriumcitrat) versetzt und daraus das plättchenreiche Plasma hergestellt [15]. Dieses wurde mit einem Zehntel seines Volumens an $0,13\text{ M}$ tri-Natriumcitrat versetzt, die Plättchen durch differentielle Zentrifugation isoliert, in 25 mM Imidazol/HCl pH 7,3 suspendiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 80 ml bidest. Wasser über Nacht bei 4°C gerührt und dann 60 min bei $105\,000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde unter viermaligem Pufferwechsel gegen je $21\text{ }25\text{ mM}$ Imidazol/HCl pH 7,3 dialysiert, wobei der erste Dialyse-Puffer außerdem noch 15 mM EDTA enthält. Der dialysierte Rohextrakt wurde 10 min bei $20\,000\times g$ zentrifugiert, der Überstand in $2,5\text{ ml}$ -Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, München).

Bestimmung der Phospholipase C-Aktivität

In einem Gesamtvolumen von $0,5\text{ ml}$ waren enthalten: 50 mM Tris-Maleat/NaOH pH 7,2, 70 nmol Phosphatidyl[U- ^{14}C]inosit, gelöst in $20\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform (das Chloroform hatte auf die Reaktion keinen Einfluß), $1,25\text{ mM}$ CaCl_2 und ca. $0,3\text{ mg}$ Protein des Rohextrakts. Nach 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad wurde die Reaktion mit $2,35\text{ ml}$ Chloroform/Methanol/ $1,6\text{ N HCl}$ ($0,75:1,5:0,1$) gestoppt. Zur Phasentrennung wurden $0,75\text{ ml}$ Chloroform und $0,75\text{ ml}$ Wasser zugegeben. Die organische Phase wurde entfernt und die wäßrige Phase mit $1,5\text{ ml}$ Chloroform nachextrahiert. Dann wurde die wäßrige Phase mit Hilfe von $0,5\text{ ml}$ Methanol quantitativ in ein Zählgläschen überführt und nach Zusatz von Quickszint 212 (Zinsser, Frankfurt) die wasserlösliche Radioaktivität bestimmt. Jeder bei

den Ergebnissen angegebene Meßwert ist der Mittelwert aus drei identischen Enzymansätzen. Bei allen Meßreihen wurde aus mehreren Kontrollansätzen ohne Enzym der Mittelwert bestimmt und von den erhaltenen Meßwerten abgezogen.

HPLC-Gelfiltration

Die HPLC-Gelfiltration wurde mit einem System von LKB (Bromma, Schweden) durchgeführt: 2150 HPLC-Pumpe, 2158 Uvicord SD, 2211 Suprac, 2135 UltraPak TSK 3000 (Molekularsieb) mit Vorsäule, zusätzlich ausgerüstet mit 7125 Rheodyne Injektor (Cotati, Kalifornien) und Shimadzu C-R 1B Integrator. Die Chromatographie wurde mit $0,1\text{ M}$ Phosphatpuffer pH 7,0 bei einer Flußrate von 1 ml/min und einem Druck von $20\text{--}25\text{ bar}$ ausgeführt. Das Auftragsvolumen betrug $50\text{ }\mu\text{l}$ (etwa $0,6\text{ mg}$ Protein). Gearbeitet wurde bei Zimmertemperatur; ein Lauf dauerte etwa 30 Minuten .

Ergebnisse

Als Substrat für den Nachweis der Phospholipase C verwendeten wir Phosphatidyl[U- ^{14}C]inosit. Das entstandene 1,2-Diacylglycerin wurde zusammen mit dem nicht umgesetzten Substrat und eventuell entstandenen Lysophospholipiden mit Chloroform ausgeschüttelt und die Radioaktivität des in der Wasserphase verbleibenden [U- ^{14}C]Inositphosphats bestimmt. Die dünnschichtchromatographische Überprüfung zeigte [16–18], daß weder Phosphatidsäure noch Glycerylphosphorylinosit als Spaltprodukte des Phosphatidylinosits auftraten [19]. Aus Phosphatidylcholin, das nach der Methode von Woelk und Porcellati [20] in 2-Stellung mit [1- ^{14}C]Arachidonsäure verestert worden war, entstand kein Diacylglycerin [19].

