

Aus dem Institut für
Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Untersuchungen zur Wirkungsweise von Zyklonukleotiden auf
die Thrombozytenaktivierung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tobias Marius Fröhling
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2010

Referentin : Frau Prof. Dr. rer.nat. Elke Butt-Dörje

Koreferentin : Frau Prof. Dr. med. Michaela Kuhn

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

08.12.2010

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet

Vorwort

„Der Mensch muss bei dem Glauben verharren, dass das Unbegreifliche begreiflich sei; er würde sonst nicht forschen.“

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase	1
1.2. Thrombozyten	2
1.2.1. Morphologie von Thrombozyten	2
1.2.2. Aktivierung von Thrombozyten	2
1.2.3. Hemmung von Thrombozyten	6
1.2.4. Regulation der Inhibition und Aktivierung von Thrombozyten	7
1.2.5. Charakterisierung des Thrombinrezeptors	8
1.3. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	10
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.1.1. Chemikalien	12
2.1.2. Kits	12
2.1.3. Lösungen und Puffer	13
2.1.4. Antikörper	14
2.1.5. Thrombozytenaktivatoren und –inhibitoren	14
2.1.6. Verbrauchsmaterialien	14
2.1.7. Geräte und Software	15
2.2. Methoden	15
2.2.1. Thrombozytenpräparation aus Vollblut	15
2.2.2. Plättchenstimulation für Western-Blot und FACS-Analyse	16
2.2.3. Denaturierende Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)	17
2.2.4. Immunologischer Proteinnachweis durch Western-Blot	19
2.2.4.1. Transfer auf Nitrozellulosemembran	19
2.2.4.2. Proteinfärbung auf der Nitrozellulosemembran	19
2.2.4.3. Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern	19
2.2.5. Kalzium-Messung	20
2.2.6. FACS-Analyse: P-Selektin Expression	21
2.2.7. Biacore Messung	21

3. Ergebnisse.....	24
3.1. Durchführung der Thrombozytenstimulation.....	24
3.2. Nachweis der Plättchenaggregation (pERK-Western Blot).....	24
3.2.1. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-cGMP und 8-Br-cGMP.....	25
3.2.2. Plättchenhemmung durch Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-PET- cGMPS.....	26
3.2.3. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-5´GMP und 8-Br-PET-5´GMP.....	28
3.2.4. Kein hemmender Effekt von 8-pCPT-Guanosin auf die Thrombozytenaktivierung.....	30
3.3. Ergebnisse der P-Selektin-Expression durch FACS-Analyse.....	31
3.3.1. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-cGMP.....	32
3.3.2. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-5´GMP und 8-Br-PET-5´GMP.....	33
3.3.3. Kein hemmender Effekt von 8-Br-Guanosin auf die Plättchenaktivierung.....	35
3.4. Ergebnisse der intrazellulären Kalziummessungen in Thrombozyten.....	36
3.5. Ergebnisse der Biacore-Messung.....	39
3.5.1. Bindung und Kontrolle des Rezeptorpeptids.....	40
3.5.2. 8-Br-cGMP an Rezeptorpeptid.....	41
3.5.3. Rp-8-pCPT-cGMP an Rezeptorpeptid.....	42
4. Diskussion.....	44
5. Zusammenfassung.....	48
6. Abkürzungen.....	49
7. Literaturverzeichnis.....	51
8. Danksagung.....	55
9. Curriculum vitae.....	56

1. Einleitung

1.1. Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase

Hämostase (Blutstillung) erfordert ein enges Zusammenspiel zwischen Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Das Blut zirkuliert im physiologischen Zustand in einem geschlossenen System, ohne dass es zum Sistieren des Blutflusses oder zum Blutaustritt in das umliegende Gewebe kommt. Erst durch traumatische Einwirkungen auf die Gefäßwand kann es zur Aufhebung der Gefäßwandintegrität kommen und im folgenden in das umliegende Gewebe einbluten. Physiologisch bildet sich daraufhin lokal ein Thrombus, welcher die Gefäßwandverletzung abdichtet und die Blutstillung bewirkt, ohne dabei jedoch den Blutfluss und damit die Versorgung abhängiger Gewebe zu beeinträchtigen. Pathophysiologisch können sowohl degenerative als auch entzündliche Veränderungen der Gefäßwand (Vaskulitiden) oder deren Kombination (Atherosklerose) zu einer Störung ihrer Integrität und folglich zur Thrombusbildung führen. Dabei kann es dann im Rahmen eines vollständigen Gefäßverschlusses zum Sistieren des Blutflusses und zur Ischämie kommen [1-3].

Allgemein wird die Bildung eines Gefäßthrombus, welcher zur Blutstillung führt, Hämostase genannt. Je nach ihrem zeitlichen Ablauf wird sie in verschiedene Stadien – primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse – unterteilt. Während der primären Hämostase kommt es im Bereich der Gefäßwandläsion zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und damit zur Bildung des primär hämostatischen Thrombus. Makroskopisch entsteht ein sogenannter weißer Thrombus. Dieser stillt zwar vorübergehend die Blutung, kann sich aber aufgrund seines fragilen Zustandes wieder leicht von der Gefäßwand lösen. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade und der proteolytischen Spaltung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) kommt es anschließend zur Bildung von Fibrinfibrillen aus Fibrinogen und damit zur Verfestigung des fragilen Plättchenaggregates. Dieser sekundäre hämostatische Thrombus (roter Thrombus) dichtet die Gefäßwandverletzung gegenüber dem Blutstrom stabil ab. Während der Heilungsphase wird dann ein Teil des Thrombus durch Fibrinolyse wieder abgebaut [1].

In intaktem Endothel werden ständig lokal wirkende antithrombogene und vasoaktive Substanzen – u.a. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) – produziert, die eine Adhäsion von Thrombozyten und damit die Thrombusbildung verhindern [1].

1.2. Thrombozyten

1.2.1. Morphologie von Thrombozyten

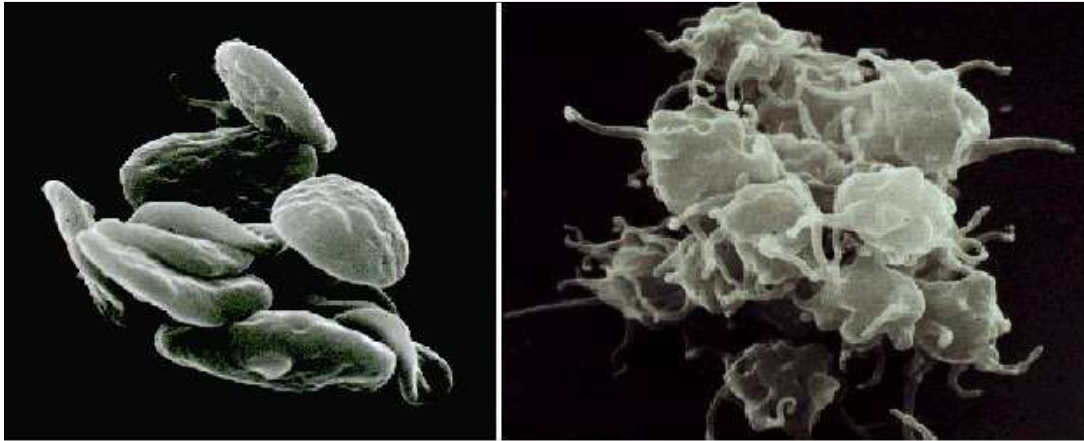


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten: links typische diskoide Form im Ruhezustand, rechts aktivierte Thrombozyten mit Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien)

Quelle: <http://www.perfusion.com/perfusion/articles/general/9905-platelet-anatomy>

Thrombozyten (Blutplättchen) spielen eine zentrale Rolle im Vorgang der Hämostase. Sie entstehen im Knochenmark durch Abschnürung von Megakaryozyten und sind mit ca. 4 μm Durchmesser die kleinsten Zellen des Blutkreislaufes. Sie sind durch eine diskoide Form und das Fehlen eines Zellkerns charakterisiert. Zusammen mit Erythrozyten zählen Thrombozyten zu den einzigen kernlosen humanen Zellen und sind daher nicht in der Lage, Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu transkribieren, was ihre Fähigkeit zur Proteinbiosynthese limitiert. Ihre Lebenszeit beträgt zwischen 7 und 10 Tagen und ihre durchschnittliche Konzentration im Blut eines Erwachsenen beträgt 150.000 bis 300.000 pro μl . Ihr Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System von Leber und Milz [1].

1.2.2. Aktivierung von Thrombozyten

In der Aktivierung der Blutplättchen spielen sowohl die Stimulation aktivierender als auch die Hemmung inhibierender Signalwege eine Rolle. Thrombozyten werden durch

Adhäsion an den von Willebrand Faktor (vWF), Kollagen und andere Proteine der subendothelialen Matrix sowie durch lösliche Agonisten wie Thrombin, Thromboxan (Tx2A) und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) angeregt [4]. Diese sind entweder auf Sekretion durch bereits aktivierte Thrombozyten (autokrin, parakrin) oder auf Freisetzung aus beschädigten Endothelzellen zurückzuführen und zirkulieren frei im Blut. Aus dem Zusammenspiel dieser Vorgänge resultiert eine Reorganisation des Zytoskeletts, die sowohl eine Formveränderung („shape change“) als auch die Sekretion intrazellulärer Granula (α -, δ - Granula, Lysosomen) und die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren zur Folge hat [5-7]. Zentrale Voraussetzung der anschließenden Thrombusbildung ist die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa, Integrin α IIb β 3), der die Quervernetzung von Plättchen über Fibrinogenbrücken vermittelt. Dies wird als Aggregation bezeichnet [1].

Zusätzlich wird die Physiologie der Thrombozytenaggregation über ein Netzwerk biochemischer Signale G-Protein gekoppelter Rezeptoren gesteuert [8-10].

Viele Agonisten interagieren mit heptahelikalen Rezeptoren, die auf der zytoplasmatischen Seite an heterotrimere GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt sind (siehe Tabelle 1). Diese Proteine funktionieren als Vermittler, welche die Signale der aktivierten Rezeptoren an intrazelluläre Signalkaskaden weitergeben.

Agonist	Rezeptor	G-Protein	Effektor	Effekt
ADP	P2Y1	$G\alpha_q$	PLC	PKC, Ca \uparrow
	P2Y12	$G\alpha_i$	AC	cAMP \downarrow
Serotonin	5 – HT _{2A}	$G\alpha_q$	PLC	PKC, Ca \uparrow
Thrombin	PAR - 1/4	$G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$	PLC	PKC, Ca \uparrow
	PAR - 3	$G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$	RhoA AC	Rhokinase \uparrow cAMP \downarrow
Thromboxan A2	TP	$G\alpha_q$	PLC	PKC, Ca \uparrow
		$G\alpha_{12/13}$	RhoA	Rhokinase \uparrow

Tabelle 1 : G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf Thrombozyten

Abkürzungen: AC: Adenyl cyclase; ADP: Adenosin-5'-diphosphat; cAMP: zyklisches Adenosin-Monophosphat; PAR: Protease aktivierender Rezeptor; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; RhoA: "small" GTPase [1, 10]

G-Proteine bestehen aus einer α -, einer β - und einer γ - Untereinheit, wobei die β - und die γ - Untereinheit einen zusammenhängenden Komplex bilden. Die α - Untereinheit legt fest, welches Signal ausgelöst wird. Im inaktiven Zustand bindet die α - Untereinheit GDP, das bei Aktivierung des Rezeptors durch GTP ersetzt wird. Dadurch erfährt die α - Untereinheit eine Konformationsänderung und dissoziiert zusammen mit GTP vom $\beta\gamma$ - Komplex. Die α - Untereinheit und der $\beta\gamma$ - Komplex können dann Effektormoleküle regulieren. Durch die GTP-ase Aktivität der α -Untereinheit wird das gebundene GTP langsam zu GDP hydrolysiert, die α - Untereinheit bindet anschließend wieder an den $\beta\gamma$ - Komplex und bringt so das G-Protein in den inaktiven Grundzustand zurück [10].

Die verschiedenen G-Proteine regulieren unterschiedliche Signalwege in den Thrombozyten (Tabelle 1) [10-11].

G_q aktiviert die β -Isoform der Phospholipase C β (PLC β), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) spaltet.

IP₃ induziert einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels durch Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern [12], wodurch zahlreiche Kalzium-abhängige Enzyme reguliert werden. Dazu zählen z.B. die Zyklooxygenase, die Thromboxan-Synthase oder die Kalzium-/Calmodulin-abhängige *myosin light chain kinase* (MLCK), die durch Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (MLC) eine Reorganisation des Zytoskeletts einleitet [13-14]. Diese führt zur Formveränderung (*shape change*) des Thrombozyten, welche zusammen mit einer Aktivierung von G_{12} und G_{13} , die über den Rho/Rho-Kinase-Weg die Myosinphosphatase hemmen und so Ca^{2+} - unabhängig die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins verstärken, vermittelt wird [15].

DAG, das zweite Produkt der PLC-Reaktion, aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über Phosphorylierung der Substrate Pleckstrin und *myristoylated alanine-rich C kinase substrate* (MARCKS) zur Sekretion von intrazellulären Speicherorganellen (Granula) beiträgt [16-18]. Bei der Granulasekretion werden vasoaktive und prokoagulatorische Substanzen wie *platelet derived growth factor* (PDGF), Kalzium, Gerinnungsfaktoren, ADP, Serotonin und Fibrinogen freigesetzt. Über die thrombozyteneigenen Rezeptoren verstärken diese den Aktivierungsprozess, aktivieren damit auch benachbarte Thrombozyten und wirken zusätzlich auf die Endothelzellen.

G_i hemmt die Adenylylzyklase und reduziert so die intrazelluläre Konzentration des in Plättchen aggregationshemmenden Signalmoleküls cAMP. Zudem sind es vermutlich die $\beta\gamma$ -Komplexe der G_i -Proteine, die über Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) an der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors beteiligt sind [19-20].

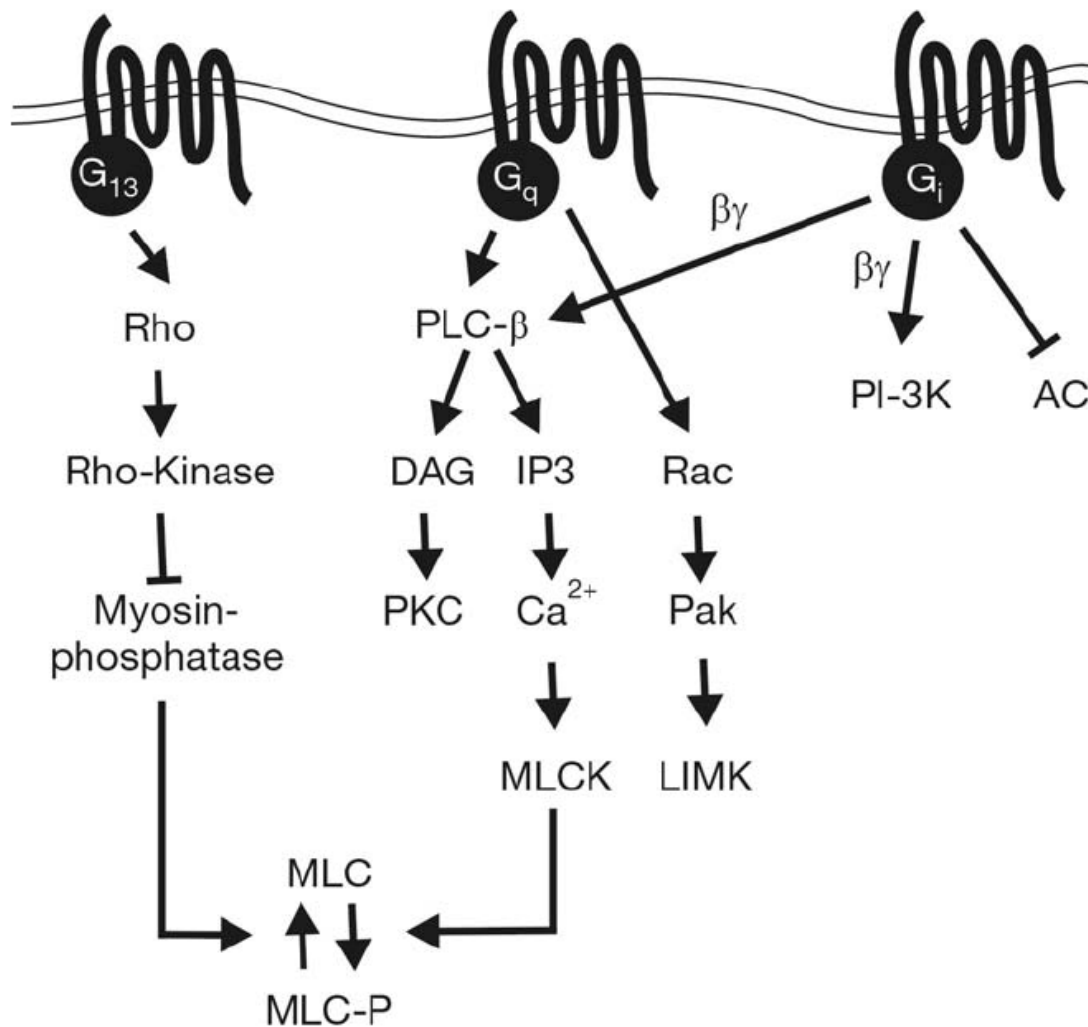


Abbildung 2: Signalwege der Thrombozytenaktivierung [21]

Abkürzungen: AC: Adenylyl Zyklase; DAG: Diacylglycerol; IP3: Inositoltriphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLC - β : Phospholipase C - β ; MLC: Myosin-light-chain; MLCK: Myosin-light-chain-kinase;

1.2.3. Hemmung von Thrombozyten

Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen sind unter physiologischen Bedingungen einer strengen Regulation unterworfen. Intaktes Endothel produziert ständig lokal wirkende Thrombozyteninhibitoren wie z.B. NO (*EDRF = endothelium derived relaxing factor*) und Prostacyclin (PG-I_2), die eine Aktivierung der Thrombozyten und damit die Thrombusbildung verhindern [22-23].

