

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

**Purpurogallin als Inhibitor der Thrombozytenaggregation:
Untersuchungen zur Signaltransduktion**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Rabea-Sophie Söffker

geboren am: 25. Juni 1984 in Braunschweig

Betreuer: Prof. Dr. med Peter Presek

Gutachter:

Prof. Dr. med. Peter Presek

Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld (Düsseldorf)

Prof. Dr. med. Malte Kornhuber

01.12.2015

25.10.2016

„Hätte man von Anbeginn der Zeiten immer nur das nützliche und heilsame nur deswegen unterlassen, weil es noch neu und nicht in Gebrauch war, weil es gerade erst erfunden wurde, so würden den Menschen viele Dinge fehlen, deren Nutzen niemals genug gepriesen werden kann.“

Dorothea Christiane Erxleben (1715-1762)

Referat

Durch die steigende Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen nimmt die Bedeutung der medikamentösen Thrombozytenaggregationshemmung stetig zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 79 Naturstoffe aus Pflanzen, Pilzen und Flechten hinsichtlich evtl. Einflüsse auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Es stellte sich heraus, dass nur einer dieser Naturstoffe, das Purpurogallin, eine signifikante Hemmung der Aggregation nach Stimulation mit Thrombin auslösen kann. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig (IC_{50} -Wert = 7 μ M)

Ebenso ist die Aggregationshemmung durch Purpurogallin abhängig von der Thrombinkonzentration. Die stärkste Hemmung der Aggregation auf 35 % wird mit einer Thrombinkonzentration von 0,05 U/ml erreicht.

Weiteres Interesse galt dem Permethylpurpurogallin, der methylierten Form des Purpurogallins. Es zeigte sich, dass keine der nachgewiesenen Wirkungen des Purpurogallins auf das Permethylpurpurogallin übertragen werden kann.

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Purpurogallin einen hemmenden Einfluß auf die Polo-Like-Kinase 1 hat. In Thrombozyten wurde diese mitoseassoziierte Kinase allerdings bislang nicht beschrieben, der erstmalige Nachweis der Polo-Like-Kinase 1 ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass die PLK-1 in Thrombozyten in phosphorylierter Form vorliegt.

Da ein Zusammenhang zwischen der PLK-1 und den MAPKinasen im Rahmen des Primings der PLK-1 beschrieben wird, haben wir auch untersucht, ob sich die Aktivität der MAPKinasen durch Purpurogallin hemmen lässt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Purpurogallin einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der MAPKinasen ERK und p38 in Thrombozyten hat. ERK kann durch Purpurogallin deutlich gehemmt werden (22 % Restaktivität), p38 jedoch nur gering (80 % Restaktivität).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Material	11
3.1.1	Chemikalien	11
3.2	Geräte und Materialien	14
3.3	Methoden.....	14
3.3.1	Präparation der Thrombozyten.....	14
3.3.2	Konzentrationsbestimmung der Thrombozyten	15
3.3.3	Allgemeine Messung der Thrombozytenaggregation	16
3.3.4	Aggregationsmessung von Thrombozyten unter Einfluss verschiedener Naturstoffe	16
3.3.5	Thrombozytenstimulation zur Analyse intrazellulärer Proteine	20
3.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
3.3.7	Immuno(Western)-Blot.....	21
3.3.8	Statistische Auswertung.....	23
4	Ergebnisse.....	24
4.1	Aggregation unter Einfluss von verschiedenen Naturstoffen	24
4.2	Effekte von Purpurogallin auf die Aggregation in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration	25
4.3	Die Thrombin-induzierte Aggregation in Abhängigkeit von der Purpurogallinkonzentration	27
4.4	Nachweis der Polo-Like-Kinase 1 in menschlichen Thrombozyten.....	31
4.5	Einfluss von Purpurogallin auf die Aktivität der MAPKinasen in humanen Thrombozyten.....	32
4.5.1	Einfluss von Purpurogallin auf die MAPKinase pp38 in humanen Thrombozyten	32
4.5.2	Einfluss des Purpurogallins auf die MAPKinase ERK in humanen Thrombozyten.....	34
4.6	Effekte verschiedener Agonisten und Antagonisten auf die Phosphorylierung der PLK-1	36
5	Diskussion	37
5.1	Untersuchungen von verschiedenen Naturstoffen auf eine antiaggregatorische Funktion.....	37
5.2	Einfluss der Purpurogallins auf die Thrombozytenaggregation.....	38
5.3	Einfluß der Thrombinkonzentration auf die Aggregationshemmung durch Purpurogallin.....	41
5.4	Nachweis der Polo-Like Kinase 1 in humanen Thrombozyten.....	42

5.5	Effekte des Purpurogallins auf die Aktivität von MAPKinasen	43
5.6	Phosphorylierung der Polo-Like Kinase 1 in humanen Thrombozyten.....	45
6	Zusammenfassung und Ausblick	48
7	Literaturverzeichnis	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von inaktiven (links) und aktivierten (rechts) Thrombozyten	2
Abbildung 2: Strukturformel Purpurogallin (PPG) und Permethylpurpurogallin (MPPG)	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PLK-1	6
Abbildung 4: Thrombin-induzierte Aggregation in An- und Abwesenheit von Purpurogallin	25
Abbildung 5: Effekte von Purpurogallin auf die Aggregation in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration.....	26
Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Effekte von Purpurogallin und Permethylpurpurogallin	29
Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Effekte von Purpurogallin auf die Anfangsgeschwindigkeit und das Maximum der Aggregation.....	30
Abbildung 8: Detektion der Polo-Like-Kinase 1 in menschlichen Thrombozyten.....	31
Abbildung 9: Aktivität der MAPKinase pp38 in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin.....	33
Abbildung 10: Aktivität der MAPKinase ERK (p42/44) in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin.....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung intrazelluläre Signalkaskaden in menschlichen Thrombozyten.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Getestete Naturstoffe.....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der Gelelektrophorese....	20
Tabelle 3: Signifikanztabelle zur Wirkung von DMSO und Purpurogallin auf die Thrombin-induzierte Aggregation.....	27
Tabelle 4: Signifikanztabelle zu den konzentrationsabhängigen Effekten von Purpurogallin und Permethylnpurpurogallin.....	29
Tabelle 5: Signifikanztabelle zur Wirkung von DMSO und Purpurogallin auf die Thrombin-induzierte Anfangsgeschwindigkeit und die Aggregation.....	30
Tabelle 6: Signifikanztabelle zur Aktivität der MAPKinase pp38 in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin	34
Tabelle 7: Signifikanztabelle zur Aktivität der MAPKinase ERK (p42/44) in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin.....	36

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-(trihydrogendiphosphat)
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspergin
BSA	Rinderserumalbumin
Cdc2	Cyclin-abhängige Kinase 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemiluminescence system, Western-Blot-Detektionssystem
HRP	horseradish-Peroxidase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MMP	Magermilchpulver
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PB	Polo-Box
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDB	Polo-Box-Domain
PLK-1	Polo-like-Kinase 1
PPG	Purpurogallin
SDS	Dodecylsulfate Natrium-Salz
SP	Suspensionspuffer
Spp.	species pluralis
Thr	Thrombin
vWF	Von-Willebrand-Faktor

Verwendete Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
A, mA	Ampher, Milliampher
E	Volt/Meter
kDa	Kilodalton
kg, g, mg, µg	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
min	Minute
pH	potentia Hydrogenii
rpm	revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U, mU	Units, Milliunits
V, mV	Volt, Millivolt
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

Nach Einschätzung der WHO werden jährlich ab dem Jahr 2030 etwa 23,6 Millionen Menschen an kardiovaskulären Komplikationen weltweit versterben. Umso wichtiger ist eine effektive primäre und sekundäre Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen (Silva et al., 2013). Zugelassene medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmer gibt es mittlerweile einige, welche mit unterschiedlichsten Rezeptoren interagieren und in verschiedene Stufen der Thrombozytenaggregation eingreifen. Jedoch sind diese Medikamente auch mit einer Vielzahl von unerwünschten Wirkungen wie schwerwiegenden Blutungen oder Nierenversagen vergesellschaftet, so dass immer nach neuen Möglichkeiten der Thrombozytenaggregationshemmung gesucht wird (Pilgrim und Windecker, 2015), welche sowohl eine zuverlässige Thrombozytenaggregationshemmung bieten, jedoch mit weniger unerwünschten Wirkungen vergesellschaftet sind.

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kleinste zelluläre Bestandteile des Blutes. Sie entstehen durch Abschnürungen aus Megakaryozyten, welche sich im menschlichen Knochenmark befinden. Diese kernlosen Thrombozyten haben eine mittlere Überlebenszeit von ungefähr sieben Tagen mit einer täglichen Erneuerungsrate von etwa 20 %. Unstimulierte Thrombozyten haben eine diskoide Form und einen Durchmesser von etwa 3 μm (Cimmino und Golino, 2013).

Thrombozyten üben neben ihrer klassischen Rolle bei der Hämostase eine Reihe weiterer Funktionen aus, die erst in jüngster Zeit entdeckt wurden. Sie sind teilweise mechanistisch noch nicht aufgeklärt und in ihrer Bedeutung noch nicht vollständig aufgeklärt.

Durch Gefäßwandverletzung kommt es zu einer Diskontinuität der Endothelbarriere und es werden verschiedene subendotheliale Strukturen wie Kollagen und der von-Willebrand-Faktor aus der Gefäßwand freigelegt. Die Thrombozyten verfügen an der Oberfläche über den Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex, der als vWF-Rezeptor fungiert und der mit einer sehr hohen Affinität an seinen Liganden bindet. Diese feste Bindung ist im Bereich des arteriellen Stromgebiets nötig, um den dort vorhandenen hohen Scherkräften Stand zu halten (Reininger et al., 2006). Rezeptoren der Integrinfamilie wie der $\alpha_2\beta_1$ Kollagenrezeptor-, die Fibronectin- und Lamininrezeptoren erhöhen die Stabilität der Thrombozytenadhäsionen an der Gefäßwand. Durch diese Vorgänge und besonders durch die Bindung an Kollagen durch den thrombozytären Kollagenrezeptor (Glykoprotein VI) wird auch die Formänderung der Thrombozyten, Shape change,

ausgelöst (Li et al., 2010). Die ruhenden diskoiden Thrombozyten nehmen eine sphärische Form mit Ausbildung von Pseudopodien an und vergrößern ihre Oberfläche dadurch erheblich, um eine möglichst effektive Abdeckung des Gefäßwanddefektes und eine Aggregation zu ermöglichen. Abbildung 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Abbildung sowohl ruhender als auch aktivierter Thrombozyten: Links die diskoidale Form, rechts die sphärische Form in einem Thrombozytenpfropf.



Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von inaktiven (links) und aktivierten (rechts) Thrombozyten (Gawaz, 2001)

Bei der Aktivierung wird aus Arachidonsäure Thromboxan A_2 frei gesetzt und dadurch der Aktivierungsvorgang weiter vorangebracht. Außerdem werden weitere Mediatoren wie ADP, Serotonin und Ca^{2+} aus dichten Granula freigesetzt, welche sowohl in autokriner, im Rahmen eines positiven Feedback-Mechanismus, als auch parakriner Weise wirken und sich selbst und weitere Thrombozyten aktivieren.

Der nächste Schritt bei der primären Hämostase ist die Bildung eines Thrombozytenpfropfs (Aggregation), wobei ein primärer und ein sekundärer Schritt unterschieden werden kann. Für diesen Vorgang sind zwei Bestandteile essentiell: Fibrinogen und Calcium. Nur aktivierte Thrombozyten können lösliches Fibrinogen effektiv binden und mit anderen Thrombozyten Plättchenmikroaggregate bilden, da der Fibrinogenrezeptor, der Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex, nach Aktivierung erst seine effektive Affinität für Fibrinogen aufweist. Diese Erhöhung der Affinität des Rezeptors wird durch eine Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung der Liganden-Bindungsstelle bewirkt und es kommt dabei nach Fibrinogenbindung zum sogenannten *inside-out*-

signaling (Cosemanns et al., 2008). Das Glykoprotein IIb-IIIa besteht aus zwei Untereinheiten und ist das quantitativ am meist exprimierte Integrin auf der Oberfläche der Thrombozyten (Floyd und Ferro, 2012). Es befinden sich etwa 60.000 bis 80.000 Rezeptoren auf der Oberfläche und es können weitere nach der Aktivierung der Plättchen durch Verschmelzung mit Granulamembranen hinzukommen (Cosemanns et al., 2008). Wird Fibrinogen an den Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex (in der Interginnomenklatur $\alpha_{IIb}\beta_3$) gebunden, werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, wodurch es zum Spreizen der Thrombozyten, weiterer Granula-Ausschüttung, Stabilisierung der Adhäsion und zur Thrombusbildung durch Ausbildung von Fibrinogenbrücken kommt (Li et al., 2010).

Desweiteren wird durch die Aktivierung der Thrombozyten auch die plasmatische Gerinnung aktiviert, wodurch sich aus Prothrombin Thrombin bildet und dieses wiederum Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Fibrin kann sich nun an das Plättchenaggregat anlagern und durch Quervernetzung stabilisieren. Thrombin ist wohl der stärkste Thrombozytenaktivator und wird aus Prothrombin gebildet, welches in der Leber synthetisiert wird und im Plasma zirkuliert (Hechler et al., 2005).

Somit spielt Thrombin sowohl in der Thrombozytenaktivierung als auch in der plasmatischen Gerinnung eine entscheidende Rolle (Monroe et al., 2002).

Der Thrombinrezeptor, zur Familie der Protease aktivierter Rezeptoren (PAR) gehörend, ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen (Levy-Toledano, 1999). Bis heute sind vier verschiedene Rezeptoren bekannt, PAR-1, -2, -3 und -4, wobei nur PAR-1 und PAR-4 in menschlichen Thrombozyten exprimiert werden (Montalescot, 2011). Ihr spezifischer Ligand, die Serinprotease Thrombin, aktiviert diesen Rezeptor, indem es den N-Terminus zwischen Arg 41 und Ser 42 spaltet (de Souza Brito und Tricoci, 2013). Dadurch entsteht ein neuer N-Terminus mit der Sequenz SFLLRN-x, welcher den Rezeptor nun über intramolekulare Bindung dieses neuen N-Terminus aktiviert (Coughlin, 1999). Daraufhin wird das Signal in die Zelle geleitet und anschließend über eine Signalkaskade verschiedene weitere Prozesse, wie Sekretion der Inhaltsstoffe von Granula, induziert (De Candia, 2011). Nach Stimulation des PAR durch Thrombin kommt es zur Aktivierung eines Gq-Proteins. Dieses wiederum sorgt für die Aktivierung der Phospholipase C, wodurch es zur Spaltung von PIP_2 in die second Messengers IP_3 und DAG kommt. Infolgedessen wird sowohl Calcium aus dem dichten Granula freigesetzt als auch die Proteinkinase C aktiviert. (Goggs und Poole, 2012) Interessanterweise wird PAR-4, im Gegensatz zu PAR-1, nur durch hohe Thrombinkonzentrationen aktiviert (Picker, 2013). Untersuchungen haben gezeigt, dass

eine Hemmung von PAR-1 es zu keiner Thrombozytenantwort nach Stimulation mit 1 nM Thrombin führt, jedoch ab einer Konzentration von 30 nM Thrombin eine langsame Reaktion der Thrombozyten einsetzt. Eine Hemmung von PAR-4 zeigt sich dagegen, bei keiner Konzentration des Thrombins, einen Effekt (Coughlin, 1999).

Eine Verstärkung der Thrombineffekte kann durch die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausgelöst werden. Eine alleinige Aggregation der gewaschenen Thrombozyten durch Adrenalin ist allerdings nicht möglich (Lanza et al., 1988). Adrenalin wirkt über einen α_{2A} -Rezeptor, welcher wiederum ein Gi-Signal induziert (Fälker et al., 2004). Zur vollständigen Thrombozytenaktivierung werden ein Gq – und ein Gi-Signal benötigt.

Unter physiologischen Bedingungen sind diese Abläufe streng auf Bereiche mit geschädigtem oder verletztem Endothel im Sinne einer lokalen Blutungsstillung beschränkt. Pathologischen Charakter kann die primäre Hämostase allerdings in arteriosklerotischen Bereichen annehmen, wie z. B. im Rahmen eines Myokardinfarktes oder Apoplexes. In diesem Falle kommt es durch die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques zu einer Thrombusformation und daraus folgend zum Verschluss der Koronararterie und mangelnder Sauerstoffversorgung im distalen Bereich des Myokards (Picker, 2013). Um einer solchen unerwünschten lokalen Hämostase vorzubeugen, ist eine Vielzahl von Medikamenten mit verschiedenen Wirkmechanismen auf dem Markt.

Viele Medikamente, wie auch einst das Salicin, ein Prodrug aus dem Salizylsäure entsteht, wurden aus Naturstoffen abgeleitet, weshalb im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Naturstoffe auf ihre antiaggregatorische Funktion bei Thrombozyten in vitro untersucht wurden. Dabei wurden Inhaltsstoffe sowohl aus Pilzen, Flechten und unterschiedlichen Pflanzen untersucht. Hier konnten wir für Purpurogallin (PPG) eine antiaggregatorische Wirkung nachweisen. Die Strukturformel zeigt die Abbildung 2.