Wie von Hakata *et al.* [11] beschrieben, war die Phospholipase C auch bei unseren Untersuchungen Ca^{2+} -abhängig. Zu den Enzymansätzen zugesetztes Calmodulin beeinflusste die Phospholipase C aus Rinderblutplättchen nicht [11, 19]. Im Gegensatz zu der japanischen Arbeitsgruppe fanden wir jedoch, daß typische Calmodulin-Hemmstoffe wie Fluphenazin und Calmidazolium [21, 22] eine deutliche Hemmung des Enzyms bewirken (Abb. 1).

Durch ATP und ADP im Konzentrationsbereich von $1\text{--}10\text{ mM}$ wurde die Phospholipase C-Aktivität deutlich gesteigert (Tab. I). Dabei war, wie zu er-

Tab. I. Aktivierung der Phospholipase C im Rohextrakt aus Rinderblutplättchen durch ATP und ADP sowie durch nicht spaltbare Analoge der Adeninnukleotide. (Zur Bestimmung der Enzymaktivität siehe Material und Methoden.)

	nmol PI hydrolysiert/ mg Protein/min	Aktivität in % der Kontrolle
Kontrolle ohne Zusätze	0,56	(100)
+ 5 mM $MgCl_2$, kein Effektor	0,49	(87)
+ 5 mM $MgCl_2$, + 5 mM ATP	1,05	(188)
+ 5 mM $MgCl_2$, + 5 mM AMP-PCP	1,00	(179)
+ 5 mM $MgCl_2$, + 5 mM AMP-CPP	0,86	(154)
+ 5 mM $MgCl_2$, + 5 mM ADP	0,89	(159)
+ 5 mM $MgCl_2$, + 5 mM AMP-CP	0,71	(127)

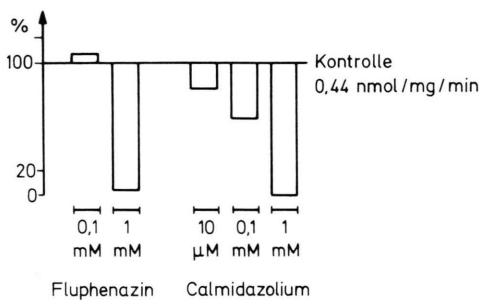


Abb. 1. Hemmung der Phospholipase C im Rohextrakt aus Rinderblutplättchen durch die Calmodulin-Hemmstoffe Fluphenazin und Calmidazolium. Angegeben ist die prozentuale Aktivität bezogen auf die Kontrolle ohne Hemmstoff. Die Inkubation erfolgte in 50 mM Tris-Maleat/NaOH pH 7,2 mit 1,25 mM $CaCl_2$. Entsprechende Versuche in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$ und 5 ml ATP (nicht dargestellt) zeigten die gleiche prozentuale Hemmung.

warten, der Mg^{2+} -Komplex von ADP und ATP wirksam. Mg^{2+} -Ionen allein hemmten die Hydrolyse des Phosphatidylinosits, während ATP und ADP ohne $MgCl_2$ unwirksam waren (nicht dargestellt). AMP, cAMP, Adenosin und Adenin wirkten nicht stimulierend. Während das Aktivitätsoptimum der Phospholipase C in Abwesenheit der Adeninnukleotide bei pH 6,1–6,3 lag, erfolgte eine deutliche Verschiebung des pH-Optimums auf pH 6,9 bei Zusatz von ADP und auf pH 7,2 bei Zusatz von ATP.

Die Aktivierbarkeit des Enzyms durch ATP und ADP war in verschiedenen Rohextrakten unterschiedlich stark ausgeprägt. Einen Eindruck von diesen Unterschieden vermittelt die Abbildung 2, die den zeitlichen Verlauf der Aktivierung der Phospholipase C durch ATP für zwei verschiedene Rohextrakte zeigt.

