

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

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Sektion klinischen Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Peter Presek

**Einfluss von *Staphylococcus aureus* α -Toxin auf die Funktion und
Signaltransduktion humaner Thrombozyten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)
für das Fachgebiet Medizinische Pharmakologie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katrin Vogel

geboren am 25.07.1981 in Halle

Betreuer: Prof. Dr. Peter Presek

Gutachter: Prof. Dr. Oliver Thews

Prof. Dr. Artur-Aron Weber

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 03.07.2014

Datum der Verteidigung: 28.04.2015

Meiner Familie

Referat

Staphylococcus aureus ist ein häufiger Infektionserreger beim Menschen, der auch lebensbedrohliche Krankheiten auslösen kann. Dabei spielen auch Thrombozyten eine nicht unbedeutende Rolle.

Diese Arbeit hat zum Ziel, Wirkung und molekulare Mechanismen des porenbildenden α -Toxins (α -Hämolysin), einem wichtigen Virulenzfaktor, von *Staphylococcus aureus* bei der Thrombozytenaktivierung und -aggregation zu charakterisieren.

Seit 2010 ist bekannt, dass die membrangebundene Disintegrin-and-Metalloprotease 10 (ADAM10) als hochaffine Bindungsstelle für das Toxin in Epithelzellen dient. Dies konnten wir auch für Thrombozyten zeigen. Da in humanen Thrombozyten eine Deletion von ADAM10 nicht möglich ist, wurden Mäusethrombozyten untersucht. Die Bindung an ADAM10 könnte im Unterschied zu anderen Kalziumionophoren zur Aktivierung von Signalwegen führen, die zudem durch Assoziation von ADAM10, α -Toxin und Integrinen entstehen.

Alpha-Toxin bewirkt eine Aktivierung der Tyrosinkinase Src, der stressinduzierten MAPKinasen p38 und JNK1/2 und der Proteinkinase B. Bei der Proteintyrosinphosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen, konnte ein Phosphoprotein mit der apparenten Molmasse von 27kDa, als Apolipoprotein A1 identifiziert werden.

Src, die häufigste zelluläre Tyrosinkinase in Thrombozyten, stand dabei im Mittelpunkt unserer Untersuchungen. Nach Aktivierung der Thrombozyten durch α -Toxin wird Src durch die Kalzium-abhängige Protease Calpain degradiert und kann demnach durch Reduktion der Konzentration von extrazellulärem Kalzium oder durch den Calpaininhibitor Calpeptin gehemmt werden.

Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen wie PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib hemmen die α -Toxin-induzierte Aktivierung der stressinduzierten MAPKinasen p38 und JNK1/2 und die Tyrosinphosphorylierung. Der Tyrosinphosphorylierung einer Reihe von Proteinen folgt eine rasche, nahezu vollständige Dephosphorylierung. Durch die Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Natriumorthovanadat wird diese Dephosphorylierung verzögert, während Ciclosporin A die Phosphorylierung hemmt. Die Änderungen der Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung korrelieren unterschiedlich mit dem Aggregationsverlauf.

Die Daten dieser Arbeit leisten einen ersten wichtigen Beitrag zum Verständnis der Wirkungen von α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* auf gut charakterisierte Signalwege in humanen Thrombozyten; Möglichkeiten für eine pharmakologische Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch α -Toxin werden aufgezeigt.