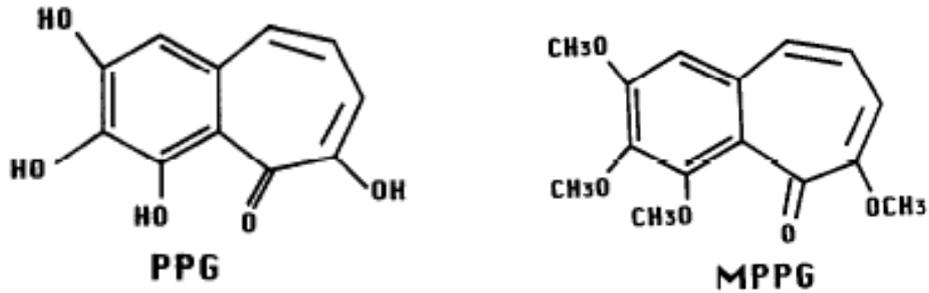


Abbildung 2: Strukturformel Purpurogallin (PPG) und Permethylpurpurogallin (MPPG) (Wu et al., 1996)

PPG ist eine kristalline rötlich-braune Substanz, welche aus dem Gallapfel der Weißeiche (*Quercus* spp.) gewonnen werden kann und als Produkt einer Oxidation von Pyrogallol entsteht (Inmori et al., 1997). Es hat eine Molmasse von 220,17 g/mol. In der Literatur werden diesem Naturstoff, einen Benzotropolonderivat, bereits einige Effekt auf menschliche Zellen zugeschrieben, wie zytoprotektive Effekte auf Nieren-, Hepatozyten- und Herzzellen. Außerdem wurde eine antibakterielle Wirkung auf Gram-positive Keime nachgewiesen (Kim et al., 2011). Auch hemmende Funktionen auf die Mitose und Tumorzellen sind bislang bekannt. Weiterhin ist die Inhibition verschiedener Enzyme zu nennen, wie der Glutathione-S-Transferase, der Xanthinoxidase und der Catechol-O-Methyltransferase oder der Tyrosin-spezifische Proteinkinasen, der Integrase des Human Immunodeficiency Virus 1 oder der Prolylendopeptidasen (Murugan et al., 2011).

Wirkungen des Purpurogallins werden auf die Hemmung der Polo-Like-Kinase 1 (PLK-1) zurückzuführen (Lowery et al., 2005). Bisher sind fünf unterschiedliche Polo-Like-Kinasen bekannt, PLK-1, PLK-2, PLK-3, PLK-4 und PLK-5 (Zitouni et al., 2014). Ursprünglich wurde die Kinase nach dem Phänotyp eines Protein namens Polo in *Drosophila melanogaster* benannt, bei dem beobachtet wurde, dass es bei Mutationen in diesem Protein zu einer Fehlfunktion des Spindelapparates kommt. Bisher zeigte die onkologische Grundlagenforschung besonders Interesse an der PLK-1, da diese in vielen Tumoren hoch exprimiert wird. Strukturell werden zwei Bereiche in der Kinase unterschieden, zum einen der N-Terminus, eine Serin/Threonin-reiche Region, welche die Kinasendomäne beinhaltet. Dieser Kinasenbereich ist hoch konserviert, deutlich mehr als der C-Terminus, und ähnelt denen in Aurorakinasen und Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen. Am C-Terminus befinden sich die zwei Polo-Boxen, PB1 und PB2, die sogenannte Polo-Box-Domain (PBD) (Lowery et al., 2005). Die beiden PBs bilden

zusammen eine Art Tasche, um Zielproteine zu phosphorylieren (Archambault und Glover, 2009). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der PLK-1.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der PLK-1 nach Lowery et al., 2005.

Struktur der Polo-Like Kinase 1 mit Darstellung des Kinasenbereiches am C-Terminus und der PBD am N-Terminus.

Der PBD wird zudem eine besondere Bedeutung bei der Lokalisation an subzelluläre Strukturen zugesprochen, was sich durch Mutationen in der PB 1 und dem daraus folgenden Funktionsverlust und veränderter intrazellulärer Lokalisation der Kinase zeigt (Park et al., 2010).

Damit die Polo-Like Kinase vollständig aktiviert werden kann, sind einige, unten genannte Schritte notwendig. Zunächst ist die Phosphorylierung eines Zielproteins (Substrat) notwendig, das sogenannte Priming. Hierbei lassen sich verschiedene Mechanismen unterscheiden, zum einem das Nonself-priming, wobei das Zielprotein durch eine andere Kinase wie die Cdc2 phosphoryliert wird und zum anderen das Selfpriming, wobei das Zielprotein durch die PLK-1 selbst phosphoryliert wird.

Bindet nun die Polo-Box-Domäne an das Zielprotein, wird die PLK-1 teilweise aktiviert (Park et al., 2010). Zur vollständigen Aktivierung ist nun ein weiterer Schritt notwendig; eine Phosphorylierung der Polo-Like Kinase in der Kinasen-Domäne im T-Loop an Threonin 210. Diese geschieht in humanen Zellen durch eine weitere Kinase, Aurora A, mit ihrem Cofaktor Bora (Archambault et al., 2015). Die nun vollständig aktivierte PLK-1 ist jetzt in der Lage andere Proteine (distributive Phosphorylierung) oder das Zielprotein weiter zu phosphorylieren (progressive Phosphorylierung) (Park et al., 2010). Unterschieden werden muss allerdings, dass bei der progressiven Phosphorylierung die Zeit der entscheidende Faktor ist. Das Priming und die Phosphorylierung des Zielproteins müssen zeitnah geschehen, da sonst durch Phosphatasen die Priming-

Phosphorylierung rückgängig gemacht wird. Bei der distributiven Phosphorylierung ist der Ort und weniger die Zeit von entscheidender Bedeutung. Entsprechende Substrate müssen sich in unmittelbarer Umgebung befinden. Welches dieser beiden Modelle beim Menschen überwiegt, ist nicht geklärt (Lowery et al., 2005).

Die optimale Sequenz in Proteinen, um von der PBD erkannt zu werden, ist interessanterweise Ser-[pSer/pThr]-[Pro/X]. Dieses lässt darauf schließen, dass Cdks, MAP-Kinasen und andere während der Mitose aktiven Kinasen Substrate der PLK-1 phosphorylieren, um die PLK-1 in der Nähe ihrer Substrate zu lokalisieren (Lowery et al., 2005).

Die kernlosen Thrombozyten enthalten, wie in dieser Arbeit nachgewiesen PLK-1, sind allerdings nicht zur Mitose fähig, so dass diese Kinase noch andere Funktionen aufweisen könnte. Durch Experimente für die hier vorliegende Arbeit kann vermutet werden, dass die PLK-1 eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenfunktion spielt und sich diese durch Purpurogallin hemmen lässt.

Weitere wichtige Enzyme der Thrombozytenfunktion spielen die Mitogen aktivierten Kinase. Diese Mitogen aktivierte Kinasen (MAPKinasen) regulieren eine Vielzahl von Zellfunktionen wie Proliferation, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose in eukaryontischen Zellen (Johnson und Lapadat, 2002). Zu der Familie dieser Serin-Threonin-Proteinkinasen gehört sowohl die p38 MAPKinase als auch JNK1 und JNK2 (c-Jun N-terminal Kinase) sowie ERK1 und ERK 2 (extracellular signal-regulated kinases) (Geest und Coffey, 2009).

MAPKinasen werden strukturell und nach ihrer Aktivierung durch Stressfaktoren unterschieden:

1. Die Stress-aktivierten MAPKinasen wie p38 und JNK (Grossi et al., 2014)
2. Die nicht durch Stress aktivierbaren MAPKinasen wie ERK (Geest und Coffey, 2009)

In menschlichen Thrombozyten sind bislang die MAPKinasen p38, ERK und JNK nachgewiesen (Adam et al., 2008). Bei der Aktivierung von Thrombozyten durch Agonisten wie Thrombin, ADP, Kollagen, von Willebrandfaktor oder Thromboxan A2 setzt sich eine Signalkaskade in Gang, welche zu der Aktivierung dieser eben beschriebenen MAPKinasen führt (Adam et al., 2008).

Durch stromaufwärts gelegene Kinasen (MEKK und MEK) kommt es zu einer dualen Phosphorylierung der jeweiligen MAPKinase. Nur wenn zwei Phosphorylierungen, zuerst an einem Tyrosinrest und anschließend an einem Threoninrest erfolgen, werden die Proteinkinasen vollständig aktiviert; der Nachweis dieser dualen Phosphorylierung wird als relatives Maß für die Aktivität genutzt (Pearson et al., 2001).

Durch verschiedene Stress-Stimuli wie z.B. Zytokine, Hormone oder auch Hitze-Schock-Proteine werden nach der Phosphorylierung durch MEK 3 und 6 die Stress-aktivierten MAPKinasen, wie der MAPKinase p38, aktiviert (Pearson et al., 2001). Durch die oben bereits erwähnte duale Phosphorylierung wird die MAPKinase p38 vollständig aktiviert. Mittelweile sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen der MAPKinase p38 in Thrombozyten bekannt. Unter anderem zählen dazu die Freisetzung von Arachidonsäure und die Aktivierung der Phospholipase A2 durch Phosphorylierung (Kramer et al., 1996; Chen et al., 2001). Aber auch zur Adhäsion an die Kollagenmatrix der Thrombozyten wird die MAPKinase p38 benötigt (Adam et al., 2008).

Die MAPKinase ERK liegt in humanen Thrombozyten in zwei Isoformen vor, der ERK1 (41kDa) und ERK2 (43kDa). Auch die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK2 geschieht nach Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten wie Thrombin, Kollagen und vWF. Da ERK aber auch bei der Proliferation eine entscheidene Rolle spielt, ist eine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren möglich (Adam et al., 2008; Geest und Coffey, 2009). Diese Aktivierungsvorgänge lassen sich bei ERK1 nicht auslösen, wahrscheinlich aufgrund von einer deutlich geringeren Menge an ERK1 in menschlichen Thrombozyten. Einen zentralen Schritt in der Signaltransduktion nach Stimulation der Thrombozyten durch Thrombin, ADP oder auch Kollagen bis zur Phosphorylierung bzw. Aktivierung von ERK2 nimmt die Proteinkinase C ein und einen damit vergesellschafteten intrazellulärer Ca^{2+} Anstieg. Eine Gemeinsamkeit von ERK und p38 ist die Abhängigkeit von der *Outside-in* Signalkaskade. Wird Fibrinogen am den Gb IIb-IIIa Rezeptor gebunden, kommt es zu einer verminderte Aktivität der MAPKinasen durch Aktivierung der entsprechenden Phosphatasen (Levy-Toledano, 1999).

MAPKinasen spielen eine fundamentale Rolle bei den Funktionen der Thrombozyten. Sie sind beteiligt an der Adhäsion, dem Spreizen als auch der Aggregation und somit auch bedeuteten für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen.

Da kardiovaskuläre Erkrankungen wie das akute Koronarsyndrom und der ischämische Apoplex zu den häufigsten Erkrankungen und Todesursachen weltweit zählen, ist die Therapie und Prophylaxe für diese Erkrankungen von besonderer Bedeutung.

Für die Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen spielen Thrombozytenaggregationshemmer eine entscheidende Rolle. Dementsprechend ist der Wunsch nach weiteren effektiven Thrombozytenaggregationshemmern mit möglichst geringen unerwünschten Wirkungen groß. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Naturstoffe auf ihre Hemmwirkung bezüglich der Thrombozytenaggregation untersucht werden.

Purpurogallin, aus dem Gallapfel der Weißeiche (*Quercus* sp.) isoliert, stand bislang vor allem im Interesse der onkologischen Grundlagenforschung, da dem PPG bisher eine besondere Rolle im Bereich des Zellzykluses zugesprochen wird (Abou-Karam und Shier, 1999).

Einflüsse auf Thrombozyten waren bis dato nicht bekannt.

Nach Detektion dieses Naturstoffes soll weiterhin untersucht werden, auf welchen Wegen die Thrombozytenaggregation beeinflusst wird und welche Proteine auf zellulärer Ebene an diesen Signalwegen beteiligt sind. Dazu sollen sowohl bereits in Thrombozyten bekannte Proteine wie die MAPKinasen als auch bislang unbekannte thrombozytäre Proteine untersucht werden.

2 Zielsetzung

Viele aktuell therapeutisch genutzte Thrombozytenaggregationshemmer gehen häufig mit unerwünschten Wirkungen wie Blutungen einher, weshalb stetig nach Alternativen gesucht wird. Da Naturstoffe und ihre Derivate heute in der Medizin häufig Anwendung finden, wurden im Rahmen diese Arbeit verschiedene Naturstoffe auf ihre antiaggregatorische Funktion untersucht.

Daraus ergeben sich folgende Ziele für diese Arbeit:

1. Detektion eines Naturstoffes aus mehreren Naturstoffen aus einem vorgegebenen Kontingent des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie mit hemmendem Einfluss auf die Thrombozytenaggregation.
2. Quantifizierung der Hemmung der Thrombozytenaggregation.
3. Untersuchung der Hemmstoffe der Aggregation bezüglich ihrer Wirkung auf intrazelluläre Proteine. Da nur Purpurogallin als Hemmstoff identifiziert werden konnte, sollen intrazelluläre Proteine, wie MAPKinasen und die Polo-like Kinase 1, näher untersucht werden, um dadurch Rückschlüsse auf die Signaltransduktion ziehen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Sigma, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München
Essigsäure	Sigma, München
Ethanol	Sigma, München
D(+)-Glukose (Dextrose)	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Gyzerin	Serva, Heidelberg
HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin- N`-2-ethyan-sulfonsaure)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma, München
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma, München
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt
Ovalbumin	Sigma, München
PBS (phosphate bufferd saline)	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4- (4-sulfo-phenylazo) phenylazo]-2,7-naphtalen-disulfonsäure)	Sigma, München

Salzsäure (rauchend, 37%)	Merck, Darmstadt
SDS (Dodecylsulfate Natrium-Salz)	Serva, Heidelberg
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylen-diaMinutene)	Sigma, München
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aMinutenomethan)	Roth, Karlsruhe
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma, München
Harnstoff	Roth, Karlsruhe

Agonisten

Thrombin, bovines (≥ 1000 units/mg Protein)	Sigma, München
Epinephrin	Sigma, München

Antagonisten und Inhibitoren

Purpurogallin	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
Permethylpurpurogallin	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
Zalreiche Naturstoffe (s. Tabelle 1)	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
Apyrase, grade III, from potato	Sigma, München
Hirudin	Loxo, Dossenheim
S1197 (3-{2-[4-(S)-(4-aminoiminomethyl-phenyl)-4-methyl-2,5-dioxo-imid-azolidin-1-yl]acetyl-amino}-3-(S)-phenylpropionic acidhydrochlorid)	Aventis Pharma, Frankfurt (Dr. Just)

Antikörper

Anti-RAN, monoklonaler Maus- Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg
Phospho-p38 MAPK (28B10, Thr180/Tyr182) monoklonaler Maus-Antikörper	Cell Signaling Technology (NEB, Frankfurt)
Phospho-p44/p42 MAPK (ERK 1/2, D13.14E Thr 202/Thy204) monoklonaler Maus-Antikörper	Cell Signaling Technology (NEB, Frankfurt)
Anti-PLK-1 (208G4), monoklonaler Kaninchen Antikörper	Cell Signaling Technology (NEB, Frankfurt)
Anti-Phospho-PLK-1(Thr210) polyklonaler, Kaninchen Antikörper	Cell Signaling Technology (NEB, Frankfurt)
Anti-Maus-Antikörper (HRP-konjugiert)	Sigma, München
Anti-Kaninchen-Antikörper (HRP-konjugiert)	Sigma, München

3.2 Geräte und Materialien

Aggregometer (Platelet aggregation profiler PAP 4)	Bio/Data Corp. Hatboro PA, USA, Mölab, Langenfeld
Blotkammer (Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer)	Biorad, München
Cronex 5 Filmfolien (18 x 24cm)	Agfa, Mortsel, Belgien
Densitometer GS 800 und Quantity OneR Software	Biorad, München
Glaskuvetten, silikonisiert	Mölab, Langenfeld
Nitrozellulose (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge RC 26 Plus	Sorvall (Kendro), Hanau

3.3 Methoden

3.3.1 Präparation der Thrombozyten

Die Thrombozyten werden aus Vollblut gesunder freiwilliger Probanden gewonnen. Ein positives Votum zur Blutentnahme der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg liegt vor. Vorab erfolgt eine ausführliche Aufklärung, auch über den Verbleib des Probenmaterials nach Abschluss der Experimente. Der Proband willigt schriftlich in die Blutentnahme ein. Vor der Blutentnahme muss der Proband glaubhaft versichern, dass er innerhalb eines Zeitraums von mindestens 14 Tagen keine Medikamente eingenommen hat, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen könnten, wie z.B. nichtsteroidale Antirheumatika. Die Präparation erfolgt nach einer modifizierten Methode nach Greinacher (1991). Es werden 60-80ml venöses Blut aus der Cubitalvene eines freiwilligen Spenders

entnommen und in 13ml-Sarstedt-Röhrchen mit ACD-A-Lösung bestehend aus 2,2 % Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 0,8 % Citronensäure-Monohydrat, 2,5 % α -(+)-D-Glukose im Verhältnis von ca. 1:6 überführt. Alle Präparatierschritte erfolgen bei Raumtemperatur. Nach 15minütige Zentrifugation bei 275g lässt sich das plättchenreiche Plasma (PRP) von den restlichen Blutbestandteilen durch Pipitieren abtrennen und in neue 13ml-Sarstedt-Röhrchen überführen. Dabei ist darauf zu achten, Kontaminationen durch andere Blutbestandteile zu verhindern. Zu jedem ml PRP wird 111 μ l ACD-A zugegeben, um eine unerwünschte vorzeitige Aggregation zu verhindern. Darauf folgt eine weitere Zentrifugation bei 800 g für 10 min. Der entstandene Überstand wird großzügig verworfen und das Sediment wird nun mit einen 1 ml Waschpuffer 1 (pH 6,4) bestehend aus 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5,5 mM Glukose, 1 U/ml Apyrase, 1 U/ml Hirudin resuspendiert. Die enthaltende Apyrase dient der Hydrolyse von ADP und sollen eine unerwünschte Thrombozytenaktivierung verhindern. Hirudin hemmt Thrombin durch Blockierung des aktiven Zentrums und soll wie Apyrase eine unerwünschte Thrombozytenaktivierung während der Präparation verhindern. Nach Zugabe weiterer 3ml Waschpuffer 1 wird für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Suspension bei 400 g für 10 min zentrifugiert und anschließend das Thrombozytensediment mit Waschpuffer 2 resuspendiert. Die Zusammensetzung der beiden Waschpuffer ist identisch, bis auf das Fehlen des Hirudins im Waschpuffer 2. Nach wiederholter Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten wird die Zentrifugation wiederholt und das Sediment nun mit 1 ml Suspensionspuffer resuspendiert. Dieser Suspensionspuffer enthält kein Hirudin, und nur 0,02 U/ml Apyrase bei einem pH von 7,4. Zusätzlich sind 2 mM CaCl₂ und 2 mM MgCl₂ enthalten.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung der Thrombozyten

Zur Konzentrationsbestimmung der Thrombozyten werden 10 μ l der Thrombozyten-suspension zu 990 μ l Suspensionspuffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Von dieser Suspension werden 10 μ l auf eine Neugebauer-Zählkammer aufgetragen und anschließend mindestens 3 Zählquadrate ausgezählt. Aus dem daraus ermitteltem Mittelwert wird die Konzentration der Thrombozyten pro Milliliter anhand der Formel: Mittelwert \times 0,25 \times 10⁸ ermittelt.