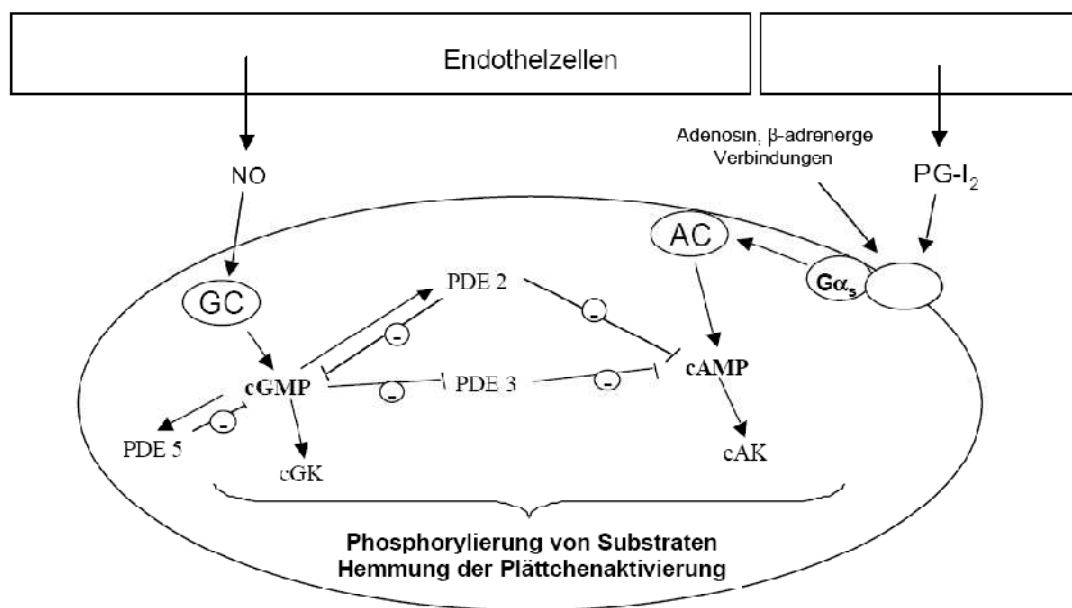


Abbildung 3: Regulationsmechanismen der Plättchenhemmung

Die meisten Plättchenantagonisten erhöhen die intrazelluläre Konzentration an zyklischen Nucleotiden (cGMP, cAMP). PG-I_2 und PG-E_1 z. B. binden an $\text{G}\alpha_s$ -Protein gekoppelte Prostaglandin-Rezeptoren, wodurch die $\text{G}\alpha_s$ Untereinheit freigesetzt und die Adenylatzyklase (AC) aktiviert wird, bei der es sich um ein integrales Membranglykoprotein handelt, das die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert. NO und andere Stickstoffmonoxid-Donoren hingegen stimulieren direkt die zytosolische Guanylatzyklase (GC). Die erhöhten Zyklonucleotidspiegel wiederum aktivieren zyklonucleotidabhängige Kinasen (PKG/PKA), deren Substrate dadurch phosphoryliert werden [22, 24]. Dieser Vorgang ist verantwortlich für die Hemmung zahlreicher Plättchenfunktionen, wie die Hemmung des Kalziumsignals [25-26], der Adhäsion, der Fibrinogenbindung [27] und der Aggregation [22].

Die Zyklonukleotide cAMP und cGMP regulieren Phosphodiesterasen (PDE) und werden selbst durch diese reguliert [28]. Drei verschiedene Subtypen dieser Zyklonukleotid-abbauenden Enzyme sind in humanen Plättchen nachgewiesen worden [29]: die unspezifische cGMP-stimulierte PDE 2, die cGMP-inhibierte und cAMP spezifische PDE 3 und die cGMP-stimulierte und cGMP spezifische PDE 5. Die synergistische Hemmung der Plättchenfunktion durch Stickstoffmonoxid und PG-I₂ [30] beruht auf der Hemmung der PDE 3 durch cGMP. Im Falle einer Hemmung dieses Enzyms durch cGMP führt der gehemmte Abbau von cAMP zu einer relativen Erhöhung der cAMP Konzentration im Zellinneren. Dieser Anstieg an cAMP wird wiederum limitiert durch die PDE 2, die cAMP direkt abbaut und zusätzlich indirekt durch die PDE 5, die cGMP hydrolysiert [31].

1.2.4. Regulation der Inhibition und Aktivierung von Thrombozyten

Überschneidungen in den Signalwegen der Plättchenhemmung und -aktivierung können über gemeinsame Zieleffektoren oder über eine Phosphorylierung von Proteinen der gegenseitigen Signalkaskade erfolgen.

Ein Beispiel für eine Überschneidung an einem gemeinsamen Zieleffektor stellt die Adenylyl-Cyclase (AC) dar. Sie wird durch Plättchenaktivatoren wie ADP oder Adrenalin inhibiert [32-33]. Diese treten damit in direkte Konkurrenz mit Plättcheninhibitoren wie PG-I₂ oder Adenosin, die die AC stimulieren [9]. Die Phosphorylierung von Proteinen stellt dabei vermutlich den wichtigsten Regulationsmechanismus der Plättchenaktivität dar. Es konnten bisher eine Reihe von Substraten der PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) und PKG (cGMP-abhängige Proteinkinase) identifiziert werden [22, 24], wobei die Phosphorylierung der einzelnen Proteine unterschiedliche Auswirkung auf die Plättchenaktivität haben kann. So kann die Zyklonukleotid-vermittelte Auswirkung von Substraten die Plättchenaktivierung an verschiedenen Stellen der Signalkaskade hemmen: Phosphorylierung der α -Untereinheit des G₁₃-Proteins inhibiert die Rho/Rho-Kinase Signalkaskade und damit die Umorganisation des Zytoskeletts [34]. Auch die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern durch die Phosphorylierung des IP₃-Rezeptors wird vermindert [35]. Zahlreiche weitere Zytoskelett-assoziierte Proteine wie ABP (*actin binding protein*) [36], Caldesmon [37] und VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) werden ebenfalls durch Zyklonukleotid-abhängige Kinasen reguliert

[27, 38-39]. Auf der anderen Seite kann Phosphorylierung auch im Sinne eines selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus (negativer Feedback-Mechanismus) zu einer Schwächung der Zyklonukleotid-vermittelten Plättcheninhibierung führen. In humanen Thrombozyten verstärkt die Phosphorylierung der PDE 3 [40] und der PDE 5 [41] den Abbau von cAMP bzw. cGMP. Es sind zwar weitere Substrate der PKA und PKG in anderen Zelltypen nachgewiesen worden, deren Relevanz für Plättchen bisher jedoch nicht belegt ist [22].

1.2.5. Charakterisierung des Thrombinrezeptors

Thrombin stellt in der plasmatischen Gerinnung als stärkster Plättchenaktivator in vitro und in vivo [42] das wichtigste Enzym dar. Thrombin liegt im Plasma als Serinprotease in inaktiver Form vor (Prothrombin) und wird erst im Verlauf der Gerinnungskaskade durch Faktor Xa und Va aktiviert. Neben seiner Proteaseaktivität, welche durch Spaltung von Fibrinogen die Bildung von Fibrin bewirkt, kann Thrombin durch Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors die Signaltransduktion u.a. im Thrombozyten aktivieren. Es induziert die Formveränderung der Blutplättchen, aktiviert die Integrine, fördert die Sekretion und die Ausschüttung von Thromboxan-A₂ (TxA₂) und stimuliert die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche [1].

Es gibt 2 Bindungsstellen für Thrombin auf der Plättchenoberfläche: eine hochaffine Bindungsstelle, die im Bereich des Glykoproteins Ib liegt, und eine mäßigaffine, die über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) auf der Oberfläche der Thrombozyten vermittelt wird. Es wurden bisher vier PARs entdeckt (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4), wobei nur PAR2 nicht durch Thrombin, sondern durch Trypsin aktiviert wird. PAR1 und PAR4 befinden sich an der Oberfläche menschlicher Thrombozyten, während PAR2 und PAR3 nur auf Mausplättchen exprimiert werden [43-44]. Die PARs gehören zu einer Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Thrombin geht eine Bindung mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor ein, indem das aktive Zentrum an die extrazelluläre Domäne des Thrombinrezeptors im Bereich der Spaltungsstelle LDPR-S bindet. Zusätzlich lagert sich Thrombin über die Anionenbindungsstelle an die hirudinähnliche Domäne des Thrombinrezeptors an. Dadurch wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gespalten und der Rezeptor über den „tethered ligand“ aktiviert (siehe Abbildung 3+4). Während diesem Bindungsprozess entsteht außerdem ein proteolytisches freies Polypeptid (SFLLRN-x),

welches aufgrund seiner Aminosäuresequenz SFLLRN („*thrombin-receptor activating peptide*“ = TRAP) direkt den Thrombinrezeptor auf Thrombozyten aktivieren kann [1].

Signalwege von PARs

Die PAR Rezeptoren sind an G-Proteine der $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_i$ Familien gekoppelt. $G\alpha_i$ inhibiert die Adenylylzyklase (AC). Dies führt zu einem Abfall des cAMP Spiegels und steigert die Empfindlichkeit der Thrombozyten. Die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert $PLC\beta$, wodurch es zu einem Anstieg von 1,4,5-Inositol-Triphosphat (IP₃) und zytosolischem Kalzium kommt. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg des PKC-aktivierenden Diacylglycerols (DAG). Das Kalzium reguliert Kinasen, Tyrosinkinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und die Integrinaktivierung [45]. Die $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten sind an den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine-nucleotide exchange factor* = GEF) gekoppelt, welcher kleine GTPasen aktiviert, mit deren Hilfe es zur Reorganisation des Zytoskeletts und somit zur Formveränderung, Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen kommt [15].

Die Bedeutung hingegen der Interaktion zwischen Thrombin und Glykoprotein Ib, welches Bestandteil des vWF-Rezeptors GPIb-V-IX ist, für die Plättchenfunktion ist bisher noch nicht eindeutig geklärt.

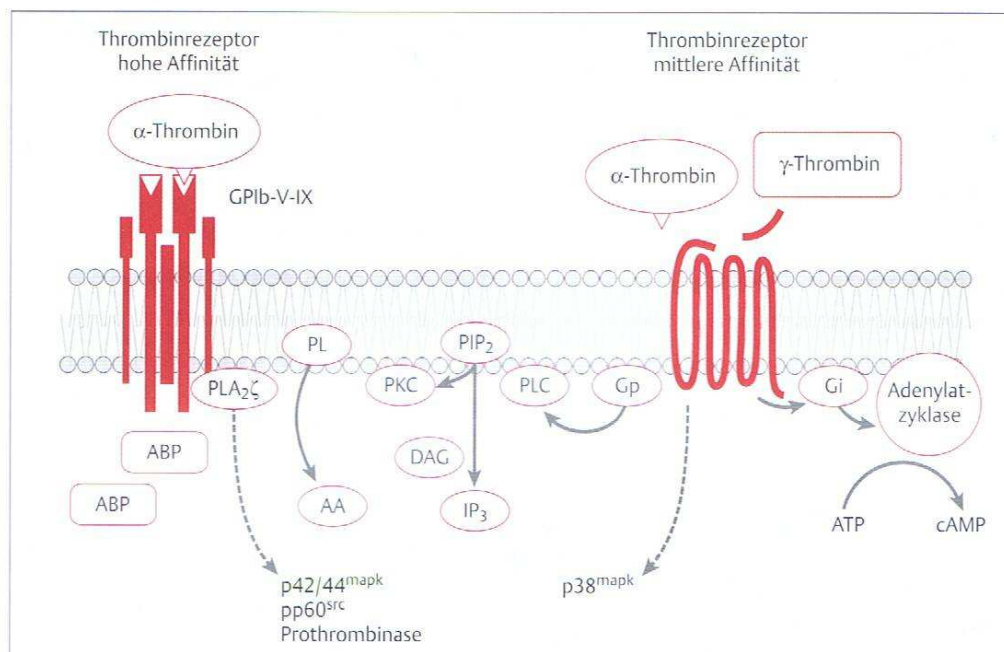


Abbildung 3: Thrombozytäre Thrombinrezeptoren [1]

Quelle: Gawaz, M., *Das Blutplättchen*. 1999: Georg Thieme Verlag

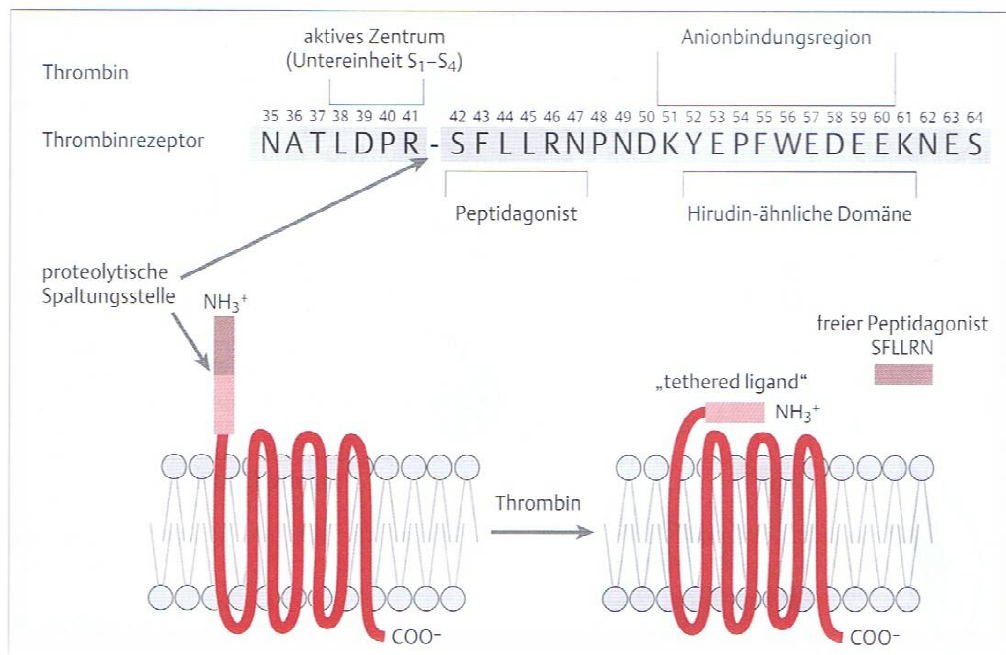


Abbildung 4: Proteolytische Spaltung des Thrombinrezeptors [1]

Quelle: Gawaz, M., *Das Blutplättchen*. 1999: Georg Thieme Verlag

1.3. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Es ist weithin anerkannt, dass cGMP durch die Regulierung der Proteinkinase G (PKG) die Aktivierung von Thrombozyten hemmt [46-49]. Umso erstaunlicher und unerwarteter waren daher kürzlich veröffentlichte Studien, die von einem stimulatorischen Effekt der PKG in der Plättchenaktivierung berichteten [50-52]. Im Einzelnen geht eine Forschergruppe aus Chicago davon aus, dass cGMP eine biphasische Rolle in Thrombozyten spielt. Demnach führt cGMP zu einer initialen PKG-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von ERK (*extracellular signal-related kinase*), welche mit der Aggregation und Aktivierung von Plättchen assoziiert ist, gefolgt von einer verspäteten PKG-abhängigen VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) Phosphorylierung, welche zu einer Plättchenhemmung führt [50-51]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Plättchenaggregation in menschlichen Thrombozyten in Folge von Stimulation mit vWF und niedrig-dosiertem Thrombin durch PKG-Inhibitoren gehemmt und durch PKG-Aktivatoren gesteigert wird.

Vorarbeiten in unserem Labor haben jedoch gezeigt, dass sich die Wirkung von cGMP auf die Hemmung der Thrombozytenaktivierung beschränkt. Schon nach einem Zeitraum von ca. 30 Sek konnte in verschiedenen Versuchen eine Inhibition der durch bekannte Plättchenaktivatoren induzierten Plättchenaktivierung mittels diverser zyklischer und nicht-zyklischer GMP-Derivate nachgewiesen werden [53]. In keinem unserer Versuche jedoch zeigte sich eine durch cGMP gesteigerte Aktivierung der Plättchen.

Somit bestand meine Aufgabe im Rahmen dieser Doktorarbeit darin, den von der Gruppe aus Chicago dargestellten Effekt mit den gleichen zyklischen und nicht-zyklischen GMP-Derivaten zu wiederholen und gegebenenfalls zu widerlegen sowie zusätzliche weitere cGMP- bzw. GMP-Nukleotide auf einen möglichen hemmenden Effekt hin zu testen und gegebenenfalls einen möglichen Rezeptor bzw. Wirkmechanismus für diesen hemmenden Effekt zu finden bzw. in Frage kommende Mechanismen auszuschließen.