Vogel, Katrin: Einfluss von *Staphylococcus aureus* α -Toxin auf die Funktion und Signaltransduktion humaner Thrombozyten. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV	
Tabellenverzeichnis	VI	
Tabellenverzeichnis	VI	
Abkürzungen	VII	
1. Einleitung.....	1	
1.1. Staphylococcus aureus α-Toxin	1	
1.2. Humane Thrombozyten	2	
1.3. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen in	humanen Thrombozyten	4
1.4. Src	5	
1.5. MAPKinasen	6	
2. Zielsetzung.....	7	
3. Material.....	8	
3.1. Chemikalien	8	
3.2. Agonisten	9	
3.3. Antagonisten und Inhibitoren	9	
3.4. Antikörper	10	
3.4.1. Primäre Antikörper	10	
3.4.2. Sekundäre Antikörper	10	
3.4.3. Antikörper für Durchflusszytometrie.....	10	
3.5. Geräte und Materialien.....	11	
4. Methoden	12	
4.1. Reinigung von humanen Thrombozyten	12	
4.2. Bestimmung der Zellzahl	13	
4.3. Aggregationsmessung.....	13	
4.4. Stimulation der Thrombozyten zur Proteinanalyse mit dem Immuno-Blot-	Verfahren (Western Blot)	13
4.5. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	14	
4.6. Elektrophoretischer Transfer zum immunochemischen Nachweis (Western	Blotting)	14
4.7. Durchflusszytometrie (FACS) mit humanen Thrombozyten	15	
4.8. Untersuchung mit Mäusestrombozyten (Kooperation mit Würzburg).....	16	
4.8.1 Isolierung von Mäusethrombozyten	16	
4.8.2. Aggregationsmessung der Mäusethrombozyten.....	17	
4.8.3. Durchflusszytometrie (FACS) mit Mäusethrombozyten	17	
4.9. Statistische Analyse	17	

5.	Ergebnisse.....	18
5.1.	Effekte von α-Toxin aus <i>Staphylococcus aureus</i> auf die Aggregation humaner Thrombozyten.....	18
5.2.	Einfluss von α-Toxin aus <i>Staphylococcus aureus</i> auf die GPIIbIIIa-Aktivierung humaner Thrombozyten	18
5.3.	Einfluss von α-Toxin aus <i>Staphylococcus aureus</i> auf die Freisetzung von α-Granula-inhaltsstoffen aus humanen Thrombozyten	19
5.4.	Rolle von ADAM10 bei der α-Toxin abhängigen Thrombozytenaktivierung.....	20
5.5.	Konzentrationsabhängige Effekte von α-Toxin auf die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung.....	23
5.6.	Vergleich der Effekte von α-Toxin und der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) auf die Proteintyrosinphosphorylierung	26
5.7.	Zeitabhängige Phosphorylierung von Proteinkinase B-Substraten	27
5.8.	Kalziumabhängige Effekte von α-Toxin auf die zelluläre Proteintyrosinkinase Src	28
5.9.	Effekte auf die Src-Autophosphorylierung	30
5.10.	Die Inhibierung von Calpain verhindert die Thrombozytenaggregation.....	31
5.11.	Modulation der α-Toxin-induzierten Thrombozytenaggregation.....	32
5.12.	Hemmung der α-Toxin-induzierten Autophosphorylierung von Src	34
5.13.	Effekte von α-Toxin auf die zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAPKinasen	36
5.14.	Beeinflussung der Aktivierung der MAPKinasen durch verschiedene Signalwege.....	37
5.15.	Phosphataseinhibitoren.....	41
5.16.	Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von p27 von der Familie der Src-Kinase	43
6.	Diskussion	49
6.1.	Einfluss von α-Toxin aus <i>Staphylococcus aureus</i> auf die Funktion von Thrombozyten	49
6.2.	Einfluss von α-Toxin auf die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen in humanen Thrombozyten	52
6.2.1.	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an	
	Tyrosinresten.....	52
6.2.2.	Einfluss von Calcimycin	53
6.2.3.	Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von	
	Serin-Threonin-Kinasen.....	54
6.2.4.	Wirkung von Phosphataseinhibitoren	55

6.3.	Bedeutung von Src für die Wirkung von α-Toxin	58
6.3.1.	Proteolytische Spaltung von Src und dessen Hemmung.....	58
6.3.2.	Einfluss von Src auf die Aggregation	59
6.3.3.	Autophosphorylierung von Src an Tyr-416	61
6.4.	Einfluss von Src auf die Phosphorylierung und	62
	Aktivierung weiterer Proteine	62
6.4.1	Tyrosinphosphorylierung von p27	62
6.4.2.	Aktivierung der MAPKinasen	62
6.5.	Bedeutung der sekundären Amplifizierungsmechanismen	63
6.5.1.	Einfluss von TxA ₂	64
6.5.2.	Einfluss von ADP	64
6.5.3.	Einfluss von Adrenalin.....	65
6.5.4.	Beeinflussung der Wirkung von PP2 und SQ29548 durch ADP und	
	Adrenalin.....	65
6.6.	Zusammenfassung, Schlussfolgerung, Ausblick	66
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Tabellenanhang.....	77
9.	Thesen.....	79
	Lebenslauf.....	A
	Selbstständigkeitserklärung.....	B
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	C
	Danksagung.....	D