3.3.3 Allgemeine Messung der Thrombozytenaggregation

Die in den vorherigen Schritten aus menschlichem Blut isolierten Thrombozyten werden mit Suspensionspuffer auf eine Konzentration von 3×10^8 Thrombozyten pro ml eingestellt. Pro Messung werden 198 μ l Thrombozytensuspension in einer silikonisierten Glasküvette mit Magnetrührer benötigt. Vor Beginn der eigentlichen Aggregationsmessung werden die Thrombozyten für zehn Minuten bei 37 °C mit 11 μ l Naturstofflösung oder anderem Wirkstoff vorinkubiert. Im Anschluss werden 11 μ l Thrombin unterschiedlicher Konzentration, als Agonist, hinzugegeben. Die Aggregationsmessung erfolgt unter ständigem Rühren durch die Magnetrührer mit dem Aggregometer (Platelet aggregation profiler PAP 4) nach der Methode nach Born (1962). Die Messung, die Licht-Transmissions-Aggregometrie, wird beendet, sobald keine Veränderung der Aggregation mehr erkennbar ist, frühestens jedoch nach drei Minuten. Durch die Aggregation der Thrombozyten sinkt die Extinktion und der Schreiber des Aggregometers gibt diese Änderung der Extinktion in Prozent wieder. Desweiteren gibt das Aggregometer auch die anfängliche Steigung der Aggregationskurve an.

3.3.4 Aggregationsmessung von Thrombozyten unter Einfluss verschiedener Naturstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir zu Beginn Aggregationsmessungen von Thrombozyten unter Einfluss von 79 verschiedenen Naturstoffen untersucht. Die Naturstoffe wurden freundlicherweise von Dr. Norbert Arnold, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung: Natur- und Wirkstoffchemie zur Verfügung gestellt. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um Substanzen, welche aus Pflanzen, Pilzen und Flechten isoliert wurden.

Tabelle 1: Getestetete Naturstoffe

Die Substanznamen wurden generiert mit Hilfe von:
Programm ChemDram Ultra 8.0, CambridgeSoft;
Datenbank REAXYS, Elsevier;
Trivialnamen der Pilzinhaltsstoffe entstammen: Gill, M., Steglich, W., 1987. Pigments of fungi (Macromycetes). Progr. Chem. Org. Nat. Prod. 51, S. 1–317.

Mol ID	Name
1441	5-(2-hydroxyquinoxalin-3-yl)benzene-1,2,4-triol

1408	2-nitrobenzaldehyde
1410	Methyl 1H-indole-3-carboxylate
1428	Emodin
1437	Boviquinone-4
1438	Boviquinone-1
1457	Boviquinone
1445	3,4-dihydroxy-2-((E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)benzoic acid
1446	3-((2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trienyl)benzene-1,2,4-triol
1447	2-fluoro-3,4-dihydroxybenzoic acid
1546	Cinnarubin
1385	Phloroglucin
1389	4,5-dihydroxy-2-methylbenzoic acid
1405	4-nitrophenol
1393	2-fluoro-4-hydroxybenzoic acid
1396	4-methoxy-2-methylbenzoic acid
1398	Methyl 3,4-dihydroxybenzoate
1401	3-nitrobenzoic acid
1460	Mannose
1505	Erythroglaucin
1506	Chinizarin
1508	Flaviolin
1547	Questin
1455	Purpurogallin
1550	4-Hydroxyflavomannin-6,6'-dimethylester
15552	Parietinic acid
1556	1-Octen-3-ol,
1559	Scutigeral
1560	Xanthopurpurin
1	Phloroglucinol-Derivat
1462	Infractin acetat
1464	6-Hydroxy-beta-carbolin-1-propionsäure-ethylester
1468	Infractinine
1500	Catenarin
1478	Emodic acid
1482	Arthrosporone
1487	Xylaral

1488	Dermoglaucin
1475	2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin
1264	Psalliotin
1272	Atromentin
1275	Permethylpurpurogallin
1277	Xerulinic acid
1281	Boviquinone-3
1283	Hydroxyhydroquinone
1287	Involutin
1290	Stearic acid
1292	Methyl 9,10-dihydro-1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methyl-9,10-dioxoanthracene-2-carboxylate
1155	Ethyl 3-bromo-4-hydroxybenzoate
1247	3-((Z)-2-nitrovinyl)-1H-indole
1252	2,5-Dihydroxy-3-methyl-benzochinon
1253	1-(2-nitrophenyl)isoquinoline-6,7-diol
1255	p-hydroxybenzazosulfonat
6914	4-Hydroxy-anthron
1328	Endocrocin
1330	3-bromo-4-hydroxybenzoic acid
1332	4-hydroxy-2-methylbenzoic acid
1323	3-bromo-4,5-dihydroxybenzoic acid
1365	4-Hydroxybenzic acid methyl ester
1368	Methyl 4-(methoxymethoxy)-3- bromo benzoat
1372	Ethyl-4-hydroxybenzoate
1355	Polyporic acid
1300	Geranyl-p-hydrochinone
1306	Isoxerocomic acid
1308	Diketopiperacinderivat
1314	Gyrocyanin
5359	Naphtochinonderivat
5367	Malonsäurediethylester
6596	3-iodo-1,2,4,5-tetrakis(methoxymethoxy)benzene
5349	Variegatorubin
7162	Mannitol
2052	3,7 dimethyl octa 2,6 dienyl bromide

6404	3,7 dimethyl octa 2,6 dienyl bromide
6528	6-((E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)benzene-1,2,4-triol
6439	5-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-2-one
6443	Leucopin
6506	DL-Alanin
6509	Ninhydrin
6482	3-(hydroxymethyl)-furan

In Vorbereitung auf die Messungen mussten die Naturstoffe in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht werden. Um eine möglichst hohe Spezifität der Wirkung auf Thrombozyten nachzuweisen, haben wir eine Endkonzentration der Naturstoffe von 10 μM gewählt. Die Thrombozytenkonzentration betrug bei der Messung stets $3 \cdot 10^8/\text{ml}$. Zu Beginn erfolgt eine Aggregationsmessung mit Thrombin und Suspensionspuffer ohne Einfluss von Fremdstoffen, um eine Funktionstestung der Thrombozytenpräparation durchzuführen. Hierbei sollte ein Slope von etwa 40 erreicht werden, da sonst davon ausgegangen werden muss, dass die Thrombozyten nicht voll funktionstüchtig sind. Nach Erfüllung dieser Voraussetzung, werden die Thrombozyten für zehn Minuten mit den jeweils zu testenden Naturstoff in DMSO vorinkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgt die Messung unter Zugabe von Thrombin. Die Messung erfolgt über drei Minuten. Am Ende des Versuches oder direkt im Anschluss an eine erfolgreiche Hemmung der Aggregation durch einen Naturstoff erfolgte grundsätzlich eine erneute Messung der Aggregation unter alleinigem Einfluss von Thrombin, um die Funktion der Thrombozyten und die agonistische Funktion des Thrombins am Ende der Versuchsserie sicherzustellen. Sollte es in dieser Messung zu keiner ausreichenden Aggregation mehr gekommen sein, wurde der Versuch verworfen. Desweiteren wurde auch die Wirkung vom DMSO getestet, um eine Aggregationshemmung durch das Lösungsmittel auszuschließen bzw. zu ermitteln.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden bei jeder Messung eine Endkonzentration der Substanzen von 10 μM und von Thrombin von 0,1 U/ml genutzt. Im weiteren Verlauf wurden dann verschiedene Konzentrationen getestet, so haben wir Konzentrationen der Naturstoffe, insbesondere des Purpurogallins von 1,3,10 und 30 μM und des Thrombins von 0,025; 0,05; 0,1 und 0,3 U/ml untersucht.

3.3.5 Thrombozytenstimulation zur Analyse intrazellulärer Proteine

Zur Analyse von Proteinen der stimulierten Thrombozyten und der entsprechenden Phosphorylierungen werden 180µl einer Suspension mit $5 \cdot 10^8$ Thrombozyten pro ml in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Diese wird bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer mit 10 µl einer Naturstoffkonzentration für zehn Minuten vorinkubiert. Um die Scherkräfte im menschlichen Gefäßsystem nachzuahmen, wird ein kleines Metallkügelchen in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach Ablauf der zehn Minuten werden 10 µl eines Agonisten z. B. Thrombin mit in das Eppendorfgefäß gegeben und die nun ablaufende Reaktion nach 90 Sekunden mit 50 µl SDS-Probenpuffer (10 % SDS, 1,43 M b-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin, 20 % 0,625 M Tris-HCl pH 6,8 (v/v), 6 M Harnstoff, Bromphenolblau ad lib) gestoppt. Im Anschluss werden die entstandenen Proben für zehn Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur genaueren Analyse der Proteine in Thrombozyten werden diese anhand einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die SDS-Page erfolgt nach der Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) und wird mit Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer von BioRad, München durchgeführt. Zur Auftrennung werden 10 %ige SDS-Gele benötigt. Die Zusammensetzung eines Gels ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der Gelelektrophorese

	Trenngel 10%	Sammelgel
30% Acrylamid/Bisacrylamid	1,875 µl	417,5 µl
Tris-HCl 0,75 M, pH 8,8	2,8125 µl	---
Tris-HCl 0,625M, pH 6,8	----	312,5 µl
20% (w/v) SDS	28,25 µl	12,5 µl
TEMED	2,825 µl	2,5 µl
Aqua bidest.	0,875 µl	1,75 µl
APS	39,5 µl	12,5 µl

Nach Fertigung dieser Gele können sie in die Gelelektrophoresekammer eingespannt werden. Die Kammern werden mit Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v)) aufgefüllt die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen aufgetragen.

Anschließend werden die Proteine nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Desweiteren wird zur Bestimmung der relativen Molmasse einzelner Proteine eine Markerlösung aufgetragen. Diese enthält Proteine unterschiedlicher Größe (Myosin (205 kDa), b-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Katalase (60 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Laktalbumin (14 kDa)), welche durch Anfärben sichtbar gemacht werden können. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Bande aus dem Gel gelaufen ist.

3.3.7 Immuno(Western)-Blot

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können nun mit dem Westernblot auf Nitrocellulosemembranen übertragen werden. Zu diesem Zweck werden die Gele und die Nitrocellulose nach folgendem Schema in entsprechende Blotkammer eingespannt:

Anode

Schwamm

Vier Lagen Filterpapier

SDS-Gel

Nitrocellulosemembran

Vier Lagen Filterpapier

Schwamm

Kathode

Die Blotkammer wird nun vollständig mit Blotpuffer (20 mM Tris, 300 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,015 % SDS (w/v)) gefüllt und anschließend ein elektrisches Feld von 1,8 mA pro cm² Nitrocellulosemembran über vier Stunden Dauer angelegt. Während der

ganzen Zeit steht die Blotkammer in der Kühlung bei etwa 4 °C und wird zusätzlich mit Kühlelementen bestückt. Nach Ablauf dieser Zeit werden Gel und Nitrocellulosemembran getrennt voneinander weiterverarbeitet. Das Gel wird nun mittels Coomassie-Farbelösung ((20 mM Tris, 300 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,015 % SDS (w/v)) gefärbt und anschließend einige Male mit Essigsäure 10%ig entfärbt, um die vollständige Übertragung der Proteine nachzuweisen. Danach wird das Gel verworfen. Die Nitrocellulosemembran wird nun mit Ponceau-Farbelösung [0,5 % Ponceau S (w/v), 5 % Essigsäure (v/v)] gefärbt. Dadurch zeigen auch die Markerbanden. Diese werden mit einem Bleistift nachgezeichnet, damit nach dem Entfärben mit TBS-T-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 0,1 % (w/v) Tween 20) noch genutzt werden zu können. Vor der Inkubation mit dem gewünschten Antikörper müssen alle unspezifischen Proteinbindungsstellen durch eine Blocklösung besetzt werden. Hierfür wird je nach Antikörper BSA 5 % (bovines Serumalbumin) oder MMP 5 % (Magermilchpulver) in TBS-T genutzt. Nun kann die Nitrocellulosemembran über Nacht bei leichtem Schwenken mit dem gewünschten primären Antikörper inkubiert werden. Der entsprechende sekundäre Antikörper wird, nach dreimaligen Waschen für 5 Minuten mit TBS-T-Puffer, um noch freien primären Antikörper zu entfernen, für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Im Anschluss daran erfolgten drei weitere Waschschritte für jeweils 10 Minuten bevor die Nitrocellulosemembranen für eine Minute mit ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence) inkubiert werden können. Hierzu werden ECL-Lösung 1 ((2,5 M LuMinutenol; 0,4 mM p-Cumarinsäure) und ECL-Lösung 2 (100 mM Tris/HCL pH 8,5; 0,18% H₂O₂) gemischt und direkt im Anschluß auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Da der sekundäre Antikörper Peroxidase-gekoppelt ist, wird in Anwesenheit von Wasserstoffperoxidid das Luminol oxidiert. Die nun entstehenden Lichtemissionen können in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm detektiert werden. Dazu werden die Röntgenfilme für eine Zeit von etwa 2-120 Sekunden auf die Nitrocellulosemembranen aufgelegt.

Die entstandenen Banden auf den Filmen werden mittels GS 800 Densitometer (BioRad) eingescannt und durch entsprechender Software (Quantity OneR, BioRad) anschließend quantitativ vermessen.

3.3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit SigmaPlot 9.0. Die Signifikanzen wurden anhand des gepaarten T-Tests getestet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Aggregation unter Einfluss von verschiedenen Naturstoffen

Insgesamt wurden 79 Naturstoffe bezüglich möglicher Einflüsse auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Hierzu wurden gewaschene humane Thrombozyten nach Vorinkubation mit jeweils 10 μM eines Naturstoffes mit 0,1 U/ml Thrombin stimuliert.

Die getesteten Naturstoffe sind in Tabelle 1 in Material und Methoden aufgelistet. Es zeigte sich, dass lediglich eine der untersuchten Substanzen, 2,3,4,6-Tetrahydroxybenzocyclohepten-5-on, Purpurogallin, die Thrombozytenaggregation hemmt.

In Anwesenheit von 10 μM Purpurogallin betrug die Aggregation mit 0,1 U/ml Thrombin $62 \% \pm 23 \%$ ($n=16$), während nach Vorinkubation mit Suspensionspuffer ein Aggregationniveau von $79 \% \pm 8\%$ erreicht wurde ($n=26$). Die Hemmung beträgt somit 17 %. Bei einem p-Wert von 0,003 ist der Unterschied signifikant.

Da alle Naturstoffe in DMSO gelöst wurden, wurde anstatt des Suspensionspuffers auch mit 0,1%igem DMSO geprüft, um eventuelle Beeinträchtigungen der Aggregation durch das Lösemittel berücksichtigen zu können.