Als essentieller Marker für die Aktivierung von Thrombozyten wurde in meinen Versuchen die Zunahme von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche, die intrazelluläre Kalziumfreisetzung im Thrombozyten sowie die Phosphorylierung von ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) gemessen. ERK gehört zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und zählt gemäß seiner modifizierten Gruppe zu den Serin/Threonin-Kinasen, welche durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimulatoren wie z.B. Wachstumsfaktoren und Hormonen aktiviert werden. Die Familie der MAP-Kinasen wird in vier Gruppen unterteilt, von denen bis jetzt drei in Thrombozyten identifiziert werden konnten: ERK1/ERK2 [54], p38 [55] und c-Jun NH₂-terminale Kinase [56]. Diese werden aktiviert, wenn Plättchen durch verschiedene Agonisten stimuliert werden. Der Signalweg besteht aus einer Kaskade von Proteinkinasen (Raf1, MEK1, ERK1/ERK2), die nacheinander weitere Kinasen aktivieren. ERK kann u.a. die zytoplasmatische Phospholipase A2 phosphorylieren und damit aktivieren, welche ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym in der Synthese von Thromboxan-A₂ darstellt.[50]

Der Nachweis der Plättchenaktivierung durch ERK, u.a. durch den physiologischen Agonisten Thrombin aktiviert bzw. phosphoryliert [50, 57], wurde von mir durch Western-Blots und FACS-Analysen ermittelt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Apyrase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
D-Glucose 99,5% GC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Page Ruler Prestained Protein Ladder (Proteinstandard)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
D-PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Temed	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Peptidsequenz des Thrombinrezeptors	Biacore, Freiburg

2.1.2. Kits

Kit Bezeichnung	Bezugsquelle
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare, München

2.1.3. Lösungen und Puffer

ACD 2,5% Tri-Na-Citrat 2% D-Glucose 1,5% Zitronensäure	TBS-T 50 mM Tris/HCL, pH 7,5 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
PonceauS-Färbung 0,2% PonceauS 1,5% TCA 3% Sulfosalicylsäure	PBS(-T), pH 7,3 140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (0,05% Tween 20)
Hepes Puffer, pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM D-Glucose 10 mM HEPES H ₂ O	Western-Blot Transfer-Puffer 3 mM Na ₂ CO ₃ 10 mM NaHCO ₃ 0,01% SDS 20% Methanol
CGS-Puffer, pH 6,5 120 mM NaCl 12,9 mM Tri-Na-Citrat 30 mM D-Glucose H ₂ O	Transfer-Puffer (5l) 15 g Tris 25mM 72 g Glycin 192 mM 1 l Methanol 20 % 26,5 g NaOH, pH 10,0
SDS-Stop-Lösung 3x 2,42 g Tris / HCl in 70 ml Aqua, pH 6,7 6 g SDS 6 % 15 ml Glycerin 15 % 3 mg Bromphenolblau 1/10 Mercaptoethanol	

2.1.4. Antikörper

Bezeichnung	Typ	Hersteller	Verdünnung
Phospho-ERK	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
VASP-16C2	Maus IgG 1	Nanotools	1:3000
Goat-anti-mouse	monoklonal	Biorad Laboratories, München	1:5000
Goat-anti-rabbit	polyklonal	Biorad Laboratories, München	1 :5000

2.1.5. Thrombozytenaktivatoren und –inhibitoren

8-pCPT-cGMP 8-Br-cGMP 8-pCPT-5'-GMPs 8-Br-PET-5'-GMP 8-pCPT-Guanosin 8-Br-Guanosin Rp-8-pCPT-cGMPs Rp-8-Br-Pet-cGMPs	BioLog Life Science Institute, Bremen
SNP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Thrombin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TRAP-6	Bachem, Weil am Rhein

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung, Hersteller
Desinfektionsmittel	Teralind Liquid, Schülke&Mayr, Norderstedt/Deutschland
Filme für Chemiluminiszenz	X-RAY Film Super RX, FUJI Medical GmbH, Düsseldorf/Deutschland

PROTRAN® Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
Gel Blotting Paper	Whatman GmbH, Dassel
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Sicherheitshandschuhe	Flexan, Cardinal Health
Eppendorf Caps	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.7. Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Accu-jet pro, Pipette (elektrisch)	BRAND GmbH und Co, Wertheim
Dri-block DB 1 (Heizblock)	Techne®, Biostep, Jahnsdorf
FACSCalibur Durchflusszytometer	BD biosciences, Heidelberg
Feinwaagen	Sartorius Universal
Gel-Kammersystem	Biorad Laboratories GmbH, München
Hettich Zentrifuge Mikro 120	Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen
LS50 Luminometer	Perkin Elmer, Warrington, England
M35 X-OMAT Entwickler	Kodak AG, Stuttgart
Pipette (manual)	Eppendorf-Reference, Hamburg
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Spannungsgerät für Gelelektrophorese (EPS 601)	Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare, München
Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG, Zürich
Wasserbad D1	Haake, Karlsruhe
Zellzähler Coulter® MicroDiff 18	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Biacore Sensor Chip	Biacore, Freiburg

2.2. Methoden

2.2.1. Thrombozytenpräparation aus Vollblut

Die Thrombozyten werden aus frisch entnommenem, venösem Blut gesunder freiwilliger Spender isoliert, bei denen keine, die Thrombozytenfunktion beeinflussende, Medikation vorliegt [25]. Mittels einer Butterfly-Nadel der Größe 18 G wird die Vena

cubitalis des Spenders punktiert und das Blut durch freien Fluss ohne Aspiration in 1/7 seines Volumens in warmen ACD-Puffer (2.1.3) aufgenommen. Die Wahl möglichst großlumiger Punktionsnadeln soll den auf die Blutplättchen wirkenden Scherstress und somit die Gefahr der Präaktivierung reduzieren.

Durch Zentrifugation des Vollblutes für 10 Min bei Raumtemperatur und 330 x g kommt es zu einer Phasentrennung von PRP (Platelet-rich-plasma), Erythrozyten und Leukozyten. Mit einer Plastikpipette wird die obere PRP-Phase abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert. Dieses PRP wird mit Apyrase der Endkonzentration 0,1 U/ml versetzt und für 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wird das mit Apyrase versetzte PRP für 10 Min bei 400 x g zentrifugiert und die pelletierten Thrombozyten anschließend im gleichen Volumen CGS-Puffer (2.1.3) resuspendiert. Nach Zugabe von Apyrase der Endkonzentration 0,1 U/ml wird wiederum für 10 Min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und danach für 10 Min bei 400 x g zentrifugiert. Danach werden die pelletierten Thrombozyten in vorgewärmtem HEPES-Puffer (2.1.3) resuspendiert, um so gewaschene Thrombozyten zu erhalten.

Alle Versuche mit Thrombozyten werden im Wasserbad bei 37°C und unter ausschließlicher Verwendung von Kunststoffpipetten, -gefäßen etc. durchgeführt, um eine Präaktivierung durch polare Glasflächen zu vermeiden. Für die Stimulierungsexperimente wird die Konzentration der Thrombozyten auf 3×10^8 /ml eingestellt und für jeden Versuchsansatz 100 µl eingesetzt.

2.2.2. Plättchenstimulation für Western-Blot und FACS-Analyse

Nach Vorinkubation der gewaschenen Thrombozyten im Wasserbad bei 37°C mit einem Derivat (8-pCPT-cGMP, 8-Br-cGMP, 8-pCPT-5'-GMPS, 8-Br-PET-5'-GMP, 8-pCPT-Guanosin, 8-Br-Guanosin, Rp-8-pCPT-cGMPS, Rp-8-Br-Pet-cGMPS mit jeweils 200 µM Endkonzentration) für unterschiedliche Zeitpunkte werden die Plättchen für 1 Min mit Thrombin (0,005 U/ml) oder TRAP6 (20 µM) stimuliert. Anschließend werden alle Proben gleichzeitig für Western-Blot und FACS-Analyse mit SDS-Stop-Lösung (2.1.3) abgestoppt.

Pipetier-Schema:

- x-mal 100 µl *washed platelets* vorlegen
- Jeweils 2 µl Derivat (Endkonzentration 200 µM) dazugeben
- Nach 15 Sek, 30 Sek, 1 Min, 2 Min, 5 Min, 10 Min jeweils für 1 Min mit 1 µl Thrombin/TRAP6 inkubieren
 - Nach 1 Min mit 50 µl SDS-Stop-Solution abstoppen
- Kontrolle I nur mit SDS-Stop-Solution abstoppen
- Kontrolle II für 1 Min mit 1 µl Thrombin/TRAP6 inkubieren
 - Nach 1 Min mit 50 µl SDS-Stop-Solution abstoppen

2.2.3. Denaturierende Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt in diskontinuierlichen Gelsystemen unter denaturierenden Bedingungen. Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) werden 9 x 15 cm Gele der Dicke von 1 mm angefertigt. Diese bestehen aus einem 10 % Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel. Verwendet wird das Gelkammersystem Mini PROTEAN3. Die genaue Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist den folgenden Tabellen zu entnehmen.

<u>Sammelgel:</u>		<u>10 % Trenngel:</u>	
Acrylamid	0,7 ml	Acrylamid	6,6 ml
Puffer A	0,65 ml	Puffer B	2,5 ml
SDS 10 %	50 µl	SDS 10 %	0,2 ml
dH ₂ O	3,77 ml	dH ₂ O	10,6 ml
Temed	5 µl	Temed	10 µl
APS 10 %	50 µl	APS 10 %	0,2 ml
<u>Puffer A:</u>	0,5 M Tris/HCl pH 6,7		
<u>Puffer B:</u>	3 M Tris/HCl pH 8,9		
<u>APS 10 %:</u>	10 % Ammonium-Persulfat in dH ₂ O		
<u>SDS 10 %:</u>	10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat in dH ₂ O		

Vor Beladen des Gels werden alle Proben durch Zugabe von SDS-Stop-Solution (s.u.) und anschließendem kurzem Aufkochen (5 Min bei 95°C) denaturiert. Für jeden Gellauf wird ein Proteinmarker (s. u.) eingesetzt. Nach Auftragen der Proben und Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes werden die denaturierten Proteine zunächst im Sammelgel konzentriert und danach im Trenngel entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Bis die blaue Farbfront der SDS-Stop-Solution das Trenngel erreicht hat, wird eine Spannung von 70 V angelegt. Mit Erreichen des Trenngels wird diese auf 140 V erhöht, bis die blaue Farbfront das Gelende durchlaufen hat. Damit ist die Elektrophorese beendet.

SDS-Stop-Solution 3x:

2,24 g Tris/HCl in 70ml Aqua pH 6,7
6 g SDS 6 %
15 ml Glycerin 15 %
3 mg Bromphenolblau
1/10 Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer 10x (für 4 l):

120g Tris pH 8,9
40 g SDS
576 g Glycin

Als Protein-Standard wurde der "PageRuler® Prestained Protein Ladder" der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

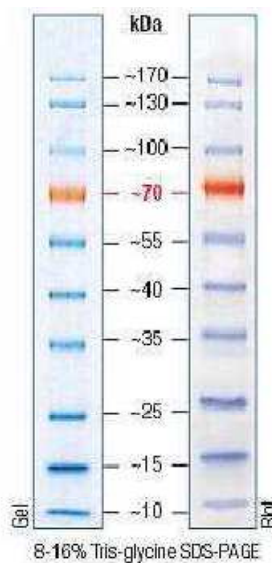


Abbildung 5: Proteinstandard "PageRuler® Prestained Protein Ladder"

2.2.4. Immunologischer Proteinnachweis durch Western Blot

2.2.4.1. Transfer auf Nitrozellulosemembran

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden nun vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierzu wird eine Mini-Transblot-Zelle verwendet. Die Nitrozellulose wird luftblasenfrei auf das beladene Polyacrylamidgel gepresst und beide Schichten dann zusammen zwischen Blottingpapiere gelegt, die in Transferpuffer (2.1.3) vorgequollen wurden. Dieses Schichtwerk wird wiederum zwischen zwei Kunststoffvliese in einem Plastikgitter gepresst. Das Kunststoffgitter mit den enthaltenen Schichten wird dann in die mit Transferpuffer (2.1.3) gefüllte Blotkammer gesetzt, wobei die Nitrozellulosemembran zum Positivpol der Blotkammer zeigt. Der Proteintransfer erfolgt anschließend für eine Stunde bei einer Stromstärke von 2 A im Kühlraum bei 4°C, da sich durch das Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes der Transferpuffer auf über 40° erhitzen kann und dies dann zur vollständigen Zerstörung der Proteine führen könnte, wenn der Transfer bei Raumtemperatur stattfinden würde.

2.2.4.2. Proteinfärbung auf der Nitrozellulosemembran

Zur Evaluation der Transfereffizienz wird die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S für eine Minute angefärbt und der Hintergrund durch Schwenken in dH₂O entfärbt. Zur Dokumentation wird danach das Bandenmuster auf der Nitrozellulosemembran fotokopiert und anschließend wieder mit TBS (2.1.3) entfärbt.

2.2.4.3. Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern

Nach dem Transfer auf die Nitrozellulose werden unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBS-T oder PBS-T (2.1.3.) abgeblockt. Die Inkubation findet bei Raumtemperatur für eine Stunde unter Schütteln statt. Im Anschluss daran wird die Membran über Nacht mit dem in TBS-T/Milk bzw. PBS-T/Milk verdünnten Primärantikörper bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Nitrozellulose 3-mal mit TBS-T bzw. PBS-T für jeweils 5 Min bei Raumtemperatur gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Erstantikörpers erfolgt durch einen

Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und nachfolgende Chemilumineszenz-Reaktion. Hierzu wird die Nitrozellulosemembran mit dem in TBS-T/Milk bzw. PBS-T/Milk verdünnten Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und danach fünfmal je 5-10 Min mit TBS-T bzw. PBS-T gewaschen, um nicht gebundene Zweitantikörper zu entfernen. Zur Detektion des Proteins auf den behandelten Membranen wird die Nitrozellulose dann für eine Minute mit ECL-Detektionsmix bedeckt. Nach Abtropfen der Detektionslösung wird die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt, mit einem Lineal glatt gestrichen und sofort für einige Sekunden bis mehrere Minuten auf einem ECL-Film in einer Dunkelkammer exponiert. Dieser Film wird danach von einem Entwickler der Firma Kodak entwickelt.

2.2.5. Kalzium-Messung

Die Bestimmung der intrazellulären Kalzium-Konzentrationsänderungen in Thrombozyten erfolgt nach der von *Sage et al. (1990)* [58] und *Geiger et al. (1992)* [25] beschriebenen Methode.

Freies Kalzium wird mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 gemessen. Das Absorptionsmaximum für freies Fura-2 liegt bei 362nm, das entsprechende Emissionsmaximum bei 518 nm, während der Fura-2-Kalzium-Komplex ein Absorptionsmaximum bei 335 nm und eine maximale Emission bei 510 nm hat. Die Bestimmung der Fura-2 Fluoreszenz wird im Perkin-Elmer LS50 Luminometer mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm (Spaltweite 10 nm) und einer Registrierung der Emission bei 510 nm (Spaltweite 6-7 nm) durchgeführt, so dass spezifisch die Fluoreszenz des Fura-2-Kalzium-Komplexes und damit des freien Kalziums im Zytosol gemessen wird. Bei den Messwerten handelt es sich um Daten der vom Messgerät vorgegebenen Größenordnung von 0 bis 1000. Sie erlauben keine direkten Rückschlüsse auf die Absolutkonzentration an Kalzium im Blutplättchen, ermöglichen aber die exakte Feststellung von relativen Änderungen der intrazellulären Konzentration an Kalzium. Während des Messvorganges wird die Thrombozytensuspension (in einer Quarzküvette) durch einen Magnetrührer gemischt und durch eine Wasserheizung bei einer konstanten Temperatur von 37 °C inkubiert.

Für die Messung werden die Thrombozyten zuerst mit Fura-2 / AM in PRP für 45 min. bei 37 °C inkubiert [53]. Der überschüssige Farbstoff und das Plasma werden

anschließend durch Zentrifugation von den Blutplättchen getrennt und verworfen. Die Thrombozyten werden dann in HEPES-Puffer resuspendiert und auf eine Zelldichte von ca. 2×10^8 Blutplättchen / ml eingestellt. Unmittelbar vor dem Experiment werden 1 mM Ca^{2+} zu der Plättchensuspension hinzu gegeben.

2.2.6. FACS-Analyse: P-Selektin Expression

Für die Bestimmung der durch Thrombin induzierten Aktivierung der Thrombozyten wurde eine durchflusszytometrische Analyse (FACS) durchgeführt. Die Sekretion von P-Selektin (CD 62) aus den Granula und ihre Exposition an der Thrombozytenoberfläche während der Aktivierung wird am Durchflusszytometer mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers dargestellt [53, 59].

200 μl der mit Thrombin und Zyklonukleotiden/Nukleotiden stimulierten Plättchensuspension werden mit 20 μl 10%igem Formaldehyd versetzt und 10 Min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Proben bei 2700g Umdrehung in einer Eppendorf-Zentrifuge für 1min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Membranpumpe abgesaugt und das Pellet in 150 μl PBS mit 0,5% BSA resuspendiert. 20 μl davon werden in ein Lichtschutzreaktionsgefäß pipettiert, in das vorher entweder 3 μl Anti-CD62p-FITC-Antikörper oder 5 μl Anti-CD62/PRE-Antikörper (Antikörper wurde auf 1:5 in BSA verdünnt) vorgelegt wurden. Dieses Reaktionsgefäß wird weitere 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1ml kaltem PBS verdünnt. Die Proben können bis zur Messung im Kühlschrank (4°C) gelagert werden.

Danach werden sie im FACS-Calibur der Firma Becton Dickson gemessen. Zur Auswertung der gewonnenen Daten wird das Programm CellQuest Pro verwendet.

2.2.7. Biacore Messung

Biacore Systeme nutzen die Oberflächen-Plasmonen Resonanz (SPR) [60-61] zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. Mit dem Gerät der Firma Biacore können Protein-Protein Interaktionen in einer Lösung detektiert werden. Dabei wird ein Ligand (in unserem Fall ein biotinyliertes Thrombinrezeptorpeptid mit der Sequenz Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu-Ser-Lys-Biotin-NH₂ auf einem Sensor Chip an eine Matrix (mittels Streptavidin) gekoppelt, die auf eine

Goldschicht aufgebracht ist (siehe Abbildung 6). Weißes Licht wird nun an der Metalloberfläche gespiegelt, während das Elektronenplasma im Gold Wellenlängen der Resonanzfrequenz absorbiert. Diese Wellenlänge wird daher nicht reflektiert. Man nennt diesen Effekt „Surface Plasmon Resonance“ (SPR). Wird das reflektierte Licht über ein Prisma gebrochen, so kann die Resonanzfrequenz als „Schatten“ detektiert werden. Durch Bindung z.B. eines Proteins aus der Lösung an das matrixfixierte Protein kommt es zu Veränderungen in der Umgebung der Goldschicht und somit verschiebt sich die Resonanzfrequenz. Diese Veränderung wird als Winkelveränderung des „Schattens“ gemessen und als „Response Units (RU)“ relativ zur Ausgangssituation angegeben. Um unspezifische Interaktionen mit dem Matrixmaterial zu detektieren, überfließt die lösliche Probe zuerst eine Probenkammer ohne immobilisiertes Protein, bevor es in die Probenkammer mit dem kovalent fixierten Protein gelangt. Das Differenzsignal beider Kammern wird als „relative Response Units (relRU)“ angegeben und ist ein Maß für spezifische Bindung.

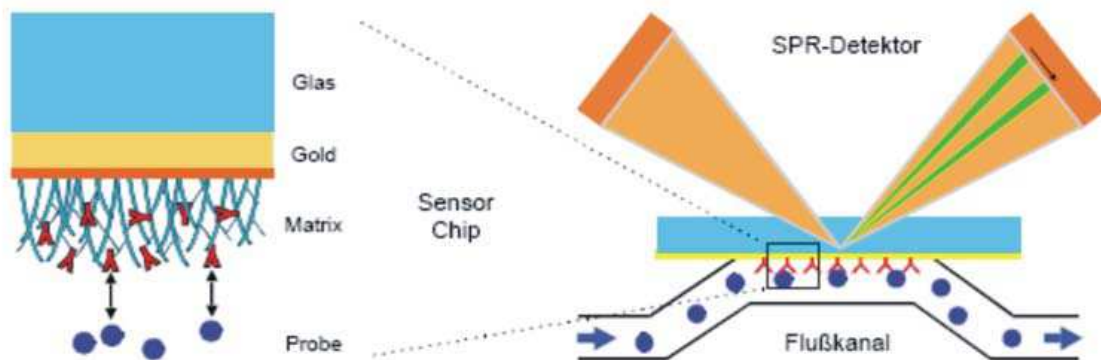


Abbildung 6: BIACORE Technologie. Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger, einer Goldschicht und der Oberflächen-Matrix, an die der Ligand immobilisiert wird. Der Analyt wird in einem Fließsystem an dem Liganden vorbeigeführt. Der optische SPR-Detektor liegt an der Glasseite des Chips und misst die Massenzunahme der Matrix bei einem Bindungsereignis. Eine Bindung führt direkt zu einer Änderung des SPR-Winkels und somit zum Signalausschlag. Weniger als 1 pg/mm^2 ($= 1 \text{ RU}$) können angezeigt werden. [62]

Ein Sensogramm (siehe Abbildung 7) stellt die Veränderung des SPR-Winkel während eines Bindungsereignisses in Abhängigkeit von der Zeit dar. Die Stärke des Resonanzsignals wird in den Resonanzeinheiten (RU) angegeben. Das Sensogramm

verdeutlicht direkt die Assoziation und Dissoziation des Analyten (in unserem Versuch Thrombin und Derivate) an den Liganden.

Der Sensorchip wurde zunächst in das Fließsystem eingebaut und eine halbe Stunde mit Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Immobilisierung des Thrombinrezeptorpeptids an Streptavidin. Nachdem nochmals eine Stunde mit Puffer gespült und somit überflüssiges Peptid weggewaschen wurde, konnten sowohl Thrombin als auch die Derivate in verschiedenen Konzentrationen injiziert werden. Danach wurde der Chip regeneriert, indem nacheinander bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten für 1-2 h mit Puffer gespült wurde.

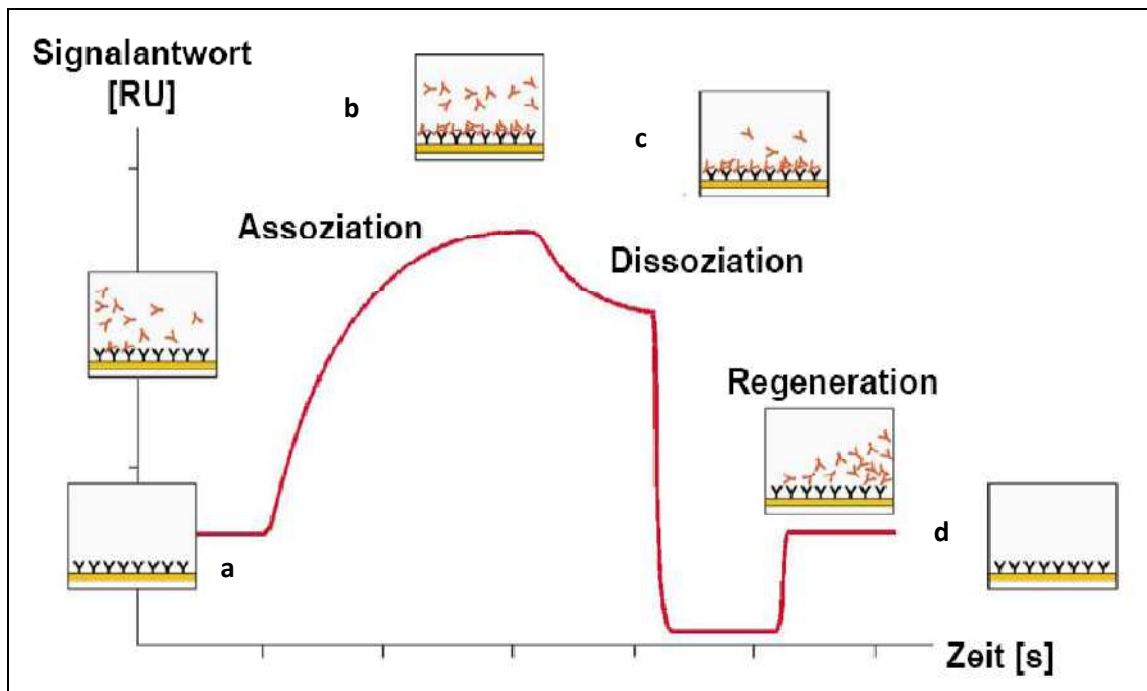


Abbildung 7: Typisches Sensogramm einer Biacore Messung. In den Kästchen ist der Zustand am Sensorchip dargestellt: a) Basislinie im Pufferfluss, b) Probeninjektion, Bindung und Signalanstieg, c) Dissoziation und Signalabfall im anschließenden Pufferfluss, d) Basislinie nach der Regeneration [62]

3. Ergebnisse

3.1. Durchführung der Thrombozytenstimulation

Für die Stimulation der Thrombozyten werden jeweils 100 µl an gewaschenen Plättchen (siehe 2.2.1.) in Eppendorf Caps vorgelegt. Diese werden dann (wie unter Punkt 2.2.2. erläutert) stimuliert und nach jeweils 15 Sek, 30 Sek, 1 Min, 2 Min, 5 Min und 10 Min mit SDS-Stop-Lösung abgestoppt.

3.2. Nachweis der Plättchenaggregation (pERK-Western Blot)

Es ist allgemein anerkannt, dass cGMP über Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) die Effekte von Plättcheninhibitoren wie NO und Prostazyklin vermittelt. Aus einer Reihe von Experimenten und Veröffentlichungen von *Li, Du et al.* resultiert jedoch die Hypothese, dass die durch PKG vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von ERK zur Plättchenaktivierung durch Thrombin und vWF beiträgt [50-51]. Deshalb galt es in der vorliegenden Arbeit die mögliche PKG-vermittelte Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene PKG-Aktivatoren/Inhibitoren wie zyklische Nukleotide und deren korrespondierende nicht-zyklische Monophosphate zu untersuchen. Zur Quantifizierung der Plättchenaktivität im Western Blot wurde ein Phospho-spezifischer Antikörper gegen ERK-Kinase eingesetzt.

Neben Thrombin als bekanntem Aggregationsinitiator wurde noch TRAP 6 (Thrombin-aktivierendes Peptid 6), ein weiterer Plättchenaktivator, verwendet. Wie bereits in 1.2.5 erwähnt, wird der Thrombinrezeptor nach Bindung von Thrombin an die extrazelluläre Domäne gespalten und der Rezeptor über den „tethered ligand“ aktiviert (siehe Abbildung 4). Dabei entsteht zusätzlich das freie Polypeptid SFLLRN-X. Synthetische Peptide, die dem neuen Amino-Terminus des gespaltenen Thrombinrezeptors entsprechen, können ebenfalls an den Rezeptor binden und damit direkt den Plättchen-Thrombinrezeptor aktivieren [1]. Strukturaktivitätsanalysen der Thrombin-Rezeptor-aktivierenden-Peptide (TRAP) zeigten, dass minimal 5 Aminosäuren (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg) für die volle Aktivität des humanen Thrombinrezeptors benötigt werden [63-66].

3.2.1. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-cGMP und 8-Br-cGMP

Als erstes Derivat wurde das zyklische Nukleotid 8-pCPT-cGMP verwendet. Nach Präinkubation mit diesem etablierten Aktivator der PKG war eine zeitabhängige Hemmung der durch Thrombin stimulierten Phosphorylierung von pERK zu erkennen. Bereits nach 1 Min zeigte sich eine signifikante Inhibition der Plättchenaktivierung, die mit steigender Präinkubation (bis 10 Min) weiter zunahm (siehe Abbildung 8).

Zum Vergleich wurde ein weiteres, anerkanntes PKG-aktivierendes zyklisches Nukleotid, 8-Br-cGMP, getestet. Dieses zeigte im Western-Blot ebenfalls einen inhibierenden Effekt, wenn auch nicht so stark wie 8-pCPT-cGMP (Ergebnis nicht dargestellt).

Zu keinem Zeitpunkt der Versuche, weder mit 8-pCPT-cGMP noch mit 8-Br-cGMP, konnte ein aktivierender Effekt im Sinne einer Verstärkung der Stimulation von Thrombin auf die Thrombozyten beobachtet werden.

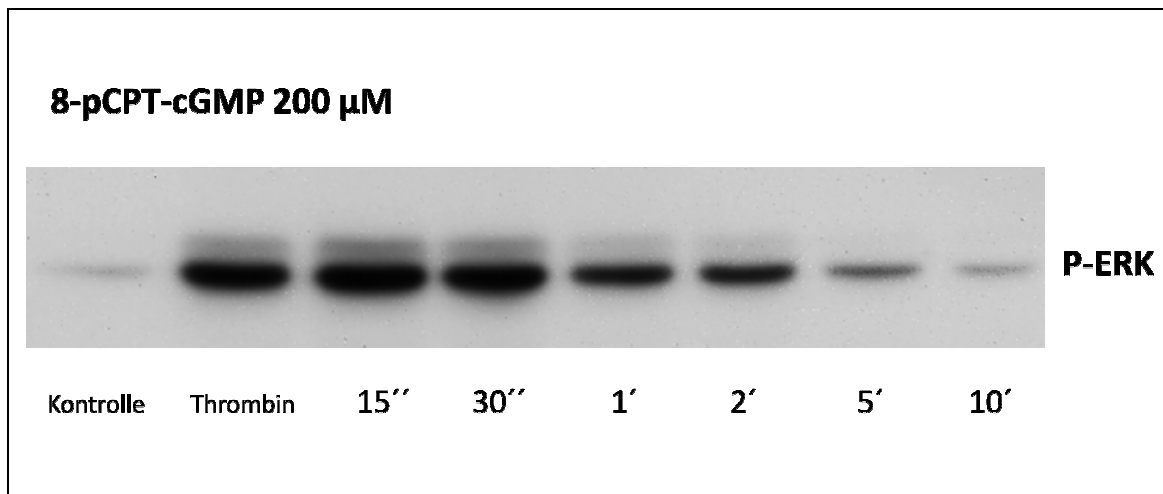


Abbildung 8: Zeitabhängige Inhibition der Thrombin-induzierten-Plättchenaktivierung durch den PKG-Aktivator 8-pCPT-cGMP 200 μ M in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten (3×10^8 /ml) wurden mit 8-pCPT-cGMP für die angegebenen Zeiten (0,25-10 Min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit Thrombin (0,005 U/ml). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von pERK-Phosphorylierung (Western-Blot) beobachtet. Man beachte die signifikante Inhibition der Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-cGMP schon zu einem frühen Zeitpunkt (1 Min).

3.2.2. Plättchenhemmung durch Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-PET-cGMPS

Nachdem sich mit Aktivatoren der PKG ein hemmender Effekt reproduzieren lies, galt es im nächsten Schritt, die Wirkung von Inhibitoren der PKG zu untersuchen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass es nach Hemmung der PKG zu einer regulären Aktivierung der Thrombozyten nach TRAP6/Thrombin-Stimulation kommt. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. In allen Versuchen mit PKG-Inhibitoren zeigte sich ein inhibierender Effekt auf die Plättchenaktivierung. Mit Rp-8-pCPT-cGMPS stellte sich, ähnlich wie bei 8-pCPT-cGMP, bereits nach 15 Sek eine Hemmung der Plättchenaktivierung dar. Auch Rp-8-Br-PET-cGMPS zeigte bereits nach 30 Sek – 1 Min eine verminderte Phosphorylierung von pERK (siehe Abbildung 9).

Diese Ergebnisse ergaben erste Anhalte dafür, dass es sich bei dem hemmenden Effekt der Derivate um einen PKG-unabhängigen Mechanismus handeln könnte, da die Wirkung zum einen sehr schnell und zum anderen sowohl mit Aktivatoren als auch Inhibitoren der PKG reproduzierbar war.

Kongruent zu den Aktivatoren der PKG stellte sich auch mit Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-PET-cGMPS zu keinem Zeitpunkt der Versuche ein aktivierender Effekt im Sinne einer Verstärkung der Stimulation von TRAP6/Thrombin auf die Thrombozyten ein.

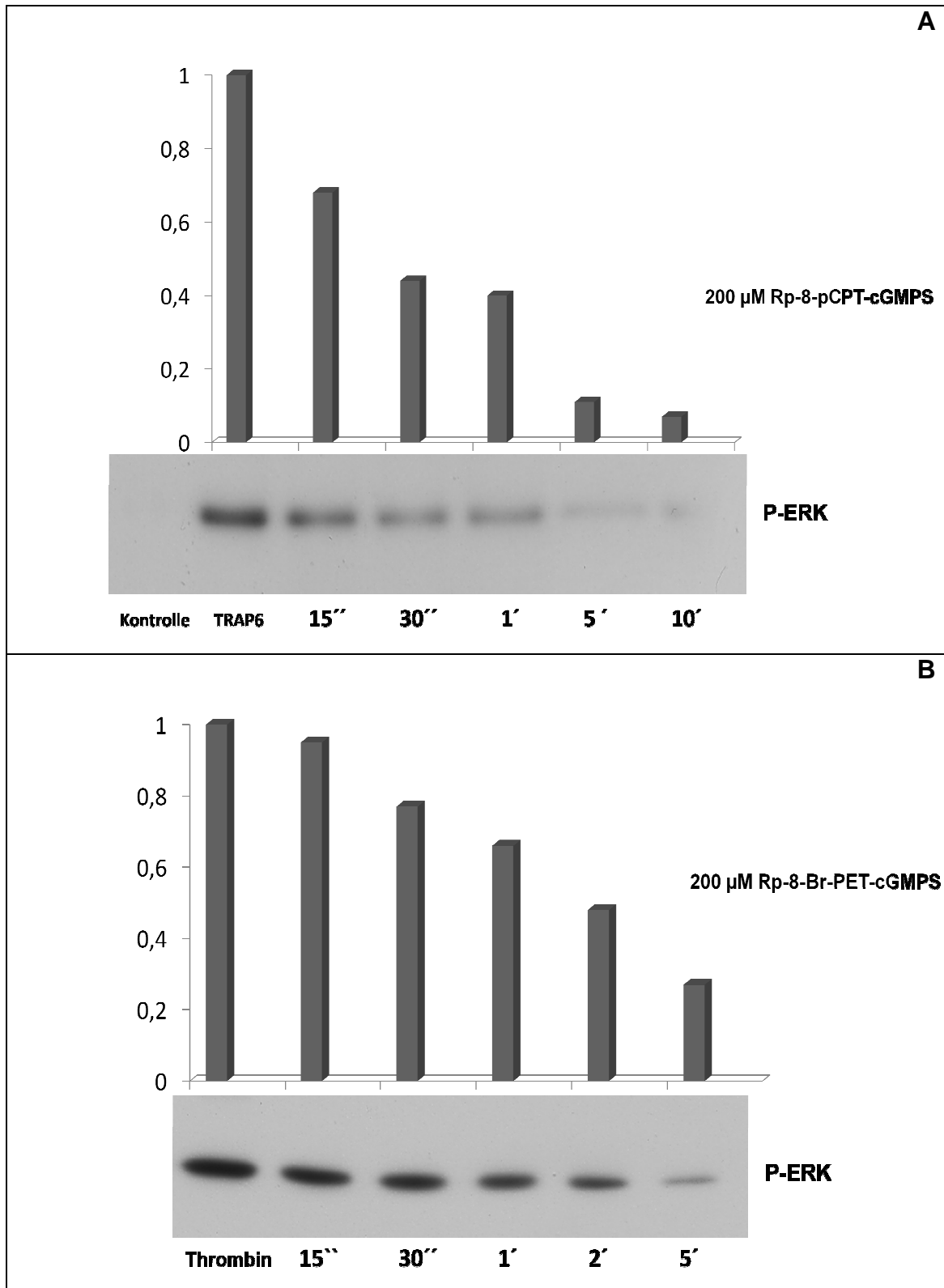


Abbildung 9: Zeitabhängige Inhibition der TRAP6/Thrombin-induzierten Plättchenaktivierung durch Rp-8-pCPT-cGMPS 200µM / Rp-8-Br-PET-cGMPS 200µM in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten ($3 \times 10^8/\text{ml}$) wurden mit Rp-8-pCPT-cGMPS (A) oder Rp-8-Br-Pet-cGMPS (B) für die angegebenen Zeiten (30 Sek-5 Min bzw. 10 Min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit TRAP6 (20 µM) oder Thrombin (0,005 U/ml). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von pERK-Phosphorylierung

(Western-Blot) verfolgt. Man beachte die signifikante Inhibition der Plättchenaktivierung durch Rp-8-pCPT-cGMPS bereits nach 30 Sek (Abbildung A), vergleichbar mit dem hemmenden Effekt von Rp-8-Br-PET-cGMPS nach 1 Min (Abbildung B).

3.2.3. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-5'GMP und 8-Br-PET-5'GMP

Nachdem die ersten Ergebnisse sowohl mit Aktivatoren als auch Inhibitoren der PKG eindeutig einen hemmenden Effekt von Zyklonukleotiden auf die Plättchenaktivierung zeigten, galt es im nächsten Schritt, Derivate, deren zyklische Ringstruktur aufgehoben war, auf ihre möglich hemmende Potenz hin zu testen. Dabei wurden 8-pCPT-5'GMP und 8-Br-Pet-5'GMP, zwei nicht-zyklische Guanosin-Monophosphat-Derivate verwendet. Mit beiden Substanzen konnte ebenfalls ein hemmender Effekt auf die Thrombin-induzierte Plättchenaktivierung reproduziert werden. Mit 8-pCPT-5'GMP zeigte sich bereits nach 15 Sek eine signifikante Inhibition der pERK-Phosphorylierung, welche erst nach 2-5 Min Inkubation wieder regredient war. Mit 8-Br-Pet-5'GMP war ebenfalls bereits nach 15 Sek ein hemmender Effekt auf die Plättchenaggregation zu beobachten (siehe Abbildung 10). Nach 2 Min kam es jedoch zu einem unerwarteten Anstieg der pERK-Phosphorylierung, welcher wahrscheinlich auf die zunehmende Thrombinaktivierung zurückzuführen ist. Diese scheint den hemmenden Effekt von 8-Br-PET-5'GMP zu verdrängen.

Auch bei den nicht-zyklischen Monophosphaten stellte sich zu keinem Zeitpunkt der Versuche ein aktivierender Effekt im Sinne einer Verstärkung der Stimulation von Thrombin auf die Thrombozyten ein.

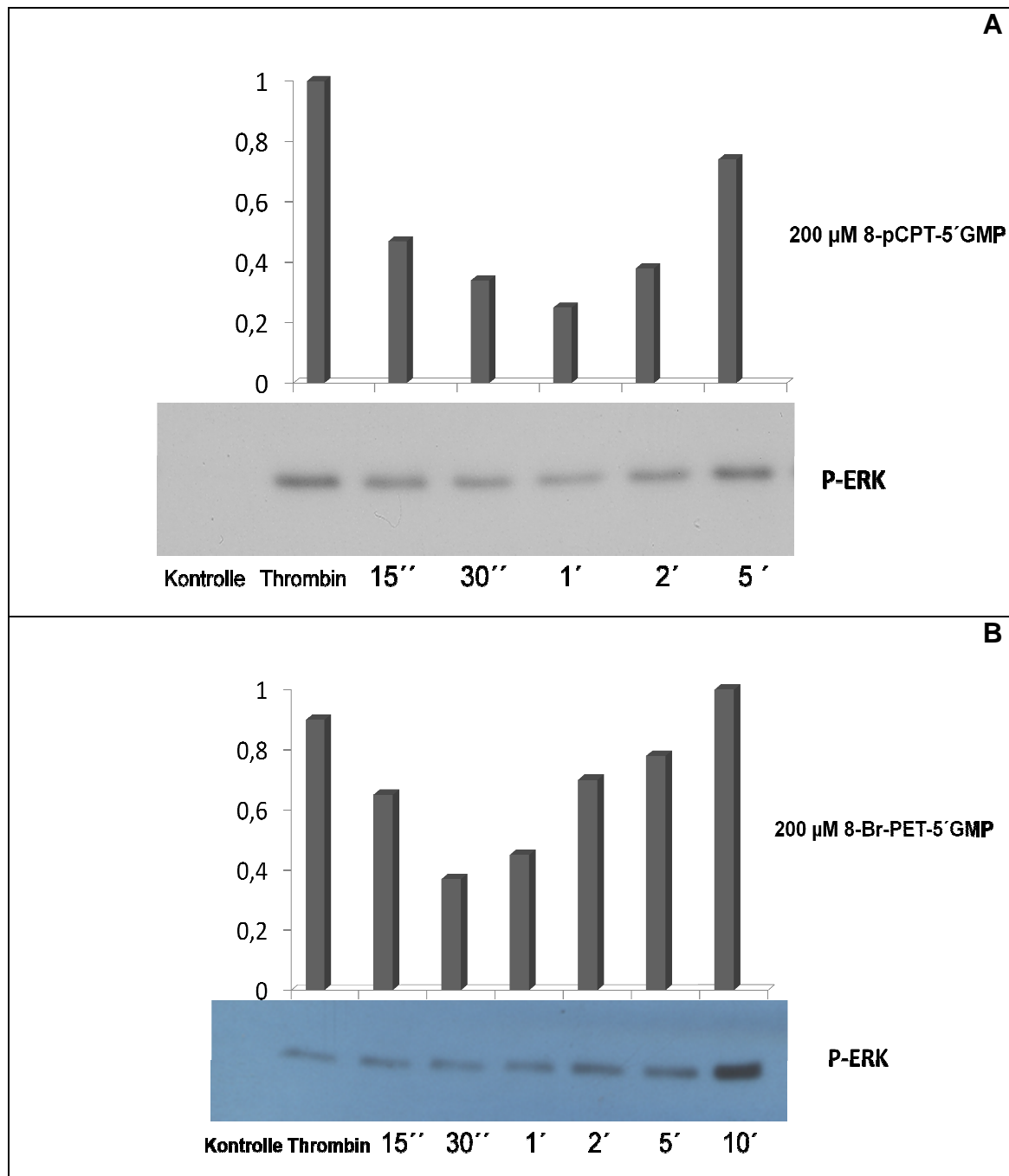


Abbildung 10: Zeitabhängige Inhibition der Thrombin-induzierten Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-5'GMP 200μM / 8-Br-PET-5'GMP 200μM in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten (3×10^8 /ml) wurden mit 8-pCPT-5'GMP (A) oder 8-Br-Pet-5'GMP (B) für die angegebenen Zeiten (15 Sek-10 min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit Thrombin (0,005 U/ml) oder TRAP6 (20 μM). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von pERK-Phosphorylierung (Western-Blot) beobachtet. Man beachte die signifikante Inhibition der Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-5'GMP und 8-Br-PET-5'GMP bereits nach 15 Sek (Abbildung 10:A + B).

3.2.4. Kein hemmender Effekt von 8-pCPT-Guanosin auf die Thrombozytenaktivierung

Die Ergebnisse der zuletzt gezeigten Versuchsreihen mit 5'-Monophosphat-Derivaten verdeutlichen, dass der hemmende Effekt auf die Thrombozytenaktivierung unabhängig von der Ringstruktur der Derivate ist. Deshalb galt es im weiteren zu eruieren, inwieweit man die ursprüngliche Struktur der Zyklonukleotide „abbauen“ kann, ohne den hemmenden Effekt auf die Plättchenaktivierung zu verlieren. Daher wurden in den nächsten Experimenten die Derivate 8-pCPT-Guanosin (siehe Abbildung 11) und 8-Br-Guanosin (nicht dargestellt) getestet, bei denen nicht nur die Ringstruktur aufgelöst war, sondern auch kein Monophosphat und damit keine negative Ladung mehr an die Nukleotidstruktur gebunden war (siehe Abbildung 12).

Beide Derivate zeigten weder einen hemmenden noch einen stimulierenden Effekt auf die Thrombozytenaktivierung. In mehreren Versuchen ließen sich jeweils nur Western-Blot-Ergebnisse produzieren, die jenem in Abbildung 11 entsprechen.

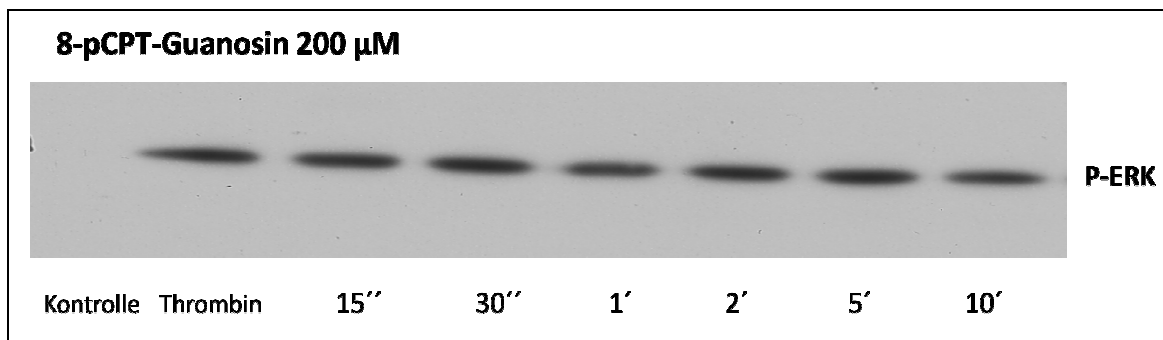


Abbildung 11: Keine Inhibition der Thrombin-induzierten-Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-Guanosin 200µM in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten ($3 \times 10^8/\text{ml}$) wurden mit 8-pCPT-Guanosin für die angegebenen Zeiten (15 Sek-10 min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit Thrombin (0,005 U/ml). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von pERK-Phosphorylierung (Western-Blot) beobachtet. Es ist kein inhibierender Effekt auf die Thrombozytenaktivierung zu erkennen.

Diese Erkenntnisse führten uns schließlich zu der These, dass der hemmende Effekt von Zyklonukleotiden und nicht-zyklischen Monophosphaten sehr wahrscheinlich von der negativen Phosphatgruppe abhängig ist (siehe Abbildung 12).

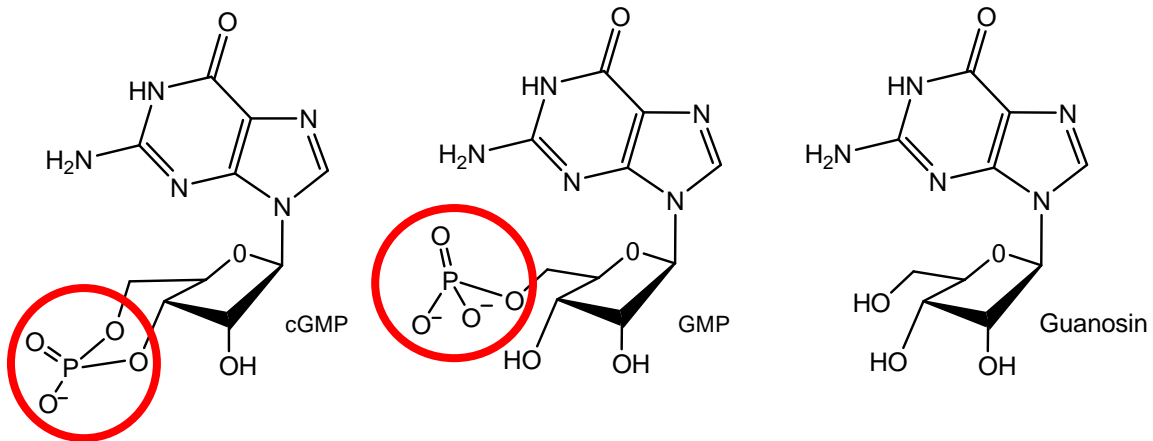


Abbildung 12: Strukturformeln von cGMP, GMP und Guanosin

Da die Western-Blot-Ergebnisse in zahlreichen Versuchen eindeutig einen inhibitorischen Effekt der Derivate auf die Thrombozytenaktivierung belegten, ging es in den folgenden Experimenten darum, weitere Signalwege der Plättchenaktivierung genauer zu betrachten und die Frage zu klären, ob neben der Phosphorylierung von pERK noch weitere intrazelluläre Signalkaskaden der Thrombin/TRAP6 induzierten Plättchenaktivierung durch zyklische und nicht-zyklische Derivate beeinflusst werden.

3.3. Ergebnisse der P-Selektin Expression durch FACS-Analyse

Als weiterer Anhaltspunkt für die Aktivierung von Thrombozyten diene die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche, welche direkt mit der Plättchenaktivierung korreliert. Für die FACS-Analyse wurden die Plättchen analog den Western-Blot-Experimenten präpariert (siehe 3.1.) und anschließend im FACS gemessen, um die Expression des Oberflächenmarkers P-Selektin zu beurteilen (siehe 2.2.6.).

3.3.1. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-cGMP

Die Präinkubation mit dem etablierten PKG-Aktivator 8-pCPT-cGMP inhibierte die Thrombin-induzierte P-Selektin-Expression/pERK-Phosphorylierung bereits nach 1 Min (siehe Abbildung 13). Wiederrum zeigte sich, analog zu den Ergebnissen aus Western Blot, dass zu keinem Zeitpunkt der Versuche mit 8-pCPT-cGMP ein aktivierender Effekt im Sinne einer Verstärkung der Stimulation von Thrombin auf die Thrombozyten produzierbar war.

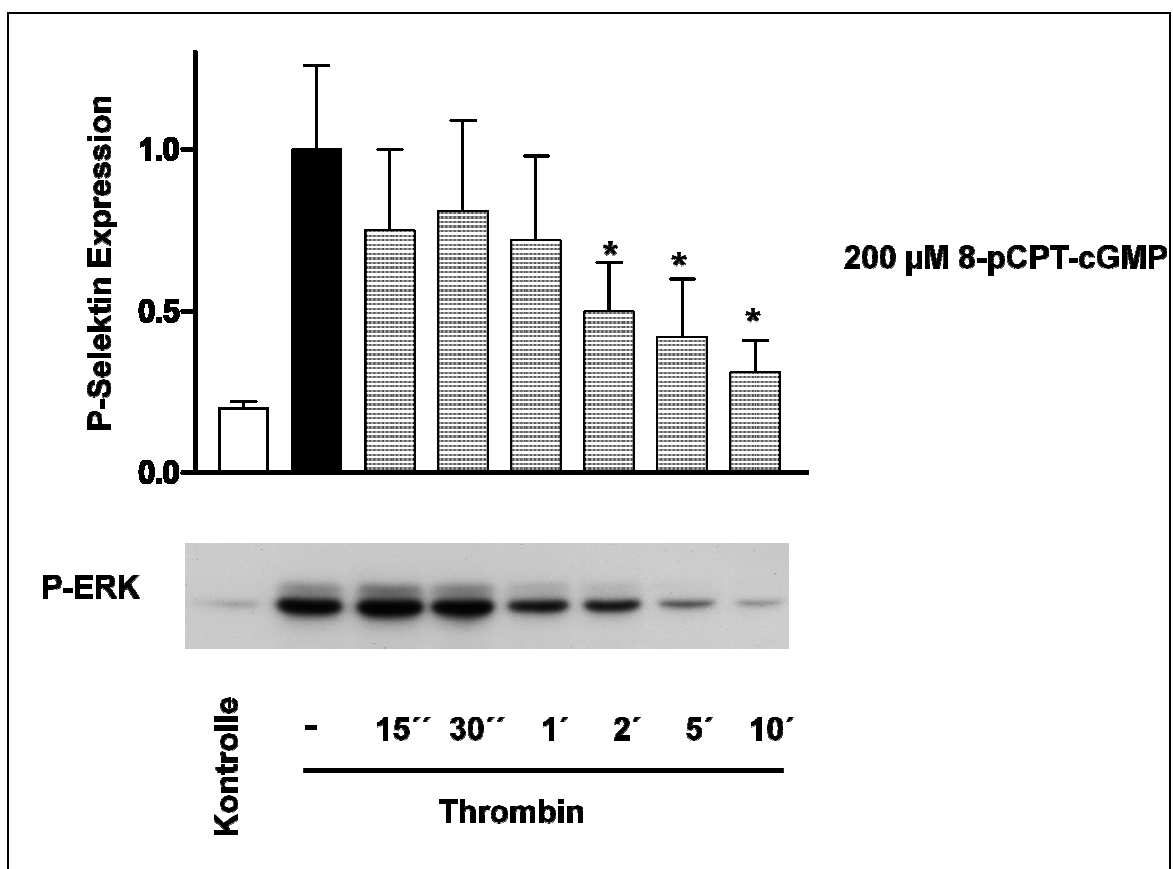


Abbildung 13: Zeitabhängige Inhibition der Thrombin-induzierten-Plättchenaktivierung durch den PKG-Aktivator 8-pCPT-cGMP in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten (3×10^8 /ml) wurden mit 8-pCPT-cGMP (200 μ M) für die angegebenen Zeiten (15 Sek - 10 Min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit Thrombin (0,005 U/ml). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von P-Selektin-Expression (FACS) und pERK-Phosphorylierung (Western-Blot) beobachtet. Man beachte die signifikante Inhibition der Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-cGMP schon zu einem frühen Zeitpunkt (15 Sek - 2 Min).

3.3.2. Plättchenhemmung durch 8-pCPT-5´GMP und 8-Br-PET-5´GMP

Die Präinkubation mit den nichtzyklischen Monophosphaten 8-pCPT-5´GMP und 8-Br-PET-5´GMP zeigte analog zu den Ergebnissen aus Western-Blot ebenfalls eine signifikante Inhibition der mittels Thrombin induzierten Plättchenaktivierung (siehe Abbildung 14). Die Tatsache, dass der hemmende Effekt wieder bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt (15 Sek) eintrat, erhärtete die Hypothese, dass es sich bei den inhibierenden Effekten der Derivate auf die durch Agonisten induzierte Plättchenaktivierung um **PKG- unabhängige** Mechanismen handeln könnte, da eine derart schnelle Wirkung der PKG-Hemmung nicht zu erwarten ist.

Weder mit 8-pCPT-5´GMP noch mit 8-Br-PET-5´GMP stellte sich zu irgendeinem Zeitpunkt der Versuche ein aktivierender Effekt im Sinne einer Verstärkung der Stimulation von Thrombin auf die Thrombozyten ein.

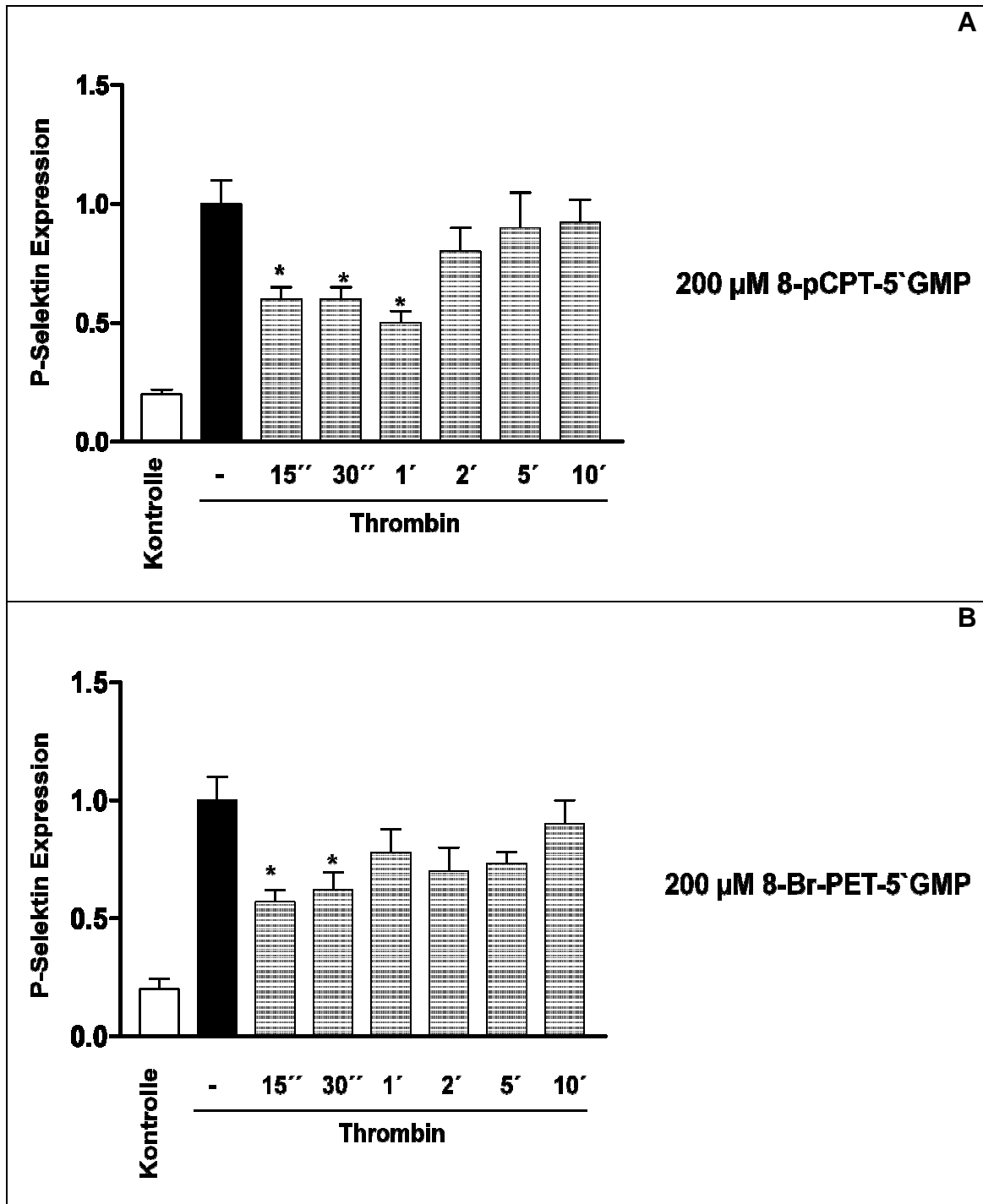


Abbildung 14: Zeitabhängige Inhibition der Thrombin-induzierten-Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-5'GMP und 8-Br-PET-5'GMP in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten ($3 \times 10^8/\text{ml}$) wurden mit 8-pCPT-5'GMP (200 µM) (A) und 8-Br-PET-5'GMP (200 µM) (B) für die angegebenen Zeiten (15 Sek - 10 Min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit Thrombin (0,005 U/ml). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von P-Selektin-Expression (FACS) beobachtet. Man beachte die signifikante Inhibition der Plättchenaktivierung sowohl durch 8-pCPT-5'GMP (A) als auch durch 8-Br-PET-5'GMP (B) bereits nach 15 Sek.

Aufgrund des frühen Zeitpunktes der Inhibition stellte sich die Frage, wie 8-pCPT-cGMP und ebenso die Monophosphate dazu im Stande sind, die (durch Agonisten induzierte) Plättchenaktivierung zu hemmen, unabhängig von ihrer Fähigkeit, die PKG zu stimulieren.

3.3.3. Kein hemmender Effekt von 8-Br-Guanosin auf die Plättchenaktivierung

Abschließend wurde ein Guanosin-Derivat (8-Br-Guanosin), also ein nichtzyklisches Derivat ohne Monophosphat, getestet. Identisch zu den Ergebnissen aus dem Western Blot zeigte sich auch in der FACS-Analyse in mehreren Versuchen mit 8-Br-Guanosin weder ein hemmender noch ein aktivierender Effekt auf die durch Thrombin induzierte Plättchenaktivierung (siehe Abbildung 15). Dies bestätigte den bereits geäußerten Verdacht, dass der hemmende Effekt der Derivate mit dem negativen Phosphatanteil der Zyklonukleotide und der nichtzyklischen Monophosphate korrelieren könnte.

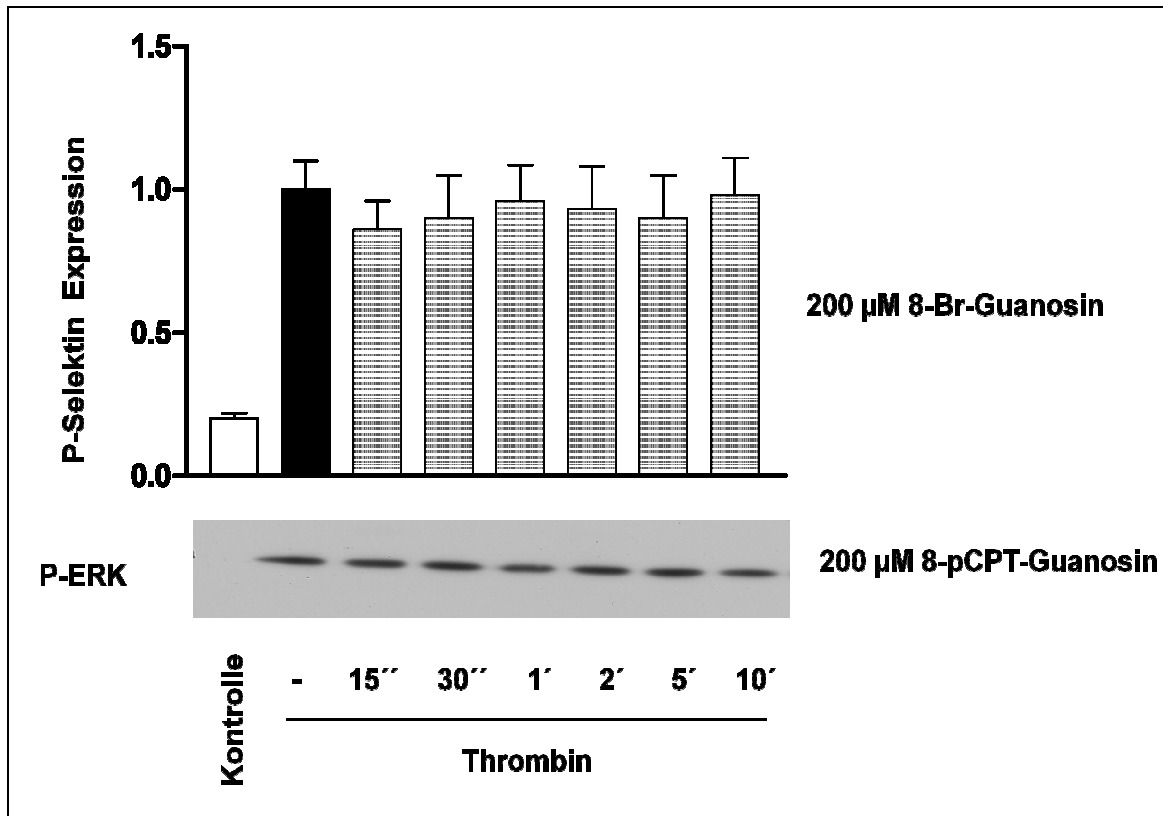


Abbildung 15: Kein inhibierender/aktivierender Effekt der Thrombin-induzierten-Plättchenaktivierung durch 8-Br-Guanosin/8-pCPT-Guanosin in humanen Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten (3×10^8 /ml) wurden mit 8-Br-Guanosin (200 μ M) und 8-pCPT-Guanosin (200 μ M) für die angegebenen Zeiten (15 Sek - 10 Min) präinkubiert, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation mit Thrombin (0,005 U/ml). Die Plättchenaktivierung wurde mittels der Analyse von P-Selektin-Expression (FACS) für 8-Br-Guanosin und ERK-Phosphorylierung (Western-Blot) für 8-pCPT-Guanosin überwacht. Zu keinem Zeitpunkt der Messung konnte ein Effekt durch ein Guanosin-Derivat auf die Plättchenaktivierung festgestellt werden.

3.4. Ergebnisse der intrazellulären Kalziummessungen in Thrombozyten

Als abschließender wichtiger Anhaltspunkt der Thrombozytenaktivierung befassten wir uns mit der Veränderung des intrazellulären Kalziumspiegels, welcher direkt mit der Aktivierung von Plättchen korreliert. Kalzium befindet sich physiologisch bereits in geringer Menge im Thrombozyten. Kommt es allerdings zur Aktivierung durch Agonisten (Thrombin, Thromboxan, vWF), so führt dies zu einem manifesten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Bei den Messwerten handelt es sich um Daten der vom Messgerät vorgegebenen Größenordnung von 0 bis 1000. Sie erlauben keine direkten Rückschlüsse auf die Absolutkonzentration an Kalzium in der Zelle,

ermöglichen aber die Feststellung von relativen Änderungen der intrazellulären Konzentration an Kalzium.

Äquivalent zu den Werten der vorangegangenen Versuche verdeutlichte sich auch in den Kalziummessungen die hemmende Wirkung der PKG-Aktivatoren/Inhibitoren. Im Gegensatz zu den Kontrollwerten zeigte sich mit 8-pCPT-cGMP und 8-pCPT-5'GMP ein signifikant reduzierter Kalziumanstieg im Zellinneren, was eindeutig auf eine Hemmung der Plättchenaktivierung zurückzuführen ist (siehe Abbildung 16). Mit dem Stereoisomer Rp-8-Br-PET-cGMPS konnte sogar eine komplette Inhibition des induzierten Kalzium-Influx erzielt werden (siehe Abbildung 17). Passend zu den Ergebnissen der bisherigen Experimente zeigte sich demgegenüber kein hemmender Effekt auf den Kalziumanstieg mit dem Guanosin-Derivat 8-Br-Go (siehe Abbildung 18).

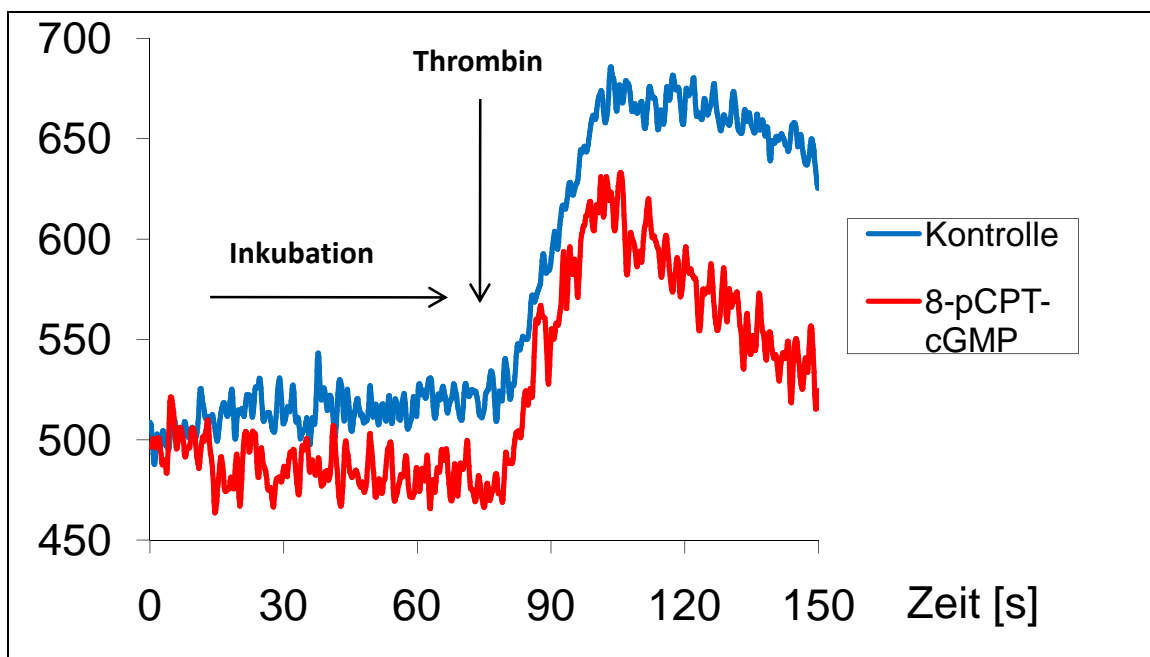


Abbildung 16: Inhibition der Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-cGMP in der Kalzium-Messung. Mit Fura-2-beladene, gewaschene humane Thrombozyten wurden in HEPES-Puffer resuspendiert und für 1 Minute mit einem Vehikel (Kontrolle) oder mit 8-pCPT-cGMP (200 μ M) präinkubiert. Danach wurden die Plättchen mit Thrombin (0,005 U/ml) für 1 Minute in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 und 10 mM MgCl_2 stimuliert. Anschließend wurde der zeitabhängige Fluoreszenzanstieg beobachtet. Man beachte den signifikanten Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration mit 8-pCPT-cGMP.

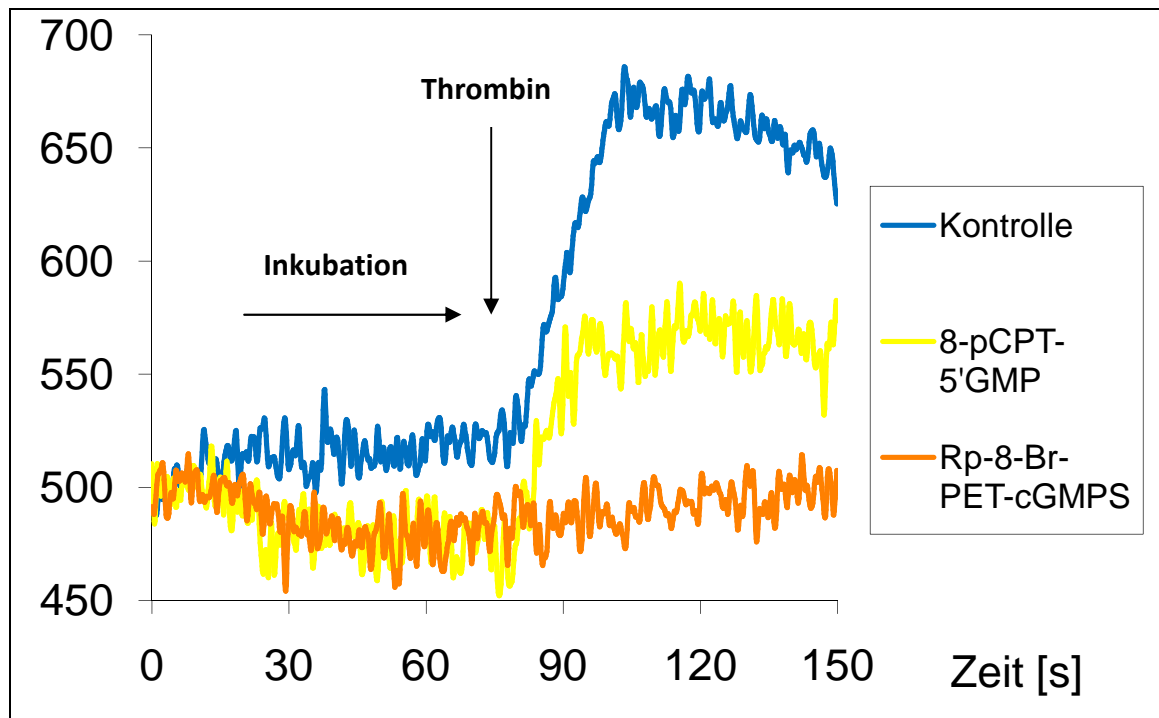


Abbildung 17: Inhibition der Plättchenaktivierung durch 8-pCPT-5GMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS in der Kalzium-Messung. Mit Fura-2-beladene, gewaschene humane Thrombozyten wurden in HEPES-Puffer resuspendiert und für 1 Minute mit einem Vehikel (Kontrolle), mit 8-pCPT-5GMP (200 μ M) oder mit Rp-8-Br-PET-cGMPS (200 μ M) präinkubiert. Danach wurden die Plättchen mit Thrombin (0,005 U/ml) für 1 Minute in der Gegenwart von 1 mM CaCl_2 und 10 mM MgCl_2 stimuliert. Anschließend wurde der zeitabhängige Fluoreszenzanstieg beobachtet. Man beachte den signifikanten Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration mit 8-pCPT-5GMP und den fehlenden Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Rp-8-Br-PET-cGMPS.

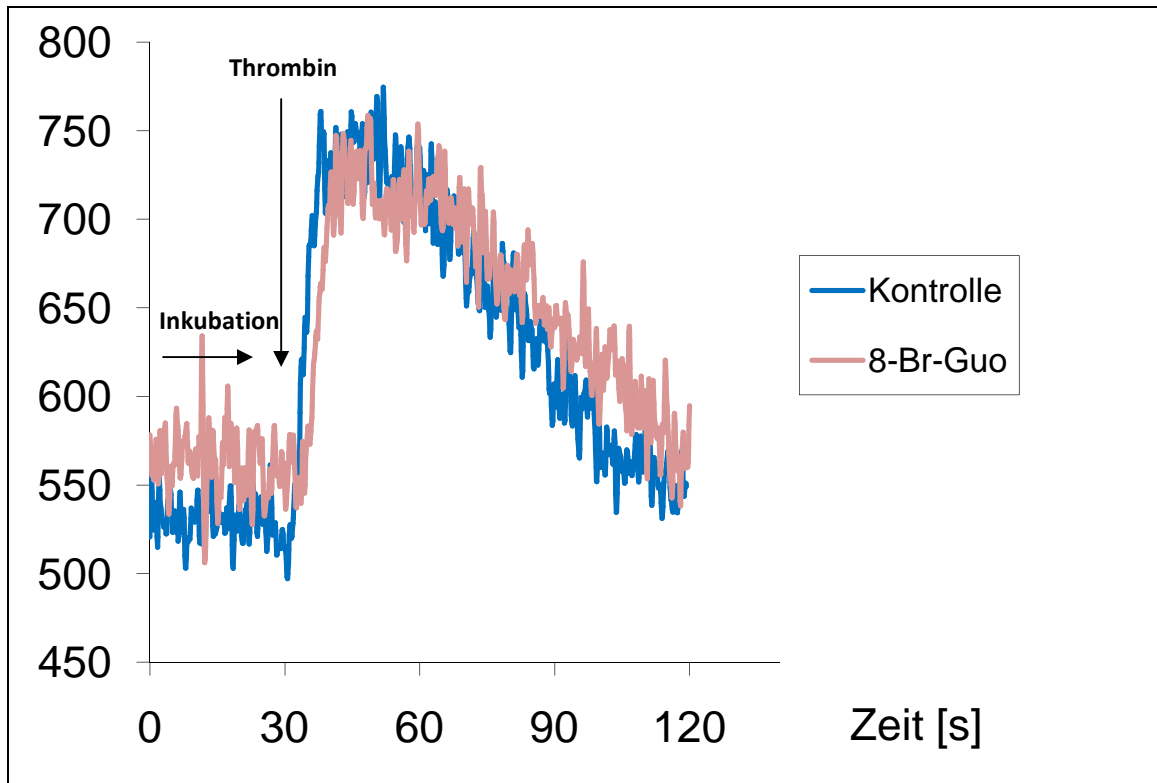


Abbildung 18: Keine Inhibition der Plättchenaktivierung durch 8-Br-Guanosin in der Kalzium-Messung. Mit Fura-2-beladene, gewaschene humane Thrombozyten wurden in HEPES-Puffer resuspendiert und für 1 Minute mit einem Vehikel (Kontrolle) oder mit 8-Br-Guanosin (200 μ M) präinkubiert. Danach wurden die Plättchen mit Thrombin (0,005 U/ml) für 1 Minute in der Gegenwart von 1 mM CaCl_2 und 10 mM MgCl_2 stimuliert. Anschließend wurde der zeitabhängige Fluoreszenzanstieg beobachtet. Man beachte, dass es zu keinem Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration mit 8-Br-Guanosin kommt.

3.5. Ergebnisse der Biacore-Messung

Nachdem sich der hemmende Effekt der Derivate auf die Thrombozytenaktivierung in verschiedenen Versuchsreihen reproduzieren ließ, stellte sich die Frage nach dessen Wirkmechanismus.

In den vorangegangenen Experimenten konnte der Effekt sowohl mit Thrombin als auch mit TRAP6 (dem Thrombinrezeptor aktivierenden Peptid) sehr gut reproduziert werden, deshalb galt es im folgenden Experiment, eine mögliche Interaktion der Derivate mit dem Thrombinrezeptors durch eine Biacore-Messung nachzuweisen.

Dazu wurde ein Peptid des Thrombinrezeptors mit der Sequenz NATLDPR-SFLLRNPND-KYEPFWEDEE-KNES zur Synthese in Auftrag gegeben, welches dem Thrombinrezeptor an der Oberfläche humaner Thrombozyten (PAR4) entspricht. Im Bereich der Spaltungsstelle LDPR-S bindet das aktive Zentrum von Thrombin an die extrazelluläre Domäne des Thrombinrezeptors. Zusätzlich erfolgt über die Anionenbindungsregion KYEPFWEDEE die Anlagerung von Thrombin an die Hirudin-ähnliche Domäne des Rezeptors (kursiv dargestellt). So wird nach der Bindung von Thrombin die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gespalten und der Rezeptor über den „tethered ligand“ aktiviert [1].

3.5.1. Bindung und Kontrolle des Rezeptorpeptids

Im ersten Schritt wurde dazu das Thrombinrezeptorpeptid mit der Sequenz NATLDPR-SFLLRNPND-KYEPFWEDEE-KNES von der Firma Biacore synthetisiert und erfolgreich über Streptavidin an den Biacore Sensorchip gebunden (siehe Abbildung 19).

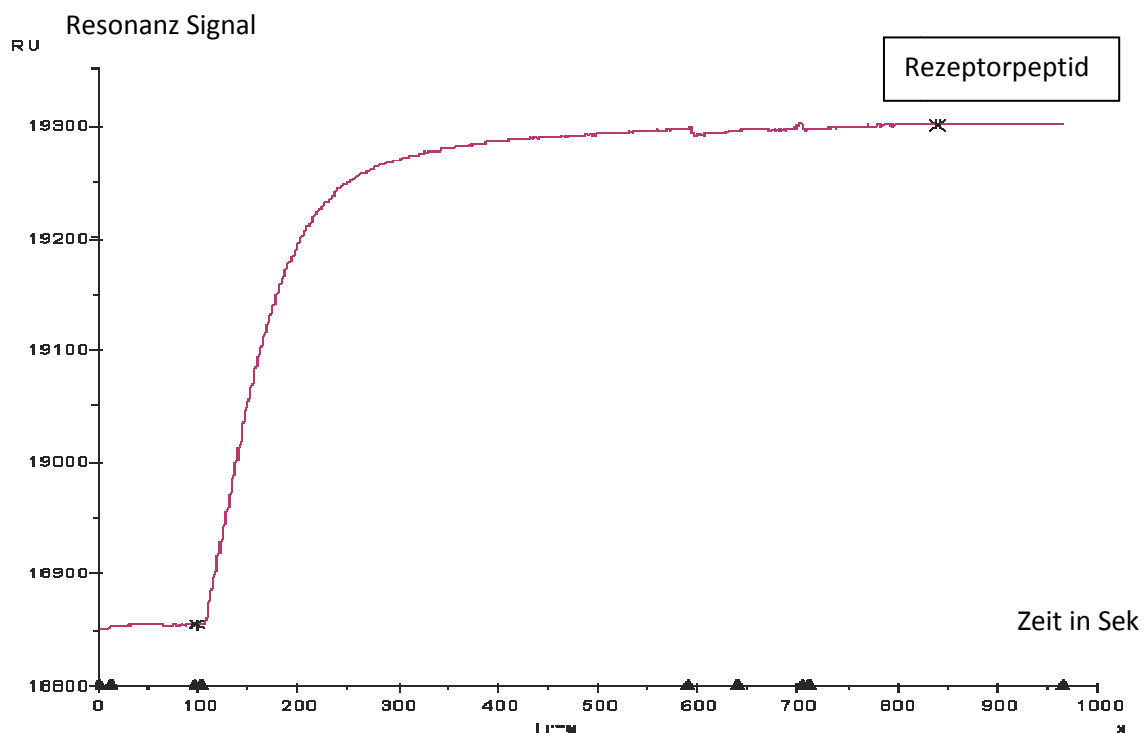


Abbildung 19: Das Rezeptorpeptid wird an das sich am Chip befindliche Streptavidin gebunden.

Anschließend wurde zunächst die Bindungsaffinität von Thrombin an das Rezeptorpeptid untersucht. Wie zu erwarten bindet Thrombin bei steigender Konzentration (5, 10, 20, 50, 200 μM) mit jeweils höherer Affinität an das Peptid (siehe Abbildung 20). Damit war sicher gestellt, dass das Rezeptorpeptid analog zu seinem Pendant auf der Thrombozytenoberfläche eine dosisabhängige Wechselwirkung mit Thrombin eingehen kann.

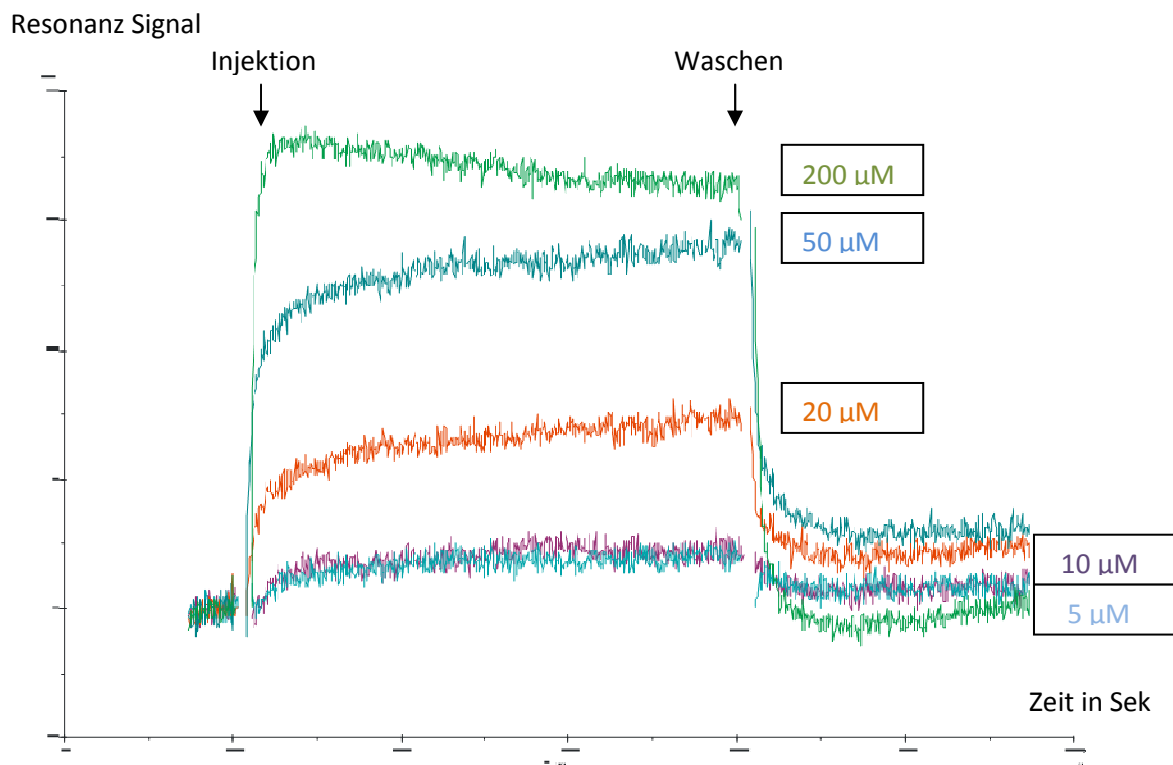


Abbildung 20: Thrombin bindet dosisabhängig (5, 10, 20, 50, 200 μM) an das biotinylierte Thrombinrezeptorpeptid. Mit steigender Thrombindosis erhöht sich die Bindungskomponente.

3.5.2. 8-Br-cGMP an Rezeptorpeptid

Mit dem Nachweis der Bindung von Thrombin an das Rezeptorpeptid konnte mit dem Experiment begonnen werden. Nach einem Spülvorgang wurde der PKG-Aktivator 8-Br-cGMP in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20, 50 und 200 μM) in das System gegeben und es stellte sich der Bindungsprozess an das Rezeptorpeptid wie folgt dar (siehe Abbildung 21). Wider Erwarten war die Bindungsaffinität von 8-Br-

cGMP an das Rezeptorpeptid bei der geringsten Konzentration von 5 μM am höchsten. In der Folge zeigte sich eine negative dosisabhängige Bindungskomponente für das zyklische Derivat.

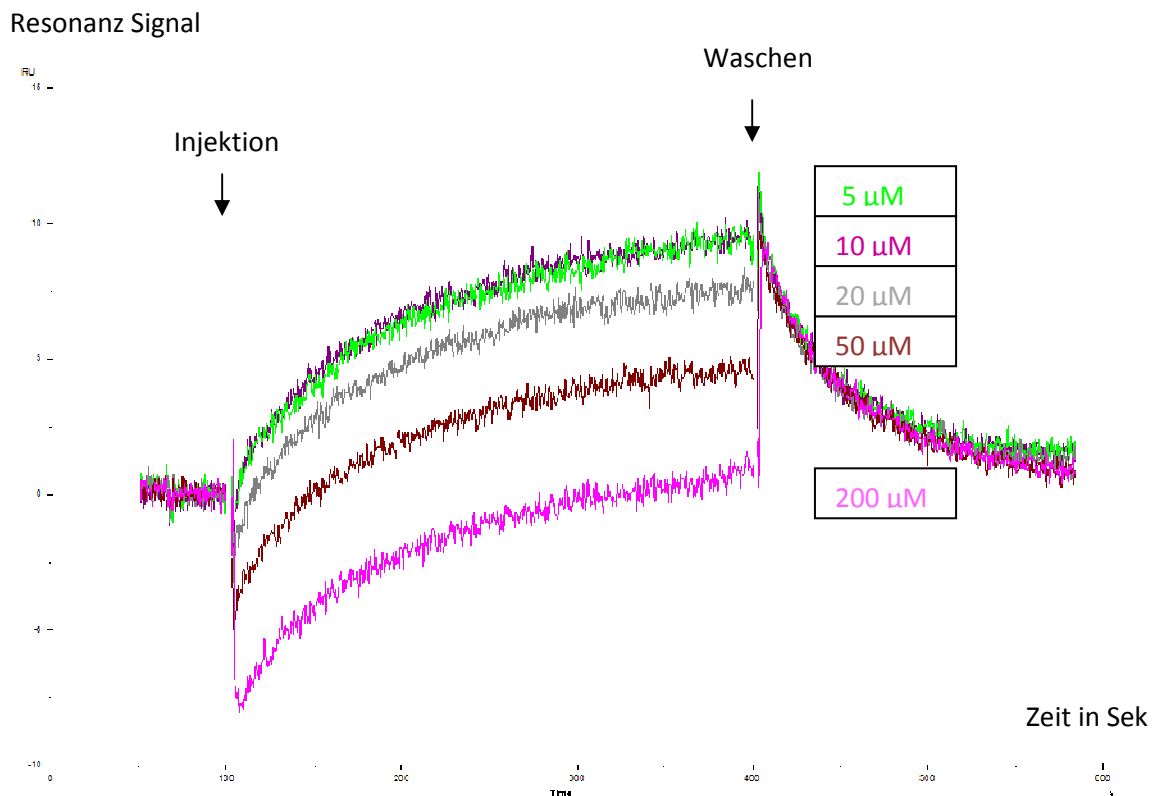


Abbildung 21: 8-Br-cGMP (5, 10, 20, 50, 200 μM) bindet negativ-dosisabhängig an das biotinylierte Thrombinrezeptorpeptid.

3.5.3. Rp-8pCPT-cGMP an Rezeptorpeptid

Neben einem PKG-Aktivator wurde zusätzlich ein Inhibitor der PKG, Rp-8-cCPT-cGMPs, in verschiedenen Konzentrationen (10, 20, 50, 100 und 200 μM) getestet. Auch dieser zeigte keine konstante Bindungsaffinität an das Rezeptorpeptid (siehe Abbildung 22). Für die verschiedenen Konzentrationen stellte sich eine vollkommen

dosisunabhängige Bindungskonstante dar, welche keinen Zusammenhang zwischen Derivat-Konzentration und Affinität für Bindung an den Rezeptor erkennen ließ.

Hiermit kann der Thrombinrezeptor als Wirkort für die GMP-Derivate auf der Plättchenoberfläche ausgeschlossen werden.

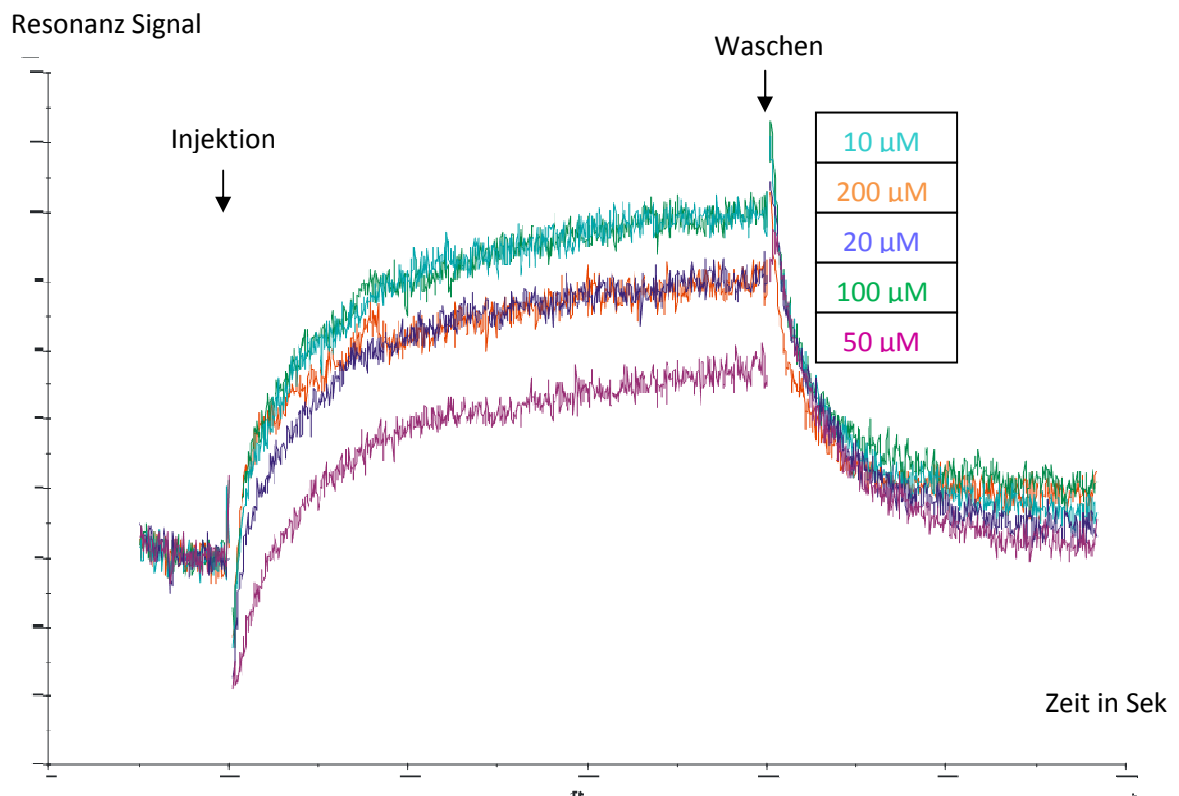


Abbildung 22: Rp-8-pCPT-cGMP (10, 20, 50, 100, 200 µM) bindet vollkommen dosisunabhängig an das biotinylierte Thrombinrezeptorpeptid.

4. Diskussion

Hämostase mit dem Zusammenspiel zwischen Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatischen Gerinnungsfaktoren spielt im menschlichen Kreislaufsystem eine zentrale Rolle. Die Aktivierung von Thrombozyten ist eine kausale Komponente von arteriosklerotischen und thrombotischen Erkrankungen und trägt wesentlich zum Verlauf kardiovaskulärer Krankheiten mit Komplikationen bei. Bereits seit vielen Jahren versucht man, die Signalwege und Vorgänge in Blutplättchen zu verstehen und nachzuvollziehen, um möglichst nebenwirkungsarm in die verschiedenen Aktivierungsmechanismen von Thrombozyten eingreifen zu können. Der Aktivierungsprozess involviert sowohl Oberflächenrezeptoren als auch intrazelluläre Signalkaskaden. Es ist weithin bekannt, dass Zyklonukleotide wie zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) einen gewichtigen Part in der Thrombozytenhemmung einnehmen [29]. Natürliche Antagonisten der Thrombozytenaktivierung wie Stickstoffmonoxid und Prostazyklin führen im Blutplättchen zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG), die wiederum über eine Erhöhung von cGMP und cAMP zur Phosphorylierung von Enzymen führt, welche die Plättchenaktivierung einschränken [46-49].

Umso erstaunlicher war es, dass eine Forscher-Gruppe aus Chicago Ergebnisse veröffentlichte, wonach cGMP zu einer initialen PKG-abhängigen Aktivierung von ERK (*Extracellular-signal Related Kinase*) führen soll, welche mit der Aggregation und Aktivierung von Plättchen assoziiert ist. Erst verspätet komme es zu einer PKG-abhängigen Phosphorylierung von VASP (*Vasodilator stimulated phosphoprotein*), was zu einer Plättchenhemmung führt [50-51].

Ziel dieser Arbeit war es, diesen beschriebenen hemmenden Effekt mit verschiedenen zyklischen und nicht-zyklischen GMP-Analoga nachzuweisen und einen möglichen stimulierenden Effekt von Nukleotiden auf die Thrombozytenaktivierung zu widerlegen.

In einer Reihe von Experimenten untersuchten wir anfangs den Einfluss von GMP-Nukleotid-Analoga auf die durch Thrombin oder TRAP6 (*Thrombin-Receptor-Activating-Peptide-6*) stimulierte Thrombozytenaktivierung. Wie in den ersten Ergebnissen bereits dargestellt, wird sowohl die Phosphorylierung von ERK als auch die Expression von P-Selektin an der Thrombozytenoberfläche (als 2 anerkannte Marker der Plättchenaktivierung) durch zyklische (8-pCPT-cGMP, 8-Br-cGMP) und nicht-zyklische GMP-Analoga (8-pCPT-5'GMP, 8-Br-PET-5'GMP) gehemmt. Dieser Effekt stellt sich bereits nach wenigen Sekunden bis Minuten dar, was uns zu der Hypothese führte, dass es sich um PKG-unabhängige Effekte handeln könnte. Erhärtet wurde dieser Verdacht durch die Tatsache, dass auch mit den Stereoisomeren Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-PET-cGMPS, welche eigentlich die PKG hemmen, keine Stimulation, sondern ebenfalls eine Inhibition der Plättchenaktivierung erfolgte. Zusätzlich konnte auch in Kalziummessungen mit 8-pCPT-cGMP, 8-pCPT-5'-GMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS eindeutig ein hemmender Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration beobachtet werden.

Es zeigte sich somit in allen Versuchsreihen, dass sowohl mit zyklischen als auch mit nicht-zyklischen GMP-Derivaten ein hemmender Effekt auf die Thrombozytenaktivierung ausgelöst wird. Diese Wirkung scheint von der negativen Phosphatkette am Guanosin abhängig zu sein, da mit Guanosin-Derivaten allein keine Inhibition der Plättchenaktivierung mehr erzielt werden kann. In keinem unserer Versuche ließ sich eine vermehrte Aktivierung der Thrombozyten durch GMP- oder Guanosin-Analoga feststellen, was damit eindeutig gegen die These der frühen Stimulation von Plättchen durch Zyklonukleotide spricht.

Die sehr schnell einsetzende hemmende Reaktion (innerhalb von 30 Sek bis 1 Min) auf die Thrombozytenaktivierung lässt vermuten, dass GMP-Derivate mit einem Oberflächenrezeptor auf den Thrombozyten interagieren. Frühere Versuche in unserem Labor hatten gezeigt, dass Zyklonukleotide mindestens 1-2 Minuten (bis maximal 20 Min) benötigen, um ihre volle Wirkung intrazellulär

zu entfalten, was einen intrazellulären Effekt aufgrund ihrer Zellmembranpermeabilität sehr unwahrscheinlich macht.

Da wir unsere Messungen sowohl mit Thrombin als auch mit TRAP6 (Thrombin-aktivierendes Peptid 6) als Plättchenaktivatoren durchführten, lag unser Hauptaugenmerk auf dem Thrombinrezeptor. Dieser besitzt eine Anionenbindungsstelle, welche gut mit der negativ-geladenen Phosphatgruppe der GMP-Analoga hätte interagieren können. In Biacore-Messungen jedoch, welche direkte Wechselwirkungen zwischen 2 Biomolekülen nachweisen können, stellte sich heraus, dass es keine effektive Wirkung von Nukleotiden auf den Thrombinrezeptor gibt. Es erfolgt zwar eine Bindung, diese findet aber zum Teil negativ-dosisabhängig oder vollkommen dosisunabhängig statt, was keine Rückschlüsse auf etwaige hemmende Einflüsse zulässt.

Als weiteres Zielorgan für Zyklonukleotide auf der Thrombozytenoberfläche kommen purinerge Rezeptoren in Betracht, welche durch ADP (Adenosindiphosphat) aktiviert werden. Diese scheinen jedoch von Diphosphaten abhängig zu sein, da sie mit AMP alleine keine Bindungskomponenten eingehen können. AMP-Derivate führen zu keiner Beeinflussung oder strukturellen Veränderung des ADP-Rezeptors [67]. Damit kann auch die Interaktion von GMP-Derivaten mit purinergen Rezeptoren sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre, dass Zyklonukleotide Ionenkanäle an der Thrombozytenoberfläche aktivieren. Ein Paper von *Stephane Renauld et al.* aus dem Jahre 2008 [68] zeigt, dass cpt-cAMP (ein cAMP-Analogon) in der Lage ist, den epithelialen Natriumkanal ENaC (*epithelial sodium channel*) in der Niere über die Stimulation eines extrazellulären Liganden zu aktivieren. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, jedoch konnte eine Beteiligung intrazellulärer Signalwege wie z.B. der Proteinkinase A ausgeschlossen werden. Ein ähnlicher Aktivierungsprozess thrombozytärer Ionenkanäle durch Zyklonukleotide ist daher nicht auszuschließen.

Wesentlich wahrscheinlicher ist allerdings, dass GMP-Analoga eine Interaktion mit dem thrombozytären Thromboxanrezeptor eingehen. Wie erst nach Abschluss der experimentellen Arbeiten kürzlich veröffentlicht, besitzen cAMP-Derivate die Fähigkeit, als direkte Antagonisten am Thromboxanrezeptor zu fungieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Epac- (*Exchange protein directly activated by cAMP*) Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP als auch der PKA-Inhibitor Rp-8-pCPT-cAMPS die Aggregation von humanen Thrombozyten, welche mit dem Thromboxanagonist U46619 zuvor stimuliert worden sind, eindeutig vermindern [69]. Dies konnte auch mit 8-pCPT-cAMP und 8-CPT-Adenosin erzielt werden, einzig 8-Bromo-2'-O-Me-cAMP hatte keinen hemmenden Effekt. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP konnte sogar zusätzlich die Thrombozytenaktivierung mit ADP, Thrombin und TRAP6 hemmen. Versuche mit einem nicht-zyklischen 5'-Derivat sind bis dato nicht veröffentlicht, allerdings ist wahrscheinlich ein ähnlicher Effekt wie bei nicht-zyklischen GMP-Derivaten zu erwarten. Die Tatsache, dass AMP-Derivate die Plättchenaggregation suffizient hemmen, egal ob Plättchen mit Thromboxanagonisten, ADP, Thrombin oder TRAP6 stimuliert werden, führt uns zu der Hypothese, dass auch GMP-Derivate mit dem Thromboxanrezeptor interagieren könnten.

Nachdem der Thrombinrezeptor als Wirkort der GMP-Analoga ausgeschlossen werden konnte, gilt es im Folgenden nun, sowohl die purinergen Rezeptoren als auch den Thromboxanrezeptor genau auf etwaige Wechselwirkungen mit GMP-Derivaten hin zu untersuchen. Zusätzlich sollten auch mögliche Interaktionen mit Ionenkanälen weiterhin in Betracht gezogen werden, da auch diese als mögliche Zielkomponenten für GMP-Analoga nicht ausgeschlossen werden können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die inhibierende Wirkung von extrazellulär zugefügten GMP-Derivaten auf die Thrombozytenaktivierung nachzuweisen. Anhand verschiedener thrombozytärer Aktivierungsmarker wie ERK, der Expression von P-Selektin und intrazellulärem Kalziumeinstrom zeigte sich eine signifikante Inhibition der Thrombozytenaktivierung durch zyklische GMP-Analoga. Neu ist, dass auch nicht-zyklische GMP-Derivate eindeutig einen hemmenden Effekt aufweisen. Guanosin-Derivate alleine führen dagegen weder zu einer Hemmung noch zu einer vermehrten Stimulation der Plättchenaktivierung. Die Wirkung der GMP-Analoga scheint von der negativen Phosphatgruppe abhängig zu sein. Der frühe Zeitpunkt der Inhibition und die Tatsache, dass auch Hemmer der PKG einen inhibierenden Effekt auf die Thrombozytenaktivierung aufweisen, führen zu der Hypothese, dass es sich um PGK-unabhängige Effekte handelt. Der Thrombinrezeptor als Wirkort der GMP-Analoga konnte in Biacore-Messungen ausgeschlossen werden. Es gilt nun, speziell den Thromboxanrezeptor auf mögliche Interaktionen mit GMP-Derivaten hin zu untersuchen.

6. Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase (Adenylyl-Zyklase)
ACD	Acid-Citrate-Dextrose (Zitronensäure, Natriumcitrat, D-Glukose)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium(II)Ion (zweiwertiges Kalzium)
cAMP	cyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cGMP	cyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
DAG	1,2-Diazylglyzerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemielumineszenz
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutamat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositoltriphosphat
Lys	Lysin
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Min	Minute
NO	Nitric-oxide (Stickstoffmonoxid)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor

PBS	Phosphate- Buffer-Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDE	Phosphodiesterase
PG-I ₂	Prostaglandin-I ₂
Phe	Phenylalanin
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
Pro	Prolin
PRP	Platelet-rich plasma (Thrombozytenreiches Plasma)
SDS	Sodium-dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek	Sekunde
Ser	Serin
TBS	Tris-buffered Saline (Tris-gepufferte Salzmischung)
TRAP6	Thrombin-aktivierendes Peptid 6
Try	Tryptophan
TxA ₂	Thromboxan-A ₂
Tyr	Tyrosin
VASP	Vasodilatator-stimulated phosphoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor

7. Literaturverzeichnis

1. Gawaz, M., *Das Blutplättchen*. 1999: Georg Thieme Verlag.
2. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1227-34.
3. Bhatt, D.L. and E.J. Topol, *Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(1): p. 15-28.
4. Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri, *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. *Cell*, 1998. 94(5): p. 657-66.
5. Shattil, S.J., M.H. Ginsberg, and J.S. Brugge, *Adhesive signaling in platelets*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. 6(5): p. 695-704.
6. Shattil, S.J., H. Kashiwagi, and N. Pampori, *Integrin signaling: the platelet paradigm*. *Blood*, 1998. 91(8): p. 2645-57.
7. Andrews, R.K., J.A. Lopez, and M.C. Berndt, *Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. 29(1): p. 91-105.
8. Brass, L.F., et al., *Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation*. *Adv Exp Med Biol*, 1993. 344: p. 17-36.
9. Brass, L.F., J.A. Hoxie, and D.R. Manning, *Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation*. *Thromb Haemost*, 1993. 70(1): p. 217-23.
10. Offermanns, S., *The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation*. *Biol Chem*, 2000. 381(5-6): p. 389-96.
11. Brass, L.F., et al., *Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond*. *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 581-9.
12. Rink, T.J. and S.O. Sage, *Calcium signaling in human platelets*. *Annu Rev Physiol*, 1990. 52: p. 431-49.
13. Daniel, J.L., et al., *Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response*. *J Biol Chem*, 1984. 259(15): p. 9826-31.
14. Nachmias, V.T., J. Kavalier, and S. Jacobowitz, *Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton*. *Nature*, 1985. 313(5997): p. 70-2.
15. Klages, B., et al., *Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets*. *J Cell Biol*, 1999. 144(4): p. 745-54.
16. Elzagallaai, A., S.D. Rose, and J.M. Trifaro, *Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS: a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation*. *Blood*, 2000. 95(3): p. 894-902.
17. Rotondo, S., et al., *Different requirement of intracellular calcium and protein kinase C for arachidonic acid release and serotonin secretion in cathepsin G-activated platelets*. *Thromb Haemost*, 1997. 78(2): p. 919-25.
18. Sloan, D.C. and R.J. Haslam, *Protein kinase C-dependent and Ca²⁺-dependent mechanisms of secretion from streptolysin O-permeabilized platelets: effects of leakage of cytosolic proteins*. *Biochem J*, 1997. 328 (Pt 1): p. 13-21.
19. Daniel, J.L., et al., *Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets*. *J Biol Chem*, 1998. 273(4): p. 2024-9.
20. Zhang, J., et al., *Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or beta-phorbol*

- myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of alphaIIb beta3 integrin.* J Biol Chem, 1996. 271(11): p. 6265-72.
21. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors.* Circ Res, 2006. 99(12): p. 1293-304.
 22. Schwarz, U.R., U. Walter, and M. Eigenthaler, *Taming platelets with cyclic nucleotides.* Biochem Pharmacol, 2001. 62(9): p. 1153-61.
 23. Woulfe, D., J. Yang, and L. Brass, *ADP and platelets: the end of the beginning.* J Clin Invest, 2001. 107(12): p. 1503-5.
 24. Lohmann, S.M., et al., *Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases.* Trends Biochem Sci, 1997. 22(8): p. 307-12.
 25. Geiger, J., et al., *Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(3): p. 1031-5.
 26. Geiger, J., C. Nolte, and U. Walter, *Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors.* Am J Physiol, 1994. 267(1 Pt 1): p. C236-44.
 27. Horstrup, K., et al., *Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition.* Eur J Biochem, 1994. 225(1): p. 21-7.
 28. Soderling, S.H. and J.A. Beavo, *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions.* Curr Opin Cell Biol, 2000. 12(2): p. 174-9.
 29. Haslam, R.J., N.T. Dickinson, and E.K. Jang, *Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets.* Thromb Haemost, 1999. 82(2): p. 412-23.
 30. Nolte, C., et al., *Synergistic phosphorylation of the focal adhesion-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating platelet inhibitors.* Biochem Pharmacol, 1994. 48(8): p. 1569-75.
 31. Nicholson, C.D., R.A. Challiss, and M. Shahid, *Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes.* Trends Pharmacol Sci, 1991. 12(1): p. 19-27.
 32. Cole, B., G.A. Robison, and R.C. Hartmann, *The role of cyclic AMP in platelet function.* Ann N Y Acad Sci, 1971. 185: p. 477-87.
 33. Kobilka, B.K., et al., *Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor.* Science, 1987. 238(4827): p. 650-6.
 34. Manganello, J.M., et al., *Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A(2) receptor-associated Galpha(13).* J Biol Chem, 1999. 274(39): p. 28003-10.
 35. Cavallini, L., et al., *Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation.* J Biol Chem, 1996. 271(10): p. 5545-51.
 36. Chen, M. and A. Stracher, *In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain.* J Biol Chem, 1989. 264(24): p. 14282-9.
 37. Hettasch, J.M. and J.R. Sellers, *Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C.* J Biol Chem, 1991. 266(18): p. 11876-81.
 38. Butt, E., et al., *cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets.* J Biol Chem, 1994. 269(20): p. 14509-17.

39. Hauser, W., et al., *Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(14): p. 8120-5.
40. Macphee, C.H., et al., *Phosphorylation results in activation of a cAMP phosphodiesterase in human platelets*. J Biol Chem, 1988. 263(21): p. 10353-8.
41. Turko, I.V., S.H. Francis, and J.D. Corbin, *Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation*. Biochem J, 1998. 329 (Pt 3): p. 505-10.
42. Davey, M.G. and E.F. Luscher, *Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets*. Nature, 1967. 216(5118): p. 857-8.
43. Kahn, M.L., et al., *A dual thrombin receptor system for platelet activation*. Nature, 1998. 394(6694): p. 690-4.
44. Kahn, M.L., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. J Clin Invest, 1999. 103(6): p. 879-87.
45. Brass, L.F. and M. Molino, *Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells*. Thromb Haemost, 1997. 78(1): p. 234-41.
46. Eigenthaler, M., et al., *Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia*. J Biol Chem, 1993. 268(18): p. 13526-31.
47. Massberg, S., et al., *Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I*. J Exp Med, 1999. 189(8): p. 1255-64.
48. Smolenski, A., et al., *Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1998. 273(32): p. 20029-35.
49. Smolenski, A., et al., *Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I*. J Biol Chem, 2000. 275(33): p. 25723-32.
50. Li, Z., X. Xi, and X. Du, *A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIb beta3*. J Biol Chem, 2001. 276(45): p. 42226-32.
51. Li, Z., et al., *A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation*. Cell, 2003. 112(1): p. 77-86.
52. Li, Z., et al., *A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans*. Blood, 2003. 101(11): p. 4423-9.
53. Gambaryan, S., et al., *Potent inhibition of human platelets by cGMP analogs independent of cGMP-dependent protein kinase*. Blood, 2004. 103(7): p. 2593-600.
54. Papkoff, J., et al., *p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation*. Mol Cell Biol, 1994. 14(1): p. 463-72.
55. Saklatvala, J., et al., *Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue*. J Biol Chem, 1996. 271(12): p. 6586-9.
56. Bugaud, F., et al., *Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets*. Blood, 1999. 94(11): p. 3800-5.
57. Kramer, R.M., et al., *Differential activation of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in human platelets. Evidence for activation of cPLA2 independent of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2*. J Biol Chem, 1995. 270(24): p. 14816-23.

58. Sage, S.O., R. Reast, and T.J. Rink, *ADP evokes biphasic Ca²⁺ influx in fura-2-loaded human platelets. Evidence for Ca²⁺ entry regulated by the intracellular Ca²⁺ store.* Biochem J, 1990. 265(3): p. 675-80.
59. Schwarz, U.R., et al., *Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects.* Thromb Haemost, 1999. 82(3): p. 1145-52.
60. Alves, I.D., C.K. Park, and V.J. Hruby, *Plasmon resonance methods in GPCR signaling and other membrane events.* Curr Protein Pept Sci, 2005. 6(4): p. 293-312.
61. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Biosensing with surface plasmon resonance--how it all started.* Biosens Bioelectron, 1995. 10(8): p. i-ix.
62. Basics, B. 2005; Available from: www.biacore.com.
63. Van Obberghen-Schilling, E., et al., *Structure-activity analysis of synthetic alpha-thrombin-receptor-activating peptides.* Biochem J, 1993. 292 (Pt 3): p. 667-71.
64. Vassallo, R.R., Jr., et al., *Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides.* J Biol Chem, 1992. 267(9): p. 6081-5.
65. Scarborough, R.M., et al., *Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function.* J Biol Chem, 1992. 267(19): p. 13146-9.
66. Chao, B.H., et al., *Essential groups in synthetic agonist peptides for activation of the platelet thrombin receptor.* Biochemistry, 1992. 31(27): p. 6175-8.
67. Geiger, J., et al., *Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors.* Eur J Pharmacol, 1998. 351(2): p. 235-46.
68. Renauld, S., R. Allache, and C. Chraïbi, *Ile481 from the guinea pig alpha-subunit plays a major role in the activation of ENaC by cpt-cAMP.* Cell Physiol Biochem, 2008. 22(1-4): p. 101-8.
69. Sand, C., et al., *8-pCPT-conjugated cyclic AMP analogs exert thromboxane receptor antagonistic properties.* Thromb Haemost, 2010. 103(3): p. 662-78.

8. Danksagung

Als erstes gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer bedingungslos unterstützt haben.

Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Walter. Ihm danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut unter exzellenten Bedingungen forschen zu dürfen.

Frau Prof. Elke Butt-Dörje möchte ich für das Thema, die hervorragende Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit danken. Weit über das notwendige Maß hinaus stand sie mir jederzeit mit Anregungen und Hilfestellungen zur Seite.

Für die exzellente Einführung in die Laborarbeit und die Weitergabe großer Erfahrungswerte möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Stepan Gambaryan und bei Frau Dr. Natalia Rukoyatkina bedanken.

Herrn Dr. Jörg Geiger danke ich für die Betreuung meiner Kalziummessungen, für konstruktive Diskussionen und jederzeit neue Anregungen für meine Arbeit.

Frau Petra Thalheimer danke ich für unabdingbare Unterstützung meiner experimentellen Versuche im Labor.

Für eine ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre und ein kollegiales Arbeitsklima möchte ich mich zu guter letzt bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie bedanken. Ohne euch hätte die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht.

9. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Tobias Marius Fröhling
Anschrift: Friedrich-Ebert-Ring 19
97072 Würzburg
Geburtsdatum, -ort: 17.12.1982, Würzburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulausbildung

04/2003 – 04/2004 Studium der Mineralogie an der Universität zu Köln
04/2004 – 10/2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
10/2004 – 06/2010 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

seit 16.09.2010 Assistenzarzt, Neurologische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg

Promotion

02/2007 – 09/2010 *Untersuchungen zur Wirkungsweise von Zyklonukleotiden auf die Thrombozytenaktivierung*; Prof. Dr. U. Walter, Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg

Würzburg, 08. Dezember 2010

Tobias Marius Fröhling