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: α -Toxin-induzierte Aggregation humaner Thrombozyten.....	18
Abbildung 2: Quantifizierung der zeitabhängigen PAC-1-Bindung.....	19
Abbildung 3: Quantifizierung der zeitabhängigen P-Selectinexpression.....	20
Abbildung 4: Vergleich der α -Toxin-induzierte Aggregation von ADAM10-depletierten Mäusethrombozyten mit Thrombozyten von Wildtypmäusen	21
Abbildung 5: Quantifizierung der zeitabhängigen Aktivierung von GPIIbIIIa auf ADAM10- depletierten Mäusethrombozyten durch α -Toxin	22
Abbildung 6: Quantifizierung der zeitabhängigen P-Selectinexpression auf ADAM10- depletierten Mäusethrombozyten durch α -Toxin	23
Abbildung 7: Konzentrationsabhängigkeit der α -Toxin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten.....	24
Abbildung 8: Zeitabhängigkeit der α -Toxin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten ...	25
Abbildung 9: Effekt der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) auf die p27- Tyrosinphosphorylierungen.....	26
Abbildung 10: Zeitabhängige Phosphorylierung von Substraten der Proteinkinase B (Akt)	27
Abbildung 11: α -Toxin-induzierte proteolytische Degradation der Proteintyrosinkinase Src....	29
Abbildung 12: Inhibierung der proteolytischen Spaltung von Src.....	30
Abbildung 13: Zeitabhängige Änderungen der Src-Autophosphorylierung durch verschiedenen Agonisten	31
Abbildung 14: Effekte von Calpeptin auf die α -Toxin abhängige Aggregation humaner Thrombozyten	32
Abbildung 15: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die Aggregation humaner Thrombozyten	33
Abbildung 16: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte Aggregation von humanen Thrombozyten.....	34
Abbildung 17: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die Kollagen und α -Toxin-induzierte Src Autophosphorylierung.....	35
Abbildung 18: α -Toxin-induzierte zeitabhängige Aktivierung der MAPKinasen	36
Abbildung 19: Konzentrationsabhängige Aktivierung der MAPKinasen durch α -Toxin.....	37
Abbildung 20: Einfluss unterschiedlicher Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte Aktivierung der stressinduzierten Proteinkinasen p38 und JNK1/2.....	38
Abbildung 21: Modulation der α -Toxin-induzierten Aktivierung von p38 und JNK1/2 in humanen Thrombozyten.....	40
Abbildung 22: Effekte von Calpeptin auf die Aktivierung der MAPKinasen bei Stimulation mit α -Toxin.....	41

Abbildung 23: Modulation der Thrombin und Kollagen-induzierten Tyrosinphosphorylierung von p27	44
Abbildung 24: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte Tyrosinphosphorylierung von p27	45
Abbildung 25: Inhibierung der p27-Tyrosinphosphorylierung mit PP2 nach der Stimulation mit Kollagen	46
Abbildung 26: Inhibierung der p27-Tyrosinphosphorylierung mit PP2 nach der Stimulation mit Thrombin	47
Abbildung 27: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte p27-Tyrosinphosphorylierung in humanen Thrombozyten	48
Abbildung 28: Schema zur α -Toxin-abhängigen Aktivierung von humanen Thrombozyten.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitabhängige Änderungen der Tyrosinphosphorylierungen von p27, p29 und p39 nach Stimulation mit α -Toxin	25
Tabelle 2: Effekte des Akt-Inhibitors XVII (SC-66) auf die Aggregation humaner Thrombozyten	28
Tabelle 3: Signifikanztabelle zu Abbildung 16.....	33
Tabelle 4: Signifikanztabelle zu Abbildung 18.....	35
Tabelle 5: Signifikanztabelle zu Abbildung 21.....	38
Tabelle 6: Abhängigkeit der Thrombin und Kollagen-induzierten Aktivierung der MAPKinasen von verschiedenen Modulatoren.....	39
Tabelle 7: Effekte verschiedenen Proteinphosphatase-Inhibitoren auf die Aggregation humaner Thrombozyten	42
Tabelle 8: Zeitabhängige Änderungen der Phosphorylierung von p38, JNK1/2 und p27 nach Stimulation mit α -Toxin	43
Tabelle 9: Signifikanztabelle zu den Abbildungen 25 und 25	44
Tabelle 10: Signifikanztabelle zu Abbildung 28.....	46
Tabelle 11: Signifikanztabelle zu Abbildung 29.....	47
Tabelle 12: Signifikanztabelle zu Abbildung 17.....	77
Tabelle 13: Signifikanztabelle für p38 MAPKinase zu Abbildung 22	77
Tabelle 14: Signifikanztabelle für JNK1/2 MAPKinase zu Abbildung 22.....	78
Tabelle 15: Signifikanztabelle zu Abbildung 30.....	78

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
(c)AMP	(cyclo)Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Feldstärke
ECL	enhanced chemiluminescence system, Western-Blot-Detektionssystem
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK1/2	Extrazellular regulierte Kinasen 1 und 2
FAK	Focale Adhesion Kinase
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HRP-konjugiert	horseradish-Peroxidase-konjugiert
I	Stromstärke in Ampere
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
JNK1/2	c-Jun amino-terminal kinase 1 und 2
JON/A	monoklonaler Antikörper gegen Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$
KCl	Kaliumchlorid
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase(n)
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAC-1	monoklonaler Antikörper gegen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PI-3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PRP	plattchenreiches Plasma
PPP	plättchenarmes Plasma
PP1 (Src-Inhibitor)	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo- d-3,4-pyrimidin
PP2 (Src-Inhibitor)	4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-1-(t-butyl)-1H- pyrazolo[3,4-d]pyrimidin
PP3 (Kontrollsubstanz zu PP2)	4-Amino-7-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
SC-66 (Akt-Inhibitor XVII)	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-2,6- <i>bis</i> (4-Pyridylmethylene) cyclohexanon
SDS	Dodecylsulfate Natrium-Salz
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SFK	Familie der Src-Kinasen
SQ29548	[1 <i>S</i> -[1 α , 2 α (<i>Z</i>), 3 α , 4 α]]-7-[[2 [(phenylamino)carbonyl]hydrazinol]methyl]-7- oxabicyclo(2.2.1)hept-2-yl]-5-heptenoic acid
SU6656	2,3-Dihydro-N,N-dimethyl-2-oxo-3- [(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-yl)methylen]- 1H-indol-5-sulfonamid
Tab	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylen-diamine
Thr	Thrombin
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TP	Thromboxanrezeptor
U	Spannung in Volt
vWF	von-Willebrand-Faktor

Verwendete Maßeinheiten

A, mA	Ampere, Milliampere
°C	Grad Celsius
E (Feldstärke)	Volt/Meter
G	Gravitationskonstante ($m^3kg^{-1}s^{-2}$)
kg, g, mg, μ g	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
kDa	Kilodalton
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, μ M, nM	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol
min	Minuten
pH	potentia Hydrogenii
rpm	rounds per min (Umdrehungen pro min)
s	Sekunden
U, mU	Units, Milliunits
V, mV	Volt, Millivolt
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)

1. Einleitung

In den letzten Jahren hat die Häufigkeit von lebensbedrohlichen kardiovaskulären Infektionen besonders in Verbindung mit resistenten Keimen zugenommen. Diese Infektionen können durch unterschiedlichste Bakterien, Pilze und Parasiten hervorgerufen werden. Zunehmend deutet sich eine entscheidende Rolle für die Wechselwirkung von Bakterien mit menschlichen Thrombozyten in der Pathogenese von kardiovaskulären Infektionen an (Fitzgerald et al., 2006). Interessanterweise scheint die Pathogenese nicht an das Vorhandensein intakter Bakterien gebunden zu sein. Vielmehr können auch bakteriell sezernierte Toxine Infektionen hervorrufen. Bakterielle Toxine