Die Aktivität der Phospholipase C wurde nicht nur durch ATP und ADP, sondern auch durch

deren nicht spaltbare Analoge AMP-CP, AMP-CPP und AMP-PCP gesteigert (Tab. I). Dies beweist, daß ATP und ADP nicht über eine Phosphorylierung des Phosphatidylinosits zu dessen 4-phosphat bzw. 4,5-diphosphat (Di- bzw. Triphosphoinositid) wirken und diese die eigentlichen Substrate der Phospholipase C sind. Da gleichzeitig auch eine kovalente Veränderung des Enzyms durch Spaltung der energiereichen Phosphatbindungen des ATP ausgeschlossen ist, muß der aufgezeigte Effekt vielmehr allosterischer Natur sein.

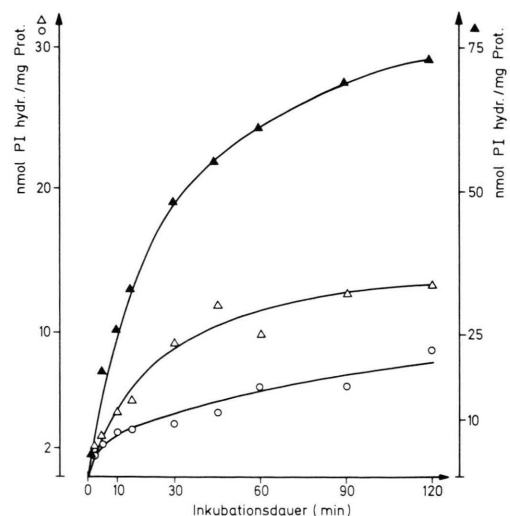


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der Phospholipase C durch ATP im Rohextrakt aus Rinderblutplättchen. Die Inkubation erfolgte für die jeweils angegebene Zeit in 50 mM Tris-Maleat/NaOH pH 7,2 mit 1,25 mM $CaCl_2$ in Abwesenheit (○) und in Anwesenheit von 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$ mit zwei verschiedenen Rohextrakten (Δ) und (▲). Die Umsatzraten in Abwesenheit von ATP waren mit beiden Rohextrakten nahezu gleich, weshalb nur die Werte für einen Rohextrakt wiedergegeben sind. Das Ausmaß der Aktivierung war jedoch sehr unterschiedlich (beachte die unterschiedlichen Skalen).

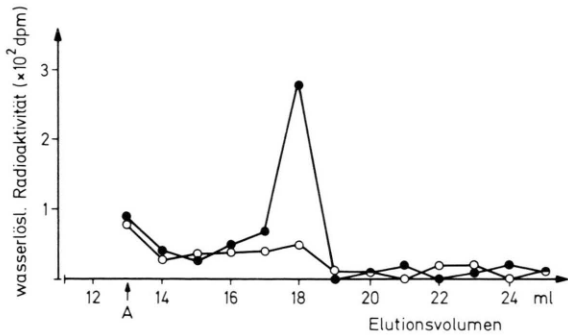


Abb. 3. Aktivierung der Phospholipase C durch 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$ (●) nach Anreicherung aus dem Rohextrakt von Rinderblutplättchen durch HPLC-Gelfiltration; Kontrolle ohne Effektoren (○). A = Ausschlußvolumen der Säule.

Wurde die Phospholipase C aus einem nach unserer Methode hergestellten Rohextrakt nach der Vorschrift von Hakata *et al.* [11] gereinigt, so ließ sich die aktivierende Wirkung des ATP in der bei 25–50% Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ ausgefallenen Fraktion noch deutlich nachweisen. Bei der weiteren Reinigung durch hydrophobe Chromatographie ging der Effekt jedoch verloren. Wurde der Rohextrakt dagegen durch HPLC-Gelfiltration aufgetrennt, so ließ sich in der Enzym-haltigen Fraktion die Aktivierung durch ATP deutlich nachweisen (Abb. 3). In diesem Fall war die Aktivität der Phospholipase C in Abwesenheit von ATP sogar kaum nachweisbar, und eine Lokalisierung der Enzymaktivität in den Eluatfraktionen war nur in Gegenwart von ATP möglich.