Eine Hemmung der Aggregation durch das Lösemittel DMSO 0,1 % in Suspensionspuffer wurde nicht beobachtet. Die Aggregation nach Vorinkubation mit 0,1 %igem DMSO betrug $77 \% \pm 10 \%$ bei Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin ($n=24$), $74 \% \pm 6 \%$ bei 0,1 U/ml Thrombin ($n=16$) und $79 \% \pm 6 \%$ bei 0,3 U/ml Thrombin ($n=10$). Ohne DMSO betrug die Werte bei Thrombin 0,05 U/ml $75 \% \pm 9 \%$, bei Thrombin 0,1 U/ml $79 \% \pm 8\%$ ($n=26$) und für Thrombin 0,3 U/ml $74 \% \pm 8 \%$ ($n=10$). Die entsprechenden p-Werte zeigen bei Thrombin 0,05 U/ml und 0,3 U/ml keine signifikante Hemmung durch DMSO 0,1 % im Vergleich zu Messungen mit Suspensionspuffer (p-Wert Thrombin 0,05 U/ml: 0,87; 0,1 U/ml: 0,03; 0,3 U/ml: 0,09). Eine graphische Darstellung dieses Sachverhaltes zeigt Abbildung 5.

Wurde die Konzentration des Purpurogallin auf 30 μM erhöht und gleichzeitig die Konzentration des Thrombins auf 0,05 U/ml erniedrigt, zeigte sich bei Stimulation mit Thrombin 0,05 U/ml ohne Inhibitor eine Aggregation von $75 \% \pm 9 \%$ ($n=32$) und in Anwesenheit von 30 μM Purpurogallin nur $36 \% \pm 23 \%$ ($n=28$). Eine repräsentative

Messung der Aggregation zeigt Abbildung 4. Der Unterschied von 39 % ist signifikant ($p=6,7 \times 10^{-9}$).

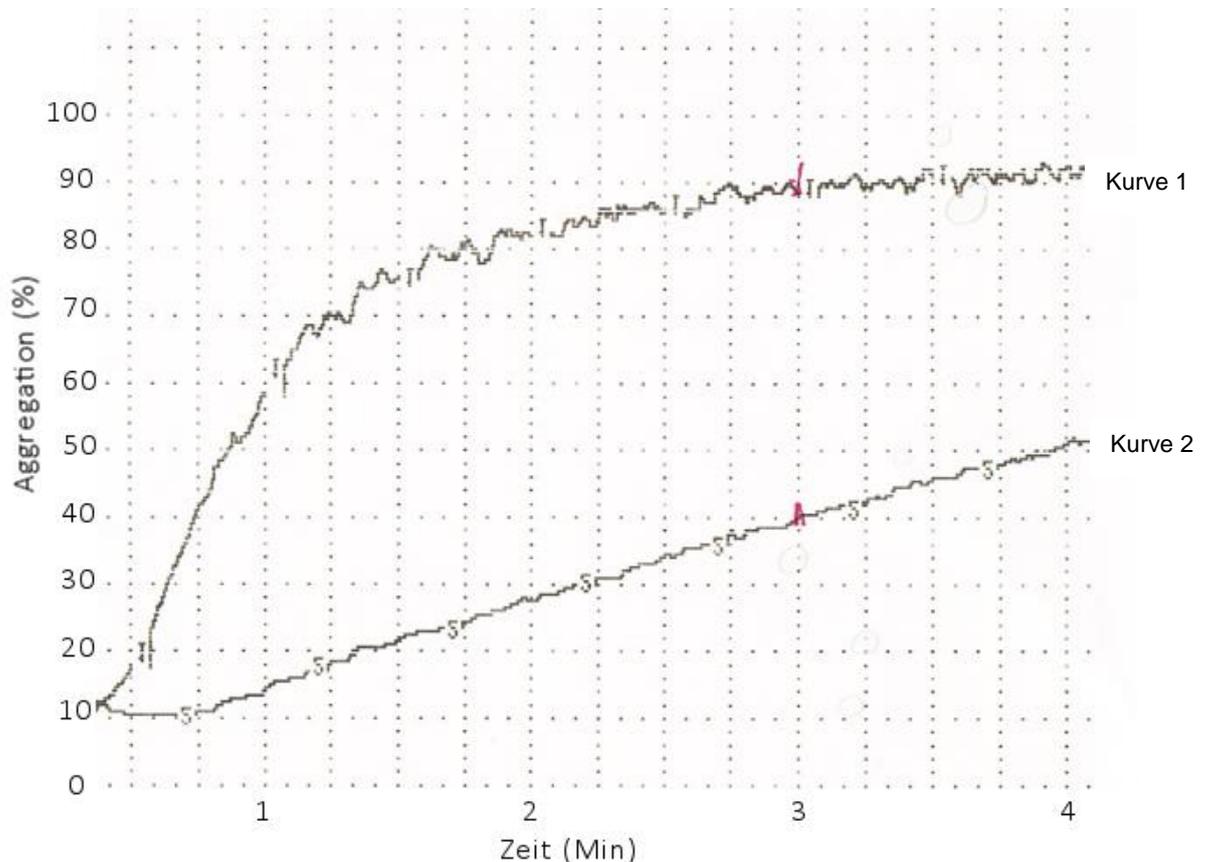


Abbildung 4: Thrombin-induzierte Aggregation in An- und Abwesenheit von Purpurogallin

Isolierte menschliche Thrombozyten (3×10^8 /ml) wurden bei 37 °C unter ständigem Rühren mit Thrombin 0,05 U/ml stimuliert. Die Aggregation ist in % angegeben, ermittelt mittels Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born, wie in Material und Methoden beschrieben. **Kurve 1:** Aggregation mit DMSO 0,1 %, ohne Purpurogallin, **Kurve 2:** Aggregation mit 30 µM Purpurogallin. Die Graphen sind repräsentativ für 24 und 29 Messungen.

4.2 Effekte von Purpurogallin auf die Aggregation in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration

Weiterhin wurde untersucht, welche konzentrationsabhängigen Effekte von Thrombin auf die Hemmung der Aggregation durch Purpurogallin bestehen. Bei einer gleichbleibenden Purpurogallinkonzentration nimmt mit steigenden Thrombinkonzentrationen die inhibitorische Wirkung ab. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Mit 10 µM Purpurogallin und einer Thrombinkonzentration von 0,05 U/ml

konnte die Aggregation auf $44 \% \pm 30 \%$ ($n=22$) signifikant gehemmt werden. Bei einer Thrombinkonzentration von $0,1 \text{ U/ml}$ und $10 \mu\text{M}$ Purpurogallin beträgt die Aggregation $62 \% \pm 23 \%$ ($n=16$). Da jedoch auch bei Thrombin $0,1 \text{ U/ml}$ und DMSO ein signifikanter Unterschied zu SP besteht, kann nicht sicher gesagt werden, welcher Anteil der Aggregationshemmung bei Thrombin $0,1 \text{ U/ml}$ auf das Purpurogallin zurückzuführen ist, insbesondere da der Unterschied zwischen der Messung mit Thrombin $0,1 \text{ U/ml}$ mit DMSO zu $10 \mu\text{M}$ Purpurogallin nicht signifikant ist ($p = 0,07$). Jedoch besteht ein eindeutiger numerischer Unterschied zur Messung ohne Purpurogallin. Nach einer weiteren Erhöhung der Thrombinkonzentration auf $0,3 \text{ U/ml}$ betrug die Aggregation $78 \% \pm 12 \%$ ($n=6$). Hier ist der Unterschied zur Kontrolle ohne Purpurogallin nicht signifikant ($p=0,8$).

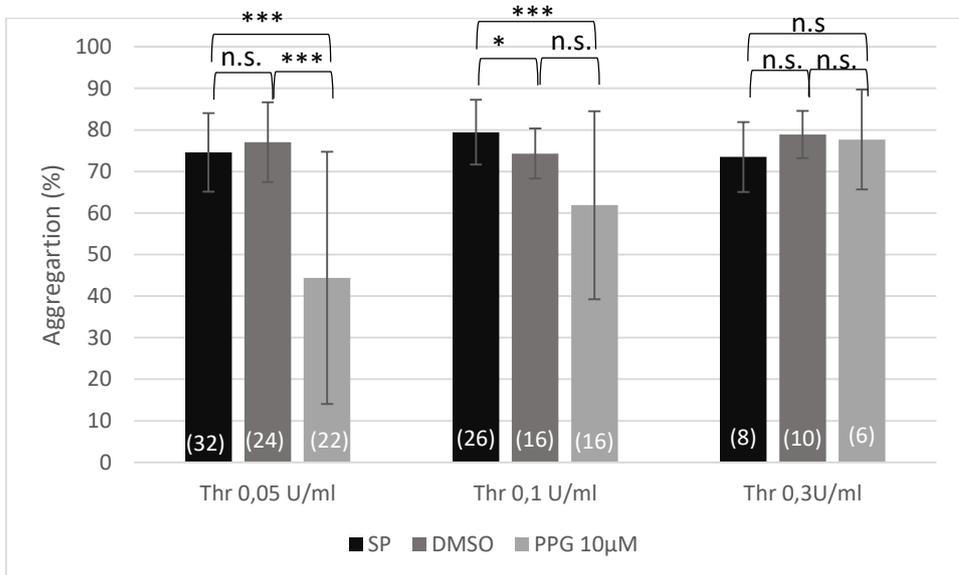


Abbildung 5: Effekte von Purpurogallin auf die Aggregation in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration

Humane gewaschene Thrombozyten ($3 \times 10^8 / \text{ml}$) wurden bei 37°C unter ständigem Rühren nach Vorinkubation mit Suspensionspuffer (SP), DMSO (0,1%) in SP oder Purpurogallin (PPG $10 \mu\text{M}$) mit Thrombin unterschiedlicher Konzentrationen stimuliert. Angegeben sind die Mittelwerte in $\% \pm$ Standardabweichung der Lichttransmission, ermittelt durch die Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born, welche mit Fortschreiten der Aggregation zunimmt.

n.s. = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

Tabelle 3: Signifikanztabelle zur Wirkung von DMSO und Purpurogallin auf die Thrombin-induzierte Aggregation

Tabellarische Darstellung der Signifikanzniveaus der Aggregationshemmungen durch DMSO und Purpurogallin zur Kontrolle mit Suspensionspuffer und Thrombin 0,05 U/ml (Abbildung 5)

	DMSO	Purpurogallin 10 µM
Thrombin 0,05 U/ml + SP	p=0,87	p=0,0002
Thrombin 0,1 U/ml + SP	p=0,03	p=0,003
Thrombin 0,3 U/ml + SP	p=0,09	p=0,79
Thrombin 0,05 U/ml + DMSO	--	p=<0,0001
Thrombin 0,1 U/ml + DMSO	--	p=0,07
Thrombin 0,3 U/ml + DMSO	--	p=0,68

4.3 Die Thrombin-induzierte Aggregation in Abhängigkeit von der Purpurogallinkonzentration

In den vorangegangenen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass bei der Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin sowohl die deutlichste Hemmung der Aggregation als auch kein signifikanter Unterschied zwischen Suspensionspuffer zu DMSO besteht. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen vorrangig die Thrombozytenstimulation mit dieser Konzentration herbeigeführt.

Weiterhin wurden die folgenden Messungen bei der geringen Konzentration von Thrombin durchgeführt, da hier auch eine vergleichsweise stärkere Inhibition durch Purpurogallin erfolgt. Die Aggregation wurde bei steigenden Konzentrationen von Purpurogallin (1-30 µM) gemessen. (Abbildung 6). Von höheren Konzentrationen als 30 µM des Purpurogallins wurde bewusst Abstand genommen um unspezifische Wirkungen auf die Thrombozyten möglichst zu vermeiden.

Purpurogallin hemmt konzentrationsabhängig die Aggregation (Abbildung 6). So zeigt sich nach Vorinkubation mit 30µM Purpurogallin die stärkste Hemmung der Aggregation um 39 % von 75 % ± 9 % (n=32) auf 36 % ± 23 % (n=29), mit 10 µM Purpurogallin beträgt die verbleibende Aggregation 44 % ± 30 % (n=22). Unter dem Einfluss von 3µM wird eine Aggregation von 70 % ± 7 % (n=6) und bei 1 µM Purpurogallin eine Aggregation von 70 % ± 14 % (n=7) erreicht. Unter Anbetracht, dass unter Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin ohne Inhibitor eine Aggregation von 75 % ± 9 % erreicht wird, kommt es zu

einer eindeutigen und signifikanten Aggregationshemmung durch Purpurogallin sowohl mit 30 μM als auch mit 10 μM , wohingegen keine signifikante Hemmung mit 3 μM als auch mit 1 μM beobachtet wird (Tabelle).

Mehrfach wurde in anderen Arbeitsgruppen Purpurogallin mit seiner methylierten Form, dem Permethylpurpurogallin (MPPG), verglichen. Es stellte sich heraus, dass Effekte, welche durch Purpurogallin hervorgerufen werden können, durch Permethylpurpurogallin nicht oder nur abgeschwächt erzielt werden (Wu et al., 1996). Aus diesem Grund wurde auch Permethylpurpurogallin auf die antiaggregatorischen Funktionen hin untersucht.

Mit einer Konzentration von 10 μM als auch mit 30 μM Permethylpurpurogallin konnte keine Hemmung der Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden (Abbildung 6). Nach Vorinkubation mit 10 μM Permethylpurpurogallin zeigte sich eine Aggregation von $72 \% \pm 3,6 \%$ (n=3), nach Vorinkubation mit 30 μM eine Aggregation von $81 \% \pm 8 \%$ (n=4). Mit den p-Werten von 0,884 und 0,222 ist kein signifikanter Unterschied zur Vorinkubation mit Suspensionspuffer zur Kontrolle vorhanden. Dieser Wirkungsverlust des Purpurogallins durch Methylierung der OH-Gruppen bei in vitro Untersuchungen trifft, wie hier gezeigt, auch auf die Thrombozytenaggregation zu.

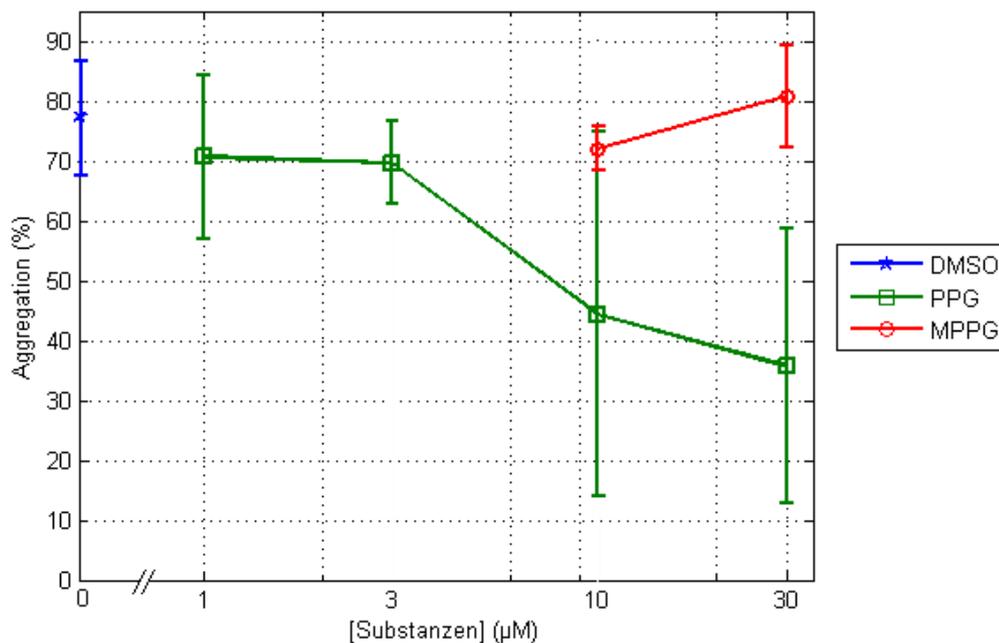


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Effekte von Purpurogallin und Permethylpurpurogallin auf die Aggregation

Die Aggregation von isolierten Thrombozyten ($3 \cdot 10^8$) wird nach zehn- minütiger Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen von Purpurogallin (PPG) und Permethylpurpurogallin (MPPG) und anschließender Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin bei 37 °C unter ständigem Rühren in Prozent gemessen. Aufgetragen ist das Ausmaß der Lichttransmission drei Minuten nach Zugabe des Agonisten nach der Methode nach Born. Anzahl der Messungen: DMSO: n=24, PPG 1 μM: n=7, PPG 3 μM: n=6, PPG 10 μM: n=22, PPG 30 μM: n=29, MPPG 10 μM: n=3, MPPG 30 μM: n=4.

Tabelle 4: Sigifikanztabelle zu den konzentrationsabhängigen Effekten von Purpurogallin und Permethylpurpurogallin

Tabellarische Darstellung der Signifikanzniveaus der Aggregationsmessung zwischen DMSO, dem Hemmstoff und der Kontrolle mit Suspensionspuffer und Thrombin 0,05 U/ml

	DMSO	PPG 1μM	PPG 3μM	PPG 10μM	PPG 30μM	MPPG 10μM	MPPG 30μM
Thrombin 0,05U/ml	p=0,87	p=0,47	p=0,2	p=0,0002	p<0,0001	p=0,23	p=0,44

Ebenso wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Aggregation nach Vorinkubation mit Purpurogallin unterschiedlicher Konzentrationen untersucht (Abbildung7) dargestellt. Hier zeigt sich ebenso ein hemmender Einfluss des Purpurogallins, welcher mit steigenden Konzentrationen zunimmt. Während bei Vorinkubation mit Suspensionspuffer oder DMSO eine Anfangsgeschwindigkeit von 32 ± 7 bzw 35 ± 8 abr.

Units gemessen wird, sinkt sie signifikant auf 11 ± 9 bei $30 \mu\text{M}$ Purpurogallin ab. Zusätzlich wurde zum Vergleich die maximale Aggregation aufgetragen.

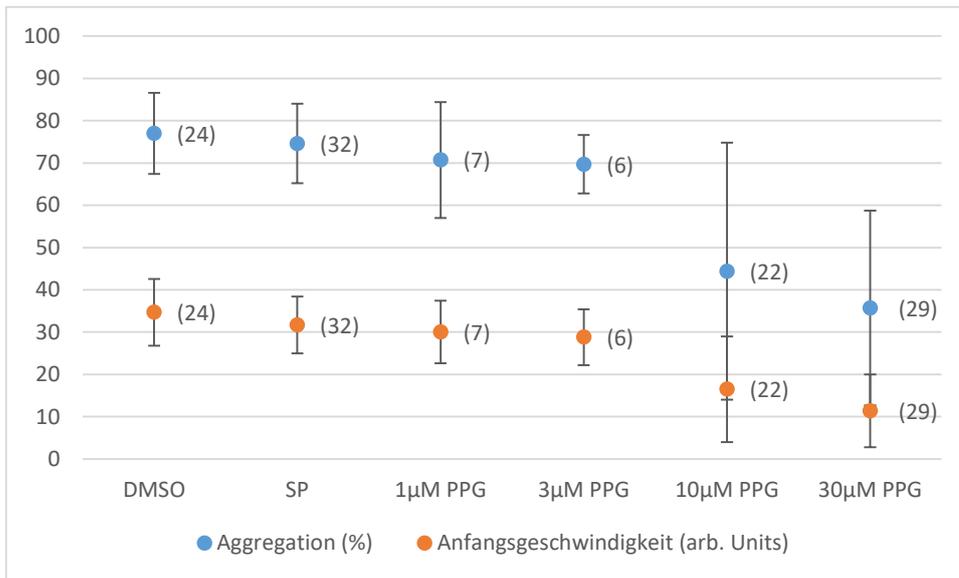


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Effekte von Purpurogallin auf die Anfangsgeschwindigkeit und das Maximum der Aggregation

Die Graphik zeigt sowohl die Anfangsgeschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Aggregation nach drei Minuten mit humanen gewaschenen Thrombozyten ($3 \times 10^8 / \text{ml}$). Diese wurden mit Suspensionspuffer, 0,1 % DMSO oder Purpurogallin unterschiedlicher Konzentrationen für zehn Minuten vorinkubiert und anschließend mit 0,05 U/ml Thrombin stimuliert. Angegeben sind die Mittelwerte in % bzw arb.Units \pm Standardabweichung der Lichttransmission ermittelt durch die die Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born. In Klammern die Anzahl der Messungen.

Tabelle 5: Signifikanztabelle zur Wirkung von DMSO und Purpurogallin auf den Thrombin-induzierte Anfangsgeschwindigkeit und die Aggregation

Tabellarische Darstellung des Signifikanzniveaus der Anfangsgeschwindigkeit und des Maximums der Aggregation mit Purpurogallin (PPG) und 0,1 % DMSO, zur Kontrolle mit SP und Thrombin 0,05 U/ml.

	DMSO	PPG 1 μM	PPG 3 μM	PPG 10 μM	PPG 30 μM
Aggregation	p=0,87	p=0,47	p=0,2	p=0,0002	p<0,0001
Anfangsgeschwindigkeit	p=0,379	p=0,823	p=0,625	p<0,0001	p<0,0001

4.4 Nachweis der Polo-Like-Kinase 1 in menschlichen Thrombozyten

Puropurogallin hemmt die Polo-Like-Kinase 1 (Lowery et al., 2005). Diese Kinase wurde bislang nicht in menschlichen Thrombozyten nachgewiesen. Abbildung 8 zeigt im (Immo)-Westernblot die Expression in humanen Thrombozyten als Doppelbande. Die angenommene apparente Molmasse von der PLK-1 beträgt 70 kDa und 74 kDa. Dabei zeigte sich, dass durch zunehmende Mengen an Gesamthrombozytenlysaten verstärkte Signale der Proteinmengen detektiert werden können. Damit konnte die Polo-Like-Kinase 1 erstmals in menschlichen Thrombozyten nachgewiesen werden (Abbildung 8, Spalten 1-4).

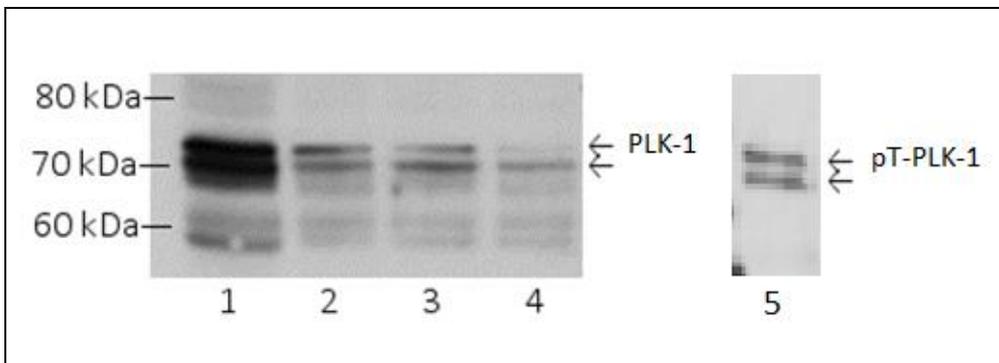


Abbildung 8: Detektion der Polo-Like-Kinase 1 in menschlichen Thrombozyten

Jeweils 25 μ l Lysate menschlicher gewaschener Thrombozyten unterschiedlicher Konzentration: 1= $1,5 \cdot 10^9$, 2= $1 \cdot 10^9$, 3= $0,75 \cdot 10^9$ und 4= $0,5 \cdot 10^9$ Thrombozyten/ml werden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch den monoklonalen Antikörper gegen die Polo-Like-Kinase 1 (1:500) im Westernblot detektiert. Spalte 5 zeigt die Phospho-PLK-1 in unstimulierten Thrombozyten ($5 \cdot 10^8$) detektiert durch einen polyklonalen Antikörper gegen Thr 210. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Der Index am linken Bildrand markiert apparente Molmassen standardisierter Proteine.

4.5 Einfluss von Purpurogallin auf die Aktivität der MAPKinasen in humanen Thrombozyten

4.5.1 Einfluss von Purpurogallin auf die MAPKinase pp38 in humanen Thrombozyten

Zur Frage nach den Ursachen der Aggregationshemmung von Thrombozyten durch Purpurogallin wurden die Aktivitäten der MAPKinasen untersucht. Wie bereits seit langem bekannt, kommt es durch Stimulation der Thrombozyten durch Thrombin, aber auch durch andere Agonisten zur Aktivierung der drei thrombozytären MAPKinasen (Adam et al., 2008). Zuerst wurde der Einfluß von Purpurogallin auf die MAPKinase p 38 untersucht.

Purpurogallin vermindert signifikant die Aktivität der MAPKinase p38 um 20 % ($80 \% \pm 21 \%$) ($n=5$). Eine nur geringe Aktivitätsminderung der p38 MAPK wurde mit Purpurogallin 10 μM um 7 % ($93 \% \pm 29\%$ $n=4$) und Purpurogallin 1 μM wird keine Hemmung erreicht (Abbildung 9).

Permethylpurpurogallin scheint eine deutlichere Hemmung der Aktivität der MAPK p38 herzurufen. Nach Vorinkubation mit 30 μM Permethylpurpurogallin konnte eine signifikante Verminderung der Aktivität auf 40 % (60 %) ($n=3$) erreicht werden. Das Ergebnis eines repräsentativen (Immuno)-WesternBlots mit entsprechender Loading-Kontrolle mittels Anti-RAN wird ebenfalls in Abbildung 9 gezeigt. Die Signifikanzniveaus der jeweiligen Messungen zeigt Tabelle 6.

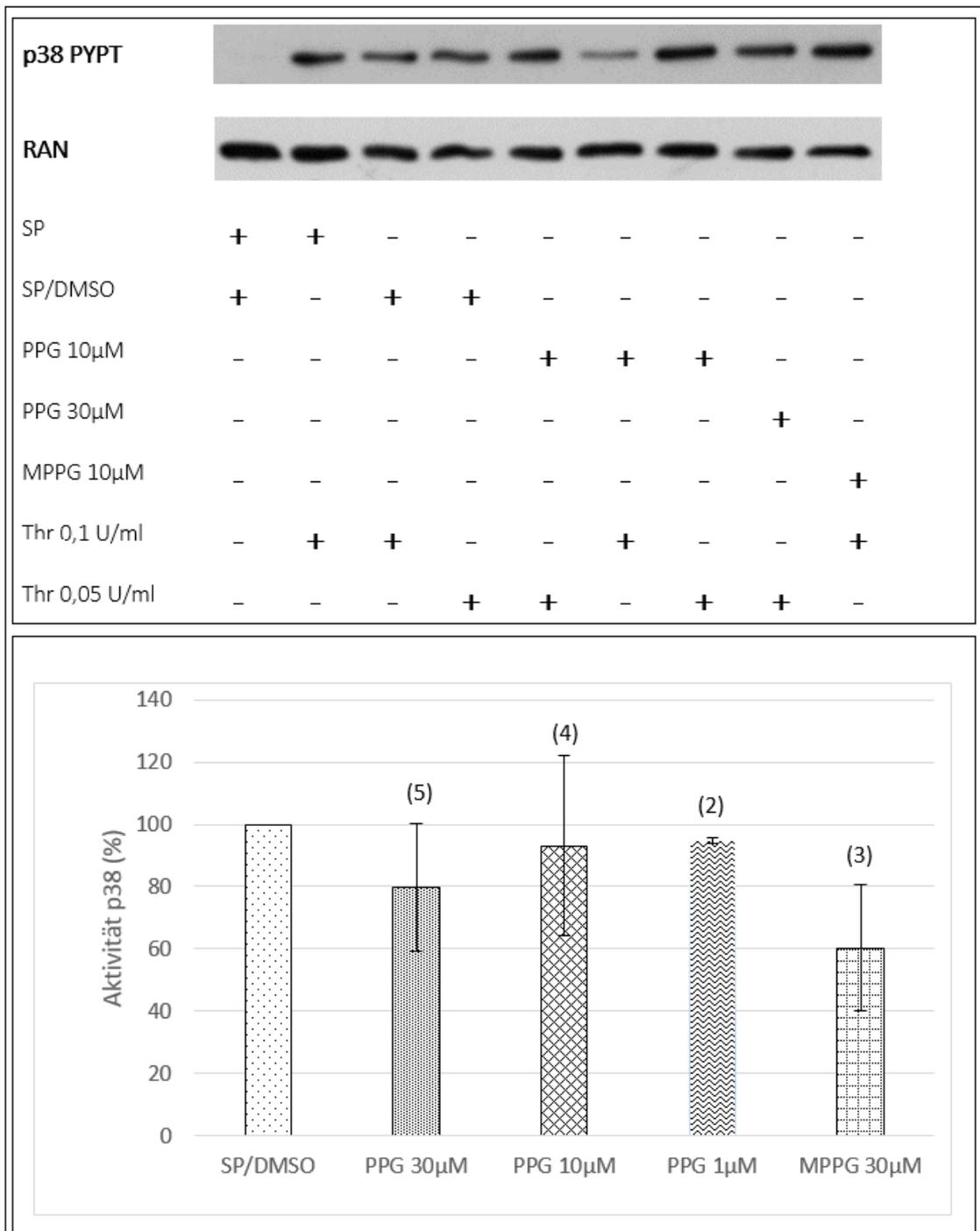


Abbildung 9: Aktivität der MAPKinase pp38 in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin

Gewaschene Thrombozyten ($5 \cdot 10^8$ /ml) werden bei 37 °C unter ständigem Rühren mit 0,1 % DMSO in Suspensionspuffer (SP/DMSO), Purpurogallin (PPG) und Permethylpurpurogallin (MPPG) unterschiedlicher Konzentration (1-30 µM) für zehn Minuten vorinkubiert und im Anschluß mit Thrombin (Thr) unterschiedlicher Konzentration stimuliert. Die Reaktion wird nach 90 Sekunden mit SDS-Probenpuffer gestoppt und mittels SDS-Page und anschließendem (Immuno)-Westernblot analysiert. Die Detektion von phospho-p38 erfolgte mit einem monoklonalem anti-phospho-p38 Antikörper, welcher die duale Phosphorylierung an Thr180 und Tyr182 erkennt. Die Quantifizierung erfolgte durch densitometrischen Auswertung.

Oben: Repräsentativer (Immuno)-Westernblot. Zum quantitativen Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen wurde in jeder Probe die relative Mengen des kleinen GTP-bindenden Proteins die RAN bestimmt (loading controll).

Unten: Quantitative Darstellung der Aktivität von pp38 nach Vorinkubation mit PPG und MPPG, Stimulation mit 0,05U/ml Thrombin, die Aktivität mit Suspensionspuffer/DMSO 0,1% wird als 100% Aktivität angesehen. Anzahl der Messungen in Klammern.

Tabelle 6: Signifikanztabelle zur Aktivität der MAPKinase pp38 in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin

Tabellarische Darstellung des Signifikanzniveaus der Aktivität der MAPKinase p38 zur Kontrolle mit SP und Thrombin 0,05U/ml.

	PPG 30 µM	PPG 10 µM	MPPG 30 µM
Thrombin 0,05U/ml	p=0,0352	p=0,749	p=0,3104

4.5.2 Einfluss des Purpurogallins auf die MAPKinase ERK in humanen Thrombozyten

Weiterhin wurde der Einfluss des Purpurogallins auf die MAPKinase ERK untersucht. Hier konnte anders als bei p38 ein konzentrationsabhängiger hemmender Einfluss des Purpurogallins auf die ERK Aktivität gefunden werden, der bei höheren Konzentrationen das Signifikanzniveau $p < 0,05$ erreichte (Tabelle). Nach Vorinkubation mit 30 µM Purpurogallin ist nur noch eine ERK-Aktivität von 22 % (n=4) nachweisbar. Auch nach Vorinkubation mit 10 µM Purpurogallin ist eine deutlich verminderte Aktivität von 9 % (n=4) nachweisbar. Bei 3 µM (85 %, n=2) und 1µM (98 %, n=3) sind diese hemmenden Effekte, ähnlich wie bei den Versuchen zur Aggregationsmessung, nicht mehr nachweisbar. Allerdings ist die Aktivität der MAPKinase ERK nach Vorinkubation mit 30 µM Permethylpurpurogallin im Gegensatz zur Aggregationsmessung vermindert und beträgt nur 48 % (n=3). Das Ergebnis eines repräsentativen WesternBlots der aufgetragenen Proteinmenge wird ebenfalls in Abbildung 10 gezeigt.

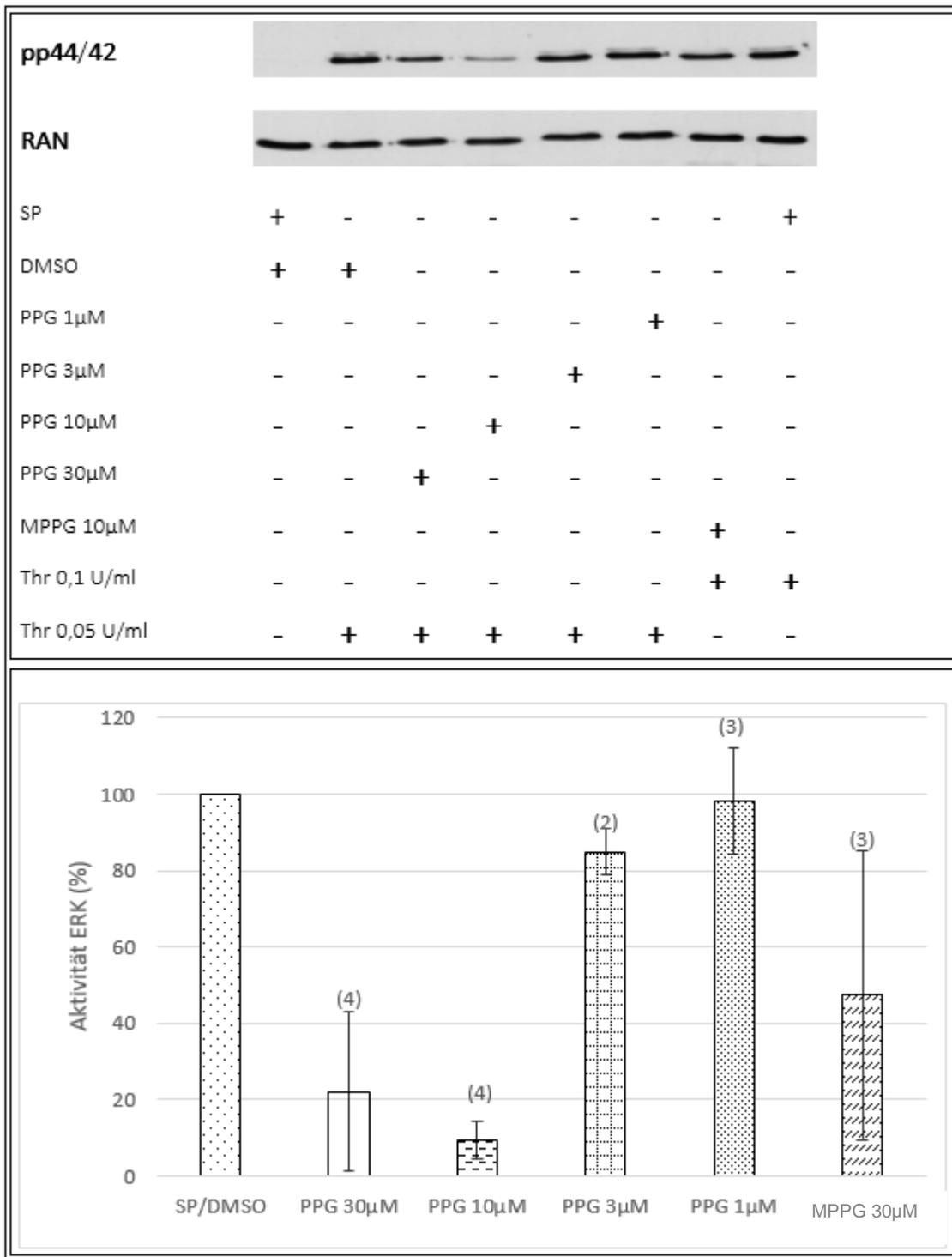


Abbildung 10: Aktivität der MAPKinase ERK (p42/44) in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin

Gewaschene Thrombozyten ($5 \cdot 10^8$ /ml) werden bei 37°C unter ständigem Rühren mit Purpurogallin (PPG) und Permethylpurpurogallin (MPPG) unterschiedlicher Konzentration für zehn Minuten vorinkubiert und im Anschluß mit $0,05$ U/ml Thrombin stimuliert. Die Reaktion wird nach 90 Sekunden mit SDS-Probenpuffer gestoppt und mittels SDS-Page und anschließendem (Immuno)-Westernblot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem monoklonalem anti-pp42/44 Antikörper. Es erfolgte die densitometrischen Auswertung.

Oben: Repräsentativer (Immuno)-Westernblot. Zum quantitativen Vergleich der Proteinmengen wurde in jeder Proben die RAN-Mengen bestimmt (loading controll).
Unten: Quantitative Darstellung der Aktivität von pp38 nach Vorinkubation mit PPG und MPPG, Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin, die Aktivität mit Suspensionspuffer/DMSO 0,1 % wird als 100 % Aktivität angesehen. Anzahl der Messungen in Klammern.

Tabelle 7: Signifikanztabelle zur Aktivität der MAPKinase ERK (p42/44) in Thrombozyten unter Einfluss von Purpurogallin

Tabellarische Darstellung des Signifikanzniveaus der Aktivität der MAPKinase ERK zur Kontrolle mit SP/DMSO und Thrombin 0,05U/ml

	PPG 30 µM	PPG 10 µM	PPG 1 µM	MPPG 30 µM
Thrombin 0,05U/ml	p= 0,0049	p= 0,0001	p= 0,844	p=0,1386

4.6 Effekte verschiedener Agonisten und Antagonisten auf die Phosphorylierung der PLK-1

Da mehrfach in der Literatur beschrieben wurde, dass Purpurogallin die Polo-Like-Kinase-1 hemmt (Liao et al., 2010; Murugan et al., 2011), sollte unter Zuhilfenahme weiterer Agonisten und Antagonisten untersucht werden, ob PLK-1 als Phosphoprotein vorkommt und eine Phosphorylierung bei der Thrombozytenaktivierung verändert wird.

Die Thrombozyten werden mit 30 µM Purpurogallin oder 1 µM S1197, einem nicht peptidischen RGD-Mimetikum, oder einer Kombination aus beiden vorinkubiert und anschließend mit Thrombin 0,05 U/ml, in Ab- oder Anwesenheit von Adrenalin, stimuliert. In allen untersuchten Proben konnte eine Phosphorylierung der PLK-1 an Threonin-210 im T-Loop unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen werden; in Abbildung 8, Spalte 5 wird die Phospho-PLK-1 in unstimulierten Thrombozyten gezeigt. Es sollte weiter untersucht werden, ob sich der Phosphorylierungsgrad der PLK-1 bei Verhinderung der Aggregation durch Blockierung der Fibrinogenbindungsstelle ändert, um Aufschlüsse über die Signalübertragung ins Zellinnere, über das *Outside-in*-Signaling geben. Ebenso sollte getestet werden, ob durch Stimulation des α_{2a} -Adrenozeptors mit Adrenalin eine positive Verstärkung der Aggregation und damit ggf. eine Änderung der Phosphorylierung erreicht werden kann. Leider erbrachten diese Untersuchungen, wohl aufgrund der unterschiedlichen Antikörperchargen, sehr gegensätzliche Ergebnisse, so dass keine stringente Auswertung möglich war und wir aus diesem Grunde keine valide Aussage zum Phosphorylierungsgrad der Kinase unter diesen modifizierenden Bedingungen treffen konnten.

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen von verschiedenen Naturstoffen auf eine antiaggregatorische Funktion

Aufgrund steigender Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen nimmt der Stellenwert von antiaggregatorisch-wirksamen Medikamenten auf dem pharmakologischen Markt stetig zu. Da diese Medikamente auch mit einer Reihe von unerwünschten Wirkungen vergesellschaftet sind, wird ständig nach neuen Möglichkeiten der Thrombozytenaggregationshemmung geforscht. Zu den bislang häufig genutzten Thrombozytenaggregationshemmern zählen Acetylsalicylsäure (ASS), die Thiopyridine Clopidogrel und Prasugrel, Ticagrelor sowie Abciximab oder Tirofiban. Während ASS die Cyclooxygenase hemmt und dadurch die Produktion von Thromboxan A_2 vermindert wird, wird durch Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor der ADP-Rezeptor P2Y₁₂ blockiert und somit das G_i-Signal verhindert. Abciximab hingegen gehört zu der Gruppe von monoklonalen Antikörpern, welcher gegen den Fibrinogen- Rezeptor G_{IIb}-III_a gerichtet ist und somit die Bindung von Fibrinogen verhindert. Tirofiban ist ein reversibler nicht-peptischer Antagonist am G_{IIb}-III_a-Rezeptor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 79 Naturstoffe auf ihre antiaggregatorischen Funktionen untersucht. Darunter war mit Puropurogallin, ein natürlich vorkommendes Phenol, lediglich eine Substanz, welche die Aggregation hemmte.

Jedoch sollte erwähnt werden, dass bei dem Screening der Naturstoffe die Möglichkeit bestand, einen antiaggregatorisch-wirksamen Naturstoff nicht erfasst zu haben, da in den Experimenten zu Beginn jede Substanz mit nur einer Konzentration (10 μ M) getestet wurde. Des Weiteren wurde auch nur eine einzige Thrombinkonzentration von 0,1 U/ml verwendet, da bei dieser Konzentration des Agonisten die Thrombozytenantwort sehr konstant ist, obwohl zur Detektion einer Hemmung der Aggregation niedrigere Konzentrationen von Thrombin geeigneter erscheinen. Darüber hinaus ist anzumerken, dass verschiedene Ursachen, wie spenderabhängige Faktoren dazu geführt haben können, dass eine Aggregationshemmung bei einer einmaligen Messung nicht gesehen wurde. Um eine sichere Aussage über eine hemmende Funktion des getesteten Naturstoffes machen zu können, sind sicherlich mehrmalige Messungen, auch mit höheren Konzentrationen eines möglichen Inhibitors notwendig, selbst wenn dabei auch unspezifische Effekte falsch positive Ergebnisse liefern sollten. Ebenso ist eine Variation der Thrombinkonzentration sinnvoll, um das System empfindlicher zu machen.

Da die Stimulation der Thrombozyten immer mit Thrombin durchgeführt wurde, werden Signalwege, die nicht durch Thrombin aktiviert werden, bei diesen Experimenten außer Acht gelassen. Sollte ein Naturstoff isoliert einen bestimmten Signalweg inhibieren, der durch Kollagen, ADP oder Thromboxan A₂ induziert wird, kann dieser bei unserem Screeningverfahren nicht oder nur unzureichend erfasst werden.

Ein weiterer Grund könnte bei den Substanzen selbst liegen. Die Naturstoffe wurden von Dr. Norbert Arnold, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung: Natur- und Wirkstoffchemie in Halle zur Verfügung gestellt. Verunreinigungen in den Substanzen könnten sowohl eine Aggregationshemmung vortäuschen als auch eine Hemmung verhindern. Da jedoch die Reinheit der Substanzen mittels Massenspektrographie nachgewiesen wurde, ist eine Verunreinigung als Fehlerquelle vernachlässigbar.

5.2 Einfluss der Purpurogallins auf die Thrombozytenaggregation

Purpurogallin ist ein Naturstoff, welcher aus dem Gallapfel der Weißbeiche isoliert werden kann. Es wurden bereits verschiedene Wirkungen auf Proteine und zellbiologische Funktionen beschrieben. So konnte eine hemmende Wirkung auf verschiedene Enzyme wie der Glutathione-S-Transferase, Xanthinoxidase (Harnsäurebildung) und Catechol-O-Methyltransferase (Katecholamin-Abbau) gezeigt werden (Inmori et al., 1997). Außerdem konnten Einflüsse auf Tyrosin-spezifische Proteinkinasen, HIV-1-Integrase und Propyl-Endopeptidasen nachgewiesen werden (Murugan et al., 2011). Weiterhin wurde eine Interaktion mit der Polo-Like-Kinase 1 beschrieben.

Die Arbeitsgruppe von Liao aus Südkorea (Liao et al., 2010) untersuchte den Einfluss von PPG auf die PLK-1 und konnte zeigen, dass der Sequenzabschnitt zwischen der Polo-Box-1 und der Polo-Box-2 am C-Terminus der Polo-Like Kinase 1 als Phosphopeptid-Bindungsdomäne fungiert, welche verschiedene Proteine phosphoryliert, unter anderem auch das PBIB1-Protein (T-78) des Zentromers (Park et al., 2010). Diese Bindung von Phosphopeptiden ist sowohl notwendig für die subzelluläre Lokalisation der Polo-Like Kinase 1 als auch für die Bindung (targeting) der PLK-1 an ihre Substrate (Watanabe et al., 2008). Liao et. al. (2010) hatten nun mit ELISA-basierten Experimenten eine Phosphorylierung an Threonin-78 gefunden, die durch Zugabe von Purpurogallin inhibiert wird.

Interessanterweise geht das Fehlen der 4-Hydroxyl-Gruppe mit einem Wirkungsverlust des Purpurogallins einher. Vermutlich liegt dies an Interaktionen zwischen der negativen

Ladung der Hydroxyl-Gruppe und der positiven Ladung von His 538 der Polo-Box-Domain (Murugan et al., 2011; Watanabe et al., 2008).

Einflüsse auf die Thrombozytenfunktion des Purpurogallins sind bei Beginn dieser Arbeit nicht bekannt gewesen. Eine kürzlich erschienene Publikation der Arbeitsgruppe Ku von Juli 2014 zeigt einen hemmenden Effekt des Purpurogallins auf die Thrombozytenaggregation (Ku et. al., 2014). Allerdings liegt das Hauptaugenmerk dieser Publikation auf der plasmatischen Gerinnung; antiaggregatorische Eigenschaften werden nur kurz und rein phänomenologisch behandelt. Weiterhin ist zu erwähnen, dass PPG-Konzentrationen zwischen 0 und 250 μM (0-50 $\mu\text{g/ml}$) benutzt wurden, während in unseren Versuchen eine maximale PPG-Konzentration 30 μM verwendet wurde. Die Thrombinkonzentration (3 U/ml) ist 30-fach höher als in unseren Versuchen, so dass eine Vergleichbarkeit kaum möglich ist. Neben der Aggregation wurde ebenso die Fibrinpolymerisation als auch das Zellüberleben untersucht. Bei den Untersuchungen zur Fibrinpolymerisation wurde die Änderung der optischen Dichte mittels Spektrophotometer nach Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin in einer Endkonzentration von 0,5 U/ml erfasst. Hier zeigte sich ebenso eine Hemmung auf etwa 50% im Vergleich zur Kontrolle. Das Zellüberleben betreffend kann kein Effekt des Purpurogallins nachgewiesen werden. Die HUVEC-Zellen (humane umbilicale venöse Endothelzellen) wurden mit Purpurogallin in Konzentrationen bis zu 0,5 mM (100 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert, einer über 16-fach höheren Konzentration als in unseren Versuchen. Pharmakologisch wirksame Konzentrationen liegen jedoch häufig im unteren μM - oder nM-Bereich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Purpurogallin auf die Thrombozytenaggregation systematisch untersucht. Wie bereits aufgeführt, führt eine Vorinkubation mit 30 μM Purpurogallin und einer Stimulation mit 0,05 U/ml Thrombin zu einer verminderten Aggregation auf $36 \% \pm 23 \%$ (Abbildung 6). Es zeigt sich also eine konzentrationsabhängige Hemmung durch Purpurogallin: Verringert man die Konzentration des Purpurogallins bei gleichbleibender Thrombinkonzentration, so wird auch wieder eine stärkere Aggregation beobachtet.

Konzentrationsabhängig Effekte von Purpurogallin konnten auch in anderen Arbeiten zu Purpurogallin gezeigt werden, jedoch nicht mit Thromozyten. In der Arbeitsgruppe von Kim et al. (2011) wurde der Einfluss von Purpurogallin auf eine Lipopolysaccharid (LPS)-vermittelte Inflammation in humanen Zellen getestet. Hierzu wurden HUVECs (humane umbilicale venöse Endothelzellen) mit Purpurogallin unterschiedlicher Konzentration von

2,5-250 μM (0,5-50 $\mu\text{g/ml}$) für sechs Stunden vorinkubiert und anschließend mit LPS 100 ng/ml für vier Stunden inkubiert. Dabei konnte zum einen die Hyperpermeabilität der Zellen, wie sie durch LPS typisch ist, verringert werden, zum anderen wurden deutlich weniger CAMs (cell adhesion molecule) exprimiert. Das betrifft sowohl VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) und auch E-Selectin. Auch konnte ein hemmender Effekt auf die transendotheliale Migration und die Adhäsion durch Purpurogallin nachgewiesen werden. Weiterhin wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die NF- κ B-Aktivierung und die Produktion von TNF- α beeinflusst wurden. Es hat sich gezeigt, dass sowohl die NF- κ B-Aktivierung als auch die TNF- α Produktion durch Vorinkubation mit Purpurogallin in unterschiedlichen Konzentrationen in Zellen mit LPS-vermittelter Inflammation möglich ist.

Eine weitere Arbeitsgruppe (Wu et al., 1996) hat den Einflüssen von Purpurogallin auf unterschiedliche humane Zellen untersucht. Es wurden Myozyten des linken Ventrikels, Endothelzellen aus der Vena saphena und Erythrozyten von Ratten und Kaninchen auf die antioxidative Aktivität von Purpurogallin hin getestet, welche mit XO-HP, Menadione (nicht-enzymatischer Generator von Superoxid-Radikalen) und Paraquat (Hydroxyl- und Peroxylradikal-Generator) behandelt wurden. Auch hier zeigte sich wiederum ein konzentrationsabhängiger Effekt.

Ähnlich verhält es sich mit Endothelzellen aus dem venösen Stromgebiet. Nach Behandlung mit Menadione und Purpurogallin kommt es zu einer zunehmenden Verzögerung der Nekrose bei ansteigenden Purpurogallinkonzentrationen.

In unseren Untersuchungen war bei der höchsten Konzentrationen (30 μM) nur noch eine minimale Aggregation (36 %) messbar. Je höher die Konzentration des Purpurogallin, desto ausgeprägter die Hemmung der Aggregation (Abbildung 6). Aufgrund dieser Abhängigkeit ist eine unspezifische Wirkung des Purpurogallin unwahrscheinlich und ist die Hemmung als echter Effekt zu werten. Der IC_{50} -Wert liegt bei unseren Versuchen mit 0,05 U/ml Thrombin bei 7 μM Purpurogallin.

Weiterhin wurde auch das methylierte Derivat Permethylpurpurogallin untersucht. Hier zeigte sich, dass diese Substanz keinen Effekt auf die Aggregation (Abbildung 6) und einen mäßigen hemmenden Effekt auf die mitogen-aktivierten Kinasen p38 und ERK. (Abbildung 9 und Abbildung 10) hat. Die letztgenannte Arbeitsgruppe von Wu hat ebenfalls Permethylpurpurogallin benutzt (Wu et. al., 1996). Dabei wurde mit einem thermisch aktivierten Azo-Initiator die Lyse von Erythrozyten bestimmt. Purpurogallin zeigt hier einen ausgeprägten protektiven Effekt (IC_{50} = 100 μM), Permethylpurpurogallin hingegen einen abgeschwächteren Effekt (IC_{50} = 200 μM). Der IC_{50} Wert liegt bei unseren

Versuchen bei gerademal 7 μM , also einer deutlich geringeren Konzentration. Im weiteren Vergleich nutzt diese Arbeitsgruppe auch eine deutlich höhere Konzentration von 100 bzw 200 μM , während wie bereits erwähnt, in unseren Versuchen eine die Höchstkonzentration 30 μM verwendet betrug.

5.3 Einfluß der Thrombinkonzentration auf die Aggregationshemmung durch Purpurogallin

Wir konnten zeigen, dass das Ausmaß der Aggregationshemmung durch Purpurogallin abhängig von der Thrombinkonzentration ist. Bei der niedrigsten von uns getesteten Konzentration des Thrombins von 0,05 U/ml erreichen wir die größte Hemmung der Aggregation (Abbildung 5); mit der höchsten Konzentration von 0,3 U/ml Thrombin konnte keine Aggregationshemmung durch Purpurogallin nachgewiesen werden.

Die Arbeitsgruppe Ku (Ku et al., 2014) hat sich ebenfalls mit dieser Thematik auseinander gesetzt und im Juli 2014 Daten, wenn auch sehr spärliche, dazu veröffentlicht. In der Arbeit wurden jedoch, wie bereits erwähnt, Mäusethrombozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Purpurogallin (0-50 $\mu\text{g/ml}$) für 3 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 3 U/ml Thrombin stimuliert. Die Hemmung der Aggregation bei 50 $\mu\text{g/ml}$ (250 μM) Purpurogallin betrug 50 %. In unserer Arbeit wurden humane Thrombozyten untersucht und mit deutlich geringere Konzentration von 1-30 μM Purpurogallin behandelt, um die Wahrscheinlichkeit von möglichen unspezifische Wirkungen die von chemischen oder physikalischen Eigenschaften der Substanz herrühren könnten, möglichst gering zu halten. Auch wurden die Thrombozyten mit Thrombin unterschiedlicher Konzentrationen stimuliert (Abbildung 5). Ku et. al. 2014 verwendet lediglich eine einzige, sehr hohe Konzentration an Thrombin (3 U/ml), um Mäusethrombozyten zu stimulieren. Dabei wurde eine Aggregationshemmung von etwa 50 % nur mit einer extrem hohen Konzentration von PPG erreicht. Im Rahmen unserer Arbeit mit menschlichen Thrombozyten zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmempfindlichkeit des Systems abhängig von der Thrombinkonzentration. Die größte Hemmung der Aggregation und damit auch die stärkste Empfindlichkeit gegenüber niedrigen PPG-Konzentrationen wurde mit der niedrigen Thrombinkonzentration von 0,05 U/ml erreicht (Abbildung 5). Bei einer Konzentration von 0,3U/ml, also einer 10fach geringeren Konzentration als bei Ku et. al. konnte keine Aggregationshemmung mehr nachgewiesen werden. Diese Unterschiede könnten auf

die unterschiedlichen Thrombozyten, humane und murine Thrombozyten, zurückzuführen sein und könnte von der unterschiedlichen Expression der Thrombin-Rezeptoren-Subtypen herrühren.

Während beim Menschen die PAR-1 und PAR-4 exprimiert werden, ist der PAR-1 bei den Mäusen nicht nachzuweisen, jedoch PAR-3 und PAR-4. (Swieringa et al., 2014).

Beim Menschen wird PAR-1 als funktionell wichtigster Rezeptor angesehen: PAR-1 spricht auch schon auf sehr niedrige Konzentrationen von Thrombin an. PAR-4 hingegen wird erst bei hohen Konzentrationen aktiv, sorgt nach Aktivierung allerdings für einen länger anhaltenden Effekt (Tello-Montoliu et al., 2010): 150-300fache höhere Konzentrationen sind notwendig um ein entsprechendes Signal zu induzieren. Sowohl PAR-1 als auch PAR-4 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. PAR-1 und PAR-4 sind an Gq und G12/13 gekoppelt. PAR-3 aus den Mäusethrombozyten ist nicht an G-Protein gekoppelt (De Candia, 2011). PAR-3 kann als eine Art Co-Rezeptor von PAR-4 angesehen werden. (Nakanishi-Matsu et al., 2000; Weiss et al., 2002). Durch PAR-3 wird Thrombin an PAR-4 präsentiert, was zu einer beschleunigten Thrombozytenaktivierung durch gesteigerte Spaltung des N-Terminus von PAR-4 führt (Clemetson, 2012). So kann auch bei niedrigen Thrombinkonzentrationen in Mäusethrombozyten eine Aggregation ausgelöst werden (Weiss et al., 2002).

Aus diesem Grund ist eine direkt Vergleichbarkeit von humanen und murinen Thrombozyten, insbesondere die verwendeten Thrombinkonzentrationen betreffend, nicht möglich. Dies kann sicherlich auch ein Grund für die vergleichsweise hohe Thrombinkonzentration der Arbeitsgruppe Ku et. al (2014) sein.

5.4 Nachweis der Polo-Like Kinase 1 in humanen Thrombozyten

Wie oben bereits erwähnt, hemmt Purpurogallin die Polo-Like-Kinase 1. So lang es nahe, Thrombozyten auf das Vorhandensein der PLK-1 hin zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass die PLK-1 auch in Thrombozyten exprimiert wird (Abbildung 8, Spalten 1-4). Damit war erstmals der Nachweis dieser Kinase in menschlichen Thrombozyten gelungen. Dieses ist in Bezug auf den bisherigen Kenntnisstand zu Funktion und Vorkommen der PLK-1 besonders interessant, da diese Kinase bislang hauptsächlich in Zusammenhang mit Vorgängen bei der Proliferation und Mitose gebracht wird. So wurde bereits nachgewiesen, dass die Polo-Like Kinase 1 durch Aktivierung von Proteinen wie Cyclin B oder Cdc25c die Cdk1 aktiviert und somit die Zellen in die Mitose eintreten.

Aber auch während der Mitose hat die PLK-1 zahlreiche Aufgaben und ist unter anderem maßgeblich an der Spindelbildung durch Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine beteiligt (Liu et al., 2010; Zitouni et al., 2014). Da der Nachweis auch in den anukleären Thrombozyten gelungen ist, scheint die PLK-1 weitere Aufgaben, unabhängig von Mitose und Proliferation zu besitzen.

Weiterhin ist die PKL-1 an der Trennung der Geschwisterchromatiden als auch bei Austritt aus der Mitose beteiligt, indem es wieder verschiedene Proteine phosphoryliert, und somit unter anderem den APC (Anaphase-promoting-Komplex) aktiviert (Archambault & Glover, 2009).

Bei Betrachtung dieser Funktionen ist es wenig verwunderlich, dass die PLK-1 in vielen Tumoren hoch exprimiert wird und sogar ein Hinweis auf die Aggressivität des Tumors sein kann. In vielen humanen Tumorentitäten konnte eine Überexpression der Polo-Like-Kinase 1 nachgewiesen werden, wie z.B. in nichtkleinzelligem Lungenkarzinom, Ösophaguskarzinom, Karzinomen sowohl von Brust, Ovarien als auch Endometrium, aber auch beim kolorektalen Karzinom, Prostatakarzinom oder Pankreaskarzinom (Eckerdt et al., 2005).

Umso mehr wirft der Nachweis in den kernlosen Thrombozyten die Frage nach der Funktion auf. In den Versuchen zum Nachweis der PLK-1 wurden unstimulierte Thrombozyten in unterschiedlicher Konzentration mittels Elektrophorese und Western Blot untersucht. Hier zeigte sich allerdings eine Doppelbande, welche zuvor durch den Hersteller nicht beschrieben war. Dieses Phänomen scheint als am ehesten plättchenspezifisch zu sein, da es auch auf verschiedenen Chargen des Antikörpers zutrifft. Mögliche Ursachen der bislang nicht beschriebenen Doppelbande könnten z. B. verschiedene Isoformen, Spleißvarianten der PLK-1 oder unterschiedliche posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, welche die apparente Molmasse bei der Gelelektrophorese beeinflussen wären denkbar.

5.5 Effekte des Purpurogallins auf die Aktivität von MAPKinasen

Die MAPKinasen spielen eine wichtige Rolle in den Thrombozyten und sind sowohl bei der Aktivierung, der Adhäsion, dem Spreizen als auch an der Aggregation beteiligt (Mazharian et al., 2007; Adam et al., 2008). Ebenso wichtige Aufgaben sind z.B. bei der Freisetzung von Arachidonsäure oder der Aktivierung der Phospholipase A2 durch Phosphorylierung (Chen et al., 2001). Die direkten Funktionen der MAPKinasen in

Thrombozyten sind jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt. In humanen Thrombozyten sind bislang p38, ERK und JNK beschrieben. Zahlreiche Stimuli wie Thrombin oder Kollagen aktivieren, über verschiedene Zwischenschritte, die MAPKinasen. Nach Stimulierung der Thrombozyten werden die MAPKinasen durch stromaufwärts gelegene Kinasen an zwei, durch eine Aminosäure getrennte Aminosäuren phosphoryliert und somit aktiviert. Jetzt können weitere Proteine durch Phosphorylierung aktiviert werden (Adam et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einflüsse von Purpurogallin auf p38 als auch auf ERK untersucht. Untersuchungen zu JNK wurden nicht durchgeführt, da der JNK-spezifisch Antikörper nur sehr unspezifische, chargenabhängige Ergebnisse bringt. Es hat sich gezeigt, dass es durch Vorinkubation mit Purpurogallin in Thrombin-stimulierten Thrombozyten zu einer verminderten Phosphorylierung und damit zu einer verminderten, jedoch nicht signifikanten Aktivierung der MAPK p38 führt (Abbildung 9). Eine deutlich stärkere und signifikante Hemmwirkung hat das Purpurogallin auf die Aktivierung von ERK (Abbildung 10). So wird nach Vorinkubation mit 30µM Purpurogallin eine Aktivität der p38 von 79 % erreicht jedoch nur 22 % der ERK-Aktivität. Erstaunlicherweise zeigt sich nach Vorinkubation mit Permethylypurpurogallin, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Aggregationsmessung, eine deutliche Hemmung der Aktivität auf 60% bei p38 und auf 22% bei ERK (Abbildung 9 und Abbildung 10).

Durch die Stimulation mit Thrombin wird primär ein Gq-Signal aktiviert. Durch dieses Signal wiederum werden MAPKinasen aktiviert und weitere Proteine „downstream“ phosphoryliert und im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus die Signalwirkung verstärkt. Dies trifft für ERK insbesondere auf den P2Y12-Rezeptor zu (Fälker et al., 2004; Coughlin 2005). Im p38 Signalweg wird unter anderem die zytosolische Phospholipase A₂ aktiviert, was zu einer erhöhten Produktion und Ausschüttung von Thromboxan A₂ führt und dadurch wiederum zur Thrombozytenaggregation führt (Kramer et al., 1996).

Weiterhin ist durch kürzlich veröffentlichte Publikation bekannt geworden, das p38 eine entscheidende Rolle in der Sekretion der α-Granula spielt. So zeigte die Arbeitsgruppe Liu (Liu et. al., 2014) dass durch Stimulation von Thrombozyten mit 0,5 U/ml Thrombin die Aktivität von p38 steigt, sich diese jedoch durch Vorinkubation mit Ginkgolide vermindert. Ebenso kommt es zu einer verminderten Ausschüttung von Plättchen Faktor 4 als auch CD40L.

Da durch unsere Untersuchungen erstmals die Polo-like Kinase 1 in Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, sind bislang keine Zusammenhänge den MAPKinasen

und der Polo-Like Kinase 1 in humanen Thrombozyten beschrieben worden. Allerdings wurden Zusammenhänge zwischen den MAPKinasen und der Polo-Like Kinase 1 in mitotisch aktiven Zellen beschrieben. So wird vermutet, dass die MAPKinasen eine entscheidende Rolle bei der Priming-Phosphorylierung und damit bei der Aktivierung der PLK-1 spielen. Die MAPKinasen phosphorylieren ein Zielprotein der Polo-Box-Domain, damit die Polo-Box-Domain dieses binden kann (Lowery et al., 2005). Auch wurde gezeigt, dass die hemmenden Effekte des Purpurogallins am ehesten auf eine Hemmung der Polo-Box-Domain zurückzuführen sind (Murugan et al., 2011). Es kann also vermutet werden, dass wenn die PBD kein Protein binden kann, auch die MAPK evtl über einen negativen Feedback-Mechanismus in einem inaktivierten Zustand vorliegt. Dieses würde die verminderte Aktivität der MAPKinasen nach Vorinkubation mit Purpurogallin erklären. Ebenso kann man eine Verminderung der Aktivität der PLK-1 vermuten, was die These eines Zusammenhanges zwischen der PLK-1 und den MAPKinasen in menschlichen Thrombozyten stützen würde.

Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen der MAPKinase p38 und der Polo-Like Kinase 1 von der Arbeitsgruppe Kukkonen-Macchi (2011) in HeLa-Zellen beschrieben. Hier wurden verschiedene Experimente mit Zellen durchgeführt, in denen p38 nach Genmanipulation nicht mehr exprimiert wird. Es zeigt sich, dass in diesen Zellen die Menge der Polo-Like Kinase 1 im Bereich des Kinetochors und des Spindelapparates deutlich vermindert ist. Zusätzlich ist die Menge der zytosolischen PLK-1 massiv erhöht, so dass sich daraus schließen lässt, dass die MAPKinase p38 einen entscheidenden Einfluß auf die Lokalisation der PLK-1 hat (Kukkonen-Macchi et al., 2011). Wieweit diese Ergebnisse auf Thrombozyten übertragbar sind bleibt offen, doch deuten diese Daten in Zusammenhang mit unseren Ergebnissen darauf hin, dass der Signalweg der Polo-Like Kinase 1 eng mit dem der MAPKinasen verbunden ist.

5.6 Phosphorylierung der Polo-Like Kinase 1 in humanen Thrombozyten

Die Polo-Like-Kinase 1 wird in menschlichen Zellen durch Phosphorylierung aktiviert. Hierzu ist, nach dem Priming, eine Phosphorylierung im T-Loop (Thr-210) der Kinase-Domäne notwendig. In unseren Untersuchungen wurden Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten behandelt und im Anschluss der Phosphorylierungsgrad der PLK-1 an Thr-210 detektiert. Es hat sich gezeigt, dass auch

in Thrombozyten unterschiedlich starke Phosphorylierungen detektiert werden konnten. In wie weit das Ausmaß abhängig von der Thrombozytenfunktion ist, war nicht zu klären. Jedoch scheinen die MAPKinasen eine wichtige Rolle beim Priming der PLK-1 zu spielen. Werden die MAPKinasen gehemmt, z.B. durch Purpurogallin sollte eine verminderte Priming-Phosphorylierung stattfinden. Somit kann die PLK-1 nicht phosphoryliert und aktiviert werden. Wenn man weiterhin davon ausgeht, dass durch Hemmung der Thrombozytenfunktion, z. B. durch Purpurogallin der Phosphorylierungsgrad der PLK-1 abnimmt, kann man aufgrund unserer Ergebnisse vermuten, dass es weitere gemeinsame intrazelluläre Wege von der PLK-1 und den MAPKinasen, insbesondere von ERK gibt. In der Literatur wird bereits vermutet, dass die MAPKinasen Substrate der PLK-1 phosphorylieren, um diese damit in der Nähe der PLK-1 zu lokalisieren. Kommt es jedoch zu einer Blockierung dieser Vorgänge sind sowohl MAPKinasen als auch die PLK-1 in ihre Aktivität gehemmt.

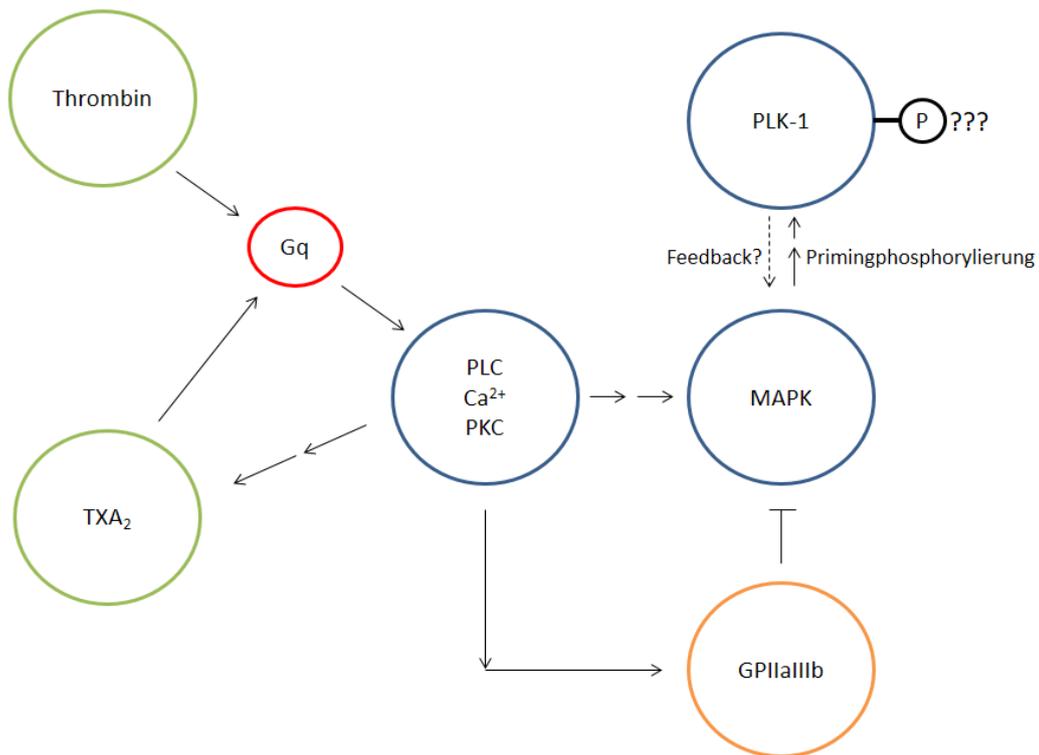


Abbildung 11: Schematische Darstellung intrazelluläre Signalkaskaden in menschlichen Thrombozyten

Humane Thrombozyten wurden durch Thrombin oder Thromboxan A_2 stimuliert. Nachfolgend kommt es durch ein Gq-Signal zur Aktivierung der MAPKinasen. Diese wiederum spielen eine Rolle bei der Priming-Phosphorylierung der PLK-1. Feed-Back-Schleifen dieser beiden Kinasen sind denkbar. Dargestellt ist ebenfalls der Zusammenhang zwischen dem Fibrinogen-Rezeptor GPIIb/IIIa und den MAPKinasen als *outside-in signaling*.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt, um neue Möglichkeiten der Thrombozytenaggregationshemmung zu finden. Hierzu wurden Naturstoffe unterschiedlichen Ursprungs auf ihre Wirkung auf die Thrombozyten untersucht.

Es hat sich gezeigt, dass der Naturstoff Purpurogallin einen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation hat. Dabei ist die Aggregationshemmung sowohl abhängig von der Thrombinkonzentration als auch von der Purpurogallinkonzentration. So zeigte sich, dass mit hoher Purpurogallinkonzentration und niedriger Thrombinkonzentration die stärkste Aggregationshemmung. Eine Hemmung konnte mit der methylierten Form des Purpurogallins, dem Permethylypurpurogallin nicht nachgewiesen werden.

Da die Literaturrecherche ergeben hat, dass Purpurogallin die Polo-like Kinase 1 hemmt, wurden Thrombozyten auf dieses Protein hin untersucht. Es ist gelungen, erstmalig, die Polo-like Kinase 1 in den nukleären Thrombozyten nachzuweisen.

Weitere Untersuchungen zu dieser Arbeit haben sich mit dem Mechanismus der Aggregationshemmung durch Purpurogallin beschäftigt. Hierzu wurden die Aktivitäten der MAPKinasen p38 und ERK untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass die Aktivität von ERK in Thrombozyten durch Purpurogallin signifikant gehemmt wird. Die MAPKinase p38 wird in ihrer Aktivität nur wenig gehemmt.

Da die MAPKinasen u. a. auch bei der Aktivierung der PLK-1 beteiligt sind, lag es nahe der Frage nachzugehen, ob Purpurogallin auch hemmenden Einfluß auf die PLK-1 hat. Es konnte nachgewiesen werden, dass die PLK-1 in menschlichen Thrombozyten in phosphorylierter Form vorliegt. Wie die Aktivität vom Phosphorylierungsgrad abhängig ist und welche genauen Funktionen der PLK-1 in Thrombozyten zugesprochen werden können, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, sollte jedoch Gegenstand weiterer Grundlagenforschung sein.

7 Literaturverzeichnis

- Abou-Karam, M., Shier, W.** (1999) Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention. Tyrosin-specific protein kinase inhibition by purpurogallin from *Quercus sp. nutgall.* *Phytotherapy Research*: 337-340.
- Adam, F., Kauskot, A., Rosa, J.-P., Bryckaert, M.** (2008) Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*: 2007-2016.
- Archambault, V., Glover, D. M.** (2009) Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Molecular cell biology*: 265-275.
- Archambault, V., Lépine, G.; Kachaner, D.** (2015) Understanding the Polo Kinase machine. *Oncogene*: 1-9.
- Chen, Zhu; Gibson, Tara Beers; Robinson, Fred; Silvestro, Loraine; Pearson, Gray; Xu, Bing-e; Wright, Angelique; Vanderbilt, Colleen; Cobb, Melanie H.** (2001) MAP Kinases. *Chemical Reviews*: 2449-2476.
- Cimmino, G., Golino, P.** (2013) Platelets Biology and Receptor Pathways. *Journal of Cardiovascular Translational Research*: 299-309.
- Clemetson, K. J.** (2012) Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosis Research*: 220-224.
- Cosemanns, J. M. E. M., Iserbyt, B. F., Deckmyn, H., Heemsker, J. W. M.** (2008) Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*: 1253–1261.
- Coughlin, S. R.** (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*: 1800-1814.
- Coughlin, S. R.** (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 11023-11027.
- De Candia, E.** (2011) Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thrombosis Research*: 250-256.
- de Souza Brito, F., Tricoci, P.** (2013) Novel Anti-platelet Agents: Focus on Thrombin Receptor Antagonists. *Journal of Cardiovascular Translational Research*: 415-424.
- Eckerdt, F., Yuan, J., Strebhardt, K.** (2005) Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene*: 267-276.

- Fälker, K., Lange, D., Presek, P.** (2004) ADP secretion and subsequent P2Y₁₂ receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets. *Thrombosis and Haemostasis*: 214-223.
- Floyd, C. N., Ferro, A.** (2012) The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary. *Journal of the Royal Society of Medicine Cardiovascular Disease*:1-13.
- Gawaz, M.** (2001) *Das Blutplättchen*. München: Georg Thieme Verlag.
- Geest, C. R., Coffey, P. J.** (2009) MAPK signaling pathways in the regulation of Hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*: 237-250.
- Goggs, R., Poole, A. W.** (2012) Platelet signaling-A primer. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*: 5-29.
- Grossi, V., Peserica, A., Tezil, T., Sinmone, C.** (2014) p38 MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World Journal of Gastroenterology*: 9744-9758.
- Hechler, B., Cattaneo, M. M., Gachet, M. P. C.** (2005) The P2 Receptors in Platelet Function. *Seminars in Thrombosis and Hemostases*:150-161.
- Inmori, Yoshihiko; Muro, Chikaaki; Sajima, Eiko; Katagiri, Motoharu; Okamoto, Yukiko; Tanaka, Hajime; Sakagami, Yoshikazu; Tsujibo, Hiroshi** (1997) Biological Activity of Purpurogallin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*: 890-892.
- Johnson, G. L., Lapadat, R.** (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*: 1191-1192.
- Kim, T. H., Ku, S.-K., Lee, I.-C., Bae, J.-S.** (2011) Anti-inflammatory functions of purpurogallin in LPS-activated. *BMB reports*: 200-205.
- Komosa, Anna; Lesiak, Maciej; Siniawski, Andrzej; Mularek-Kubzdela, Tatiana; Grajek, Stefan.** (2014) Significance of antiplatelet therapy in emergency myocardial infarction treatment: 32-35.
- Kramer, M. Ruth; Roberts, Edda F.; Um, Suzane L.; Börsch-Haubold, Angelika G.; Watson, Steve P.; Fisher, Matthew J.; Jakubowski, Joseph A.** (1996) p38 Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates Cytosolic Phospholipase A₂ (cPLA₂) in Thrombin-stimulated Platelets. *The Journal of Biological Chemistry*: 27723-27729.
- Kukkonen-Macchi, Anu; Sicora, Oana; Kaczynska, Katarzyna; Oetken-Lindholm, Christina; Pouwels, Jeroen; Laine, Leena; Kallio, Marko** (2011) Loss of p38 MAPK

induces pleiotropic mitotic defects and massive cell death. *Journal of Cell Science*: 216-227.

Ku, S.-K., Bae, J.-S. (2014). Antiplatelet and antithrombotic activities of purpurogallin in vitro and in vivo. *BMB Reports*: 376-381.

Laemmli U K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 680-685.

Lanza , Francois; Beretz, Alain; Stierle, Anita; Hanau, Daniel; Kubina, Martial; Cazenave, Jean-Pierre (1988) Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *The American Physiological Society*: 1276-1288.

Levy-Toledano, S. (1999) Platelet Signal Transduction Pathways: Could We Organize Them into a "Hierarchy"? *Haemostasis*: 4-15.

Liao, Chenzhong; Park, Jung-Eun; Bang, Jeong Kyu; Nicklaus, Marc C.; Lee, Kyung S. (2010) Exploring Potential Binding Modes of Small Drug-like Molecules to the Polo-Bx Domain of Human Polo-like Kinase 1. *ACS Medicinal Chemistry Letters*: 110-114.

Liu, X. S., Song, B., Liu, X. (2010) The substrates of Plk-1, beyond thr functions in mitosis. *Protein Cell*: 999-1010.

Liu, Xueqing; Yan, Yan; Bao, Li; Zhao, Yangyang; Qi, Ruomei (2014) Ginkgolide B inhibits platelet release by blocking Syk and p38 MAPK phosphorylation in thrombin-stimulated platelets. *Thrombosis Research*: 1066-1073.

Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., Du, X. (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*: 2341-2349.

Lowery, D. M., Lim, D., Yaffe, M. B. (2005) Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene*: 248-259.

Mazharian, A.; Roger , S.; Berrou , E.; Adam , F.; Kauskot , A.; Nurden , P.; Jandrot-Perrus , M.; Bryckaert , M. (2007) Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca²⁺ mobilization. *Journal of Biological Chemistry*: 5478-5487.

Monroe, D. M., Hoffmann, M., Roberts, H. R. (2002) Platelets and Thrombin Generation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*: 1381-1389.

Montalescot, G. (2011) PlateletsBiology and Implications for Antiplatelet Therapy in Artherothrombotic Disease. *Clinical and Applied Thromosis/Hemostasis*: 371-380.

Murugan, Ravichandran N.; Park, Jung-Eun; Kim, Eun-Hee; Shin, Song Yub; Cheong, Chaejoon; Lee, Kyung S; Bang, Jeong Kyu (2011) PI3K-Targeted Small Molecule Inhibitors: Molecular Basis for Their Potency and Specificity. *Molecules and Cells*: 209-220.

Nakanishi-Matsu, Mayumi; Zheng, Yao-Wu ; Sulciner, David J. ; Weiss, Ethan J. ; Ludeman, Matthew J. ; Coughlin, Shaun R. (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*: 609-613.

Nakano, S., Sakamoto, K., Takenobu, A., Kawashima, T. (2002) Flow-injection chemiluminescent determination of vanadium(IV) and total vanadium by means of catalysis on the periodate oxidation of purpurogallin. *Talanta*: 1263-1270.

Park, Jung-Eun; Song , Nak-Kyun; Johmura, Yoshikazu; Kang , Young H.; Liao, Chenzhong; Lee, Kyung H.; Park, Chi Hoon; Nicklaus, Marc C.; Lee, Kyung S. (2010) Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 1957-1970.

Pearson, Gray; Robinson, Fred; Gibson, Tara Beers; Xu, Bing-E; Karandikar, Mahesh; Berman, Kevin; Cobb, Melanie H. (2001) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*: 153-183.

Picker, S. M. (2013) Platelet Function in Ischemic Heart Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*: 166-174.

Pilgrim , T., Windecker, S. (2015) Antiplatelet therapy for secondary prevention of coronary artery disease. *Heart bpm*: 1750-1756.

Reininger, Armin J.; Heijnen, Harry F. G.; Schumann, Hannah; Specht, Hanno M.; Schramm, Wolfgang; Ruggeri, Zaverio M. (2006). Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*: 3537-3545.

Silva, M. V. F., Dusse, L. M. S., Vieira, L. M., Carvalho, M. d. G. (2013) Platelet Antiaggregants in Primary and Secondary Prevention of Atherothrombotic Events. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*: 78-84.

Swieringa, F., Kuijpers, M. J., Heemskerk, J., van der Meijden, P. E. (2014) Targeting platelet receptor function in thrombus formation: The risk of bleeding. *Blood Reviews*: 9-21.

Tello-Montoliu, A., Tomasello, S. D., Ueno, M., Angiolillo, D. J. (2010) Antiplatelet therapy: thrombin receptor antagonists. *British Journal of Clinical Pharmacology*: 658-671.

Watanabe, Nobumoto; Sekine, Tomoni; Takagi, Masatoshi; Iwasaki, Jun-Ichi; Imamoto, Naoko; Kawasaki, Hisshi; Osada, Hiroyuki (2008) Deficiency in Chromosome Congression by thr Inhibition of Plk1 Polo Box Domain-dependent Recognition. *Journal of Biological Chemistry*: 2344-2353.

Weiss, E. J., Hamilton, J. R., Lease, K. E., Coughlin, S. R. (2002) Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood*: 3240-3244.

Wu, Tai-Wing; Zeng, Ling-Hua; Wu, Jun; Fung, Kwok-Poi; Weisel, Richard; Hempel, Andrew; Camerman, Norman (1996) Molecular Structure and Antioxidant Specificity of Purpurogallin in Three Types of Human Cardiovascular Cells. *Biochemical Pharmacology*: 1073-1080.

Xu, J., Shen, C., Wang, T., Quan, J. (2013) Structural basis for the inhibition of Polo-like kinase 1. *Nature Structural and Molecular Biology*: 1047-1053.

Zitouni, Sihem ; Nabais, Catarina ; Jana, Swadhin Chandra; Guerrero, Adán ; Bettencourt-Dias, Mónica (2014) Polo-Like Kinases: structural variations lead to multiple functions. *Molecular Cell Biology*: 433-452.

Thesen

1. Von 79 getesteten Naturstoffen auf Pflanzen, Pilzen und Flechten konnte nur eine Substanz, das Pupurogallin, als Thrombozytenaggregationshemmstoff identifiziert werden.
2. Die Aggregation von isolierten humanen Thrombozyten lässt sich durch Vorinkubation mit Purpurogallin konzentrationsabhängig hemmen.
3. Das Ausmaß der Aggregationshemmung durch Purpurgallin ist abhängig von der Konzentration des Agonisten Thrombin.
4. Durch Methylierung der Hydroxylgruppen des Purpurogallins zu Permethylpurpurogallin geht der Effekt der Aggregationshemmung verloren.
5. In den kernlosen menschlichen Thrombozyten konnte erstmals die mitoseassoziierte Polo-like-Kinase 1 nachgewiesen werden, von der bekannt ist, dass sie von Pupurogallin gehemmt wird.
6. Purpurogallin führt zu einer signifikant verminderten Aktivität der MAPKinase ERK und p38, jedoch lässt sich bei der MAPKinase ERK eine deutlich stärkere Hemmung nachweisen.

Lebenslauf

Schulbildung:

- 1991-1995 Grundschule Lehndorf, Braunschweig
- 1995-1997 Orientierungstufe Lehndorf, Braunschweig
- 1997-2001 Realschule Maschstraße, Braunschweig
- 2001-2002 Einjährige Berufsfachschule Hauswirtschaft für Realschulabsolventen, Braunschweig
- 2002-2005 Fachgymnasium Gesundheit und Soziales, Schwerpunkt Ökotrophologie, Braunschweig
- 2005-2007 begonnene Ausbildung zur PTA Dr. von Morgenstern Schule, Braunschweig

Studium:

- 2007- 2013 Medizinstudium an der Universität Halle-Wittenberg

Promotion:

- 2010-2015 „Purpurogallin als Inhibitor der Thrombozytenaggregation: Untersuchungen zur Signaltransduktion “ angefertigt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Berufliche Tätigkeit:

- Seit 2014 Assistenzärztin an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation

**Purpurogallin als Inhibitor der Thrombozytenaggregation:
Untersuchungen zur Signaltransduktion**

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel
angefertigt zu haben.

Halle/ Saale im Oktober 2015

Rabea-Sophie Söffker

Erklärung über Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation

Purpurogallin als Inhibitor der Thrombozytenaggregation:

Untersuchungen zur Signaltransduktion

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

erstmalig einreiche.

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/ Saale im Oktober 2015

Rabea-Sophie Söffker

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit ergreifen, um mich bei all den Menschen zu bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Presek, der mich während des gesamten Zeitraumes beim Bearbeiten dieses interessanten Themas unterstützt hat, mir seine unermüdliche Unterstützung und Beratung angeboten hat und mir mit Rat und Tat zur stand.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Katrin Vogel für die Einarbeitung, die „Problemlösungen“ als auch die nette Zusammenarbeit im Labor. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Ursula Wolf, Frau Nadine Wäldchen und Frau Annika Jordan für die uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Norbert Arnold möchte ich für die Bereitstellung der Naturstoffe danken.

Besonders danken möchte ich auch meinen Freunden, welche jeder Zeit bereit waren mir in den frühen Morgenstunden etwas Blut zu spenden oder maßgeblich an der Korrektur dieser Arbeit beteiligt waren.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinem Bruder, Max Söffker bedanken, welcher mir nicht nur bei technischen Fragen unterstützend zur Seite stand, sondern auch immer ein offenes Ohr für mich hatte.