Diskussion

Die hier gezeigte Hemmung der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C durch die Calmodulin-Hemmstoffe Fluphenazin und Calmidazolium weist auf eine Beteiligung von Calmodulin an der Kontrolle der Phospholipase C hin. Dabei läßt sich die Tatsache, daß zu den Ansätzen zugesetztes Calmodulin die Phospholipase C-Aktivität nicht beeinflusste, mit dem Vorhandensein größerer Mengen an endogenem Calmodulin erklären [19, 23].

Weiterhin wurde gezeigt, daß die Phospholipase C durch ATP und ADP allosterisch stimuliert wird. Das Ausmaß der Aktivierung war in verschiedenen Blutplättchen-Extrakten sehr unterschiedlich. Es wäre denkbar, daß für die Aktivierung der Phospholipase C durch ATP oder ADP eine Proteinkomponente benötigt wird, die sehr labil ist und schon bei der Herstellung der Rohextrakte unterschiedlich stark inaktiviert wird oder unterschiedlich stark aus den Plättchen in Lösung zu bringen ist. Auch die Beobachtung, daß sich beim Versuch der Reinigung des Enzyms die Aktivierung durch ATP nur noch nach der ersten Ammoniumsulfat-Fällung nachweisen läßt, könnte auf die Labilität einer Komponente des Enzyms zurückzuführen sein.

Da ADP zu den aggregationsauslösenden Agentien gehört [24], könnte der aktivierende Effekt von ATP und ADP auf die Phospholipase C eine physiologische Bedeutung besitzen.

Dank

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] S. Rittenhouse-Simmons, *J. Clin. Invest.* **63**, 580–587 (1979).
- [2] G. Maucó, H. Chap, and L. Douste-Blazy, *FEBS-Letters* **100**, 367–370 (1979).
- [3] R. L. Bell, D. A. Kennerly, N. Stanford, and P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3238–3241 (1979).
- [4] S. Rittenhouse-Simmons, *J. Biol. Chem.* **255**, 2259–2262 (1980).
- [5] S. M. Prescott and P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **258**, 764–769 (1983).
- [6] E. G. Lapetina, M. M. Billah, and P. Cuatrecasas, *Nature* **292**, 367–369 (1981).
- [7] P. A. Craven and F. R. de Rubertis, *J. Biol. Chem.* **258**, 4814–4823 (1983).
- [8] M. Hamberg, J. Svensson, and B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2994–2998 (1975).
- [9] R. H. Mitchell, *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 81–147 (1975).
- [10] R. H. Mitchell, *Trends Biochem. Sci.* **4**, 128–131 (1979).
- [11] H. Hakata, J. Kambayashi, and G. Kosaki, *J. Biochem. (Tokyo)* **92**, 929–935 (1982).
- [12] E. G. Bligh and W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–918 (1959).
- [13] R. N. Roberts, in: *Lipid Chromatographic Analysis* (G. V. Marinetti, Hrsg.), S. 447–463, Marcel Dekker, New York 1967.
- [14] A. Weissbach, in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), **Band II**, S. 1378–1381, Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- [15] A. J. Barber and G. A. Jamieson, *J. Biol. Chem.* **245**, 6357–6365 (1970).

- [16] W. L. Magee and J. F. Uthe, *Methods in Enzymology* **XIV**, 170–178 (1969).
- [17] J. C. Dittmer and M. A. Wells, *Methods in Enzymology* **XIV**, 527 (1969).
- [18] H. M. Rauen: *Biochemisches Taschenbuch* **Bd. I**, 2. Aufl. S. 193 + 218 ff. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1964.
- [19] H. Benedikter, Dissertation, Universität Hohenheim (1984).
- [20] H. Woelk and G. Porcellati, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 90–100 (1973).
- [21] D. Marmè, *Biologie in unserer Zeit* **11**, 71–77 (1981).
- [22] H. van Belle, *Biochem. Soc. Trans.* **9**, 133 P (1981).
- [23] G. C. White, S. N. Levine, and A. L. Steiner, *Am. J. Hematol.* **10**, 359–367 (1981).
- [24] A. Gaarder, J. Jonsen, S. Laland, A. Hellem, and P. A. Owren, *Nature* **192**, 531–532 (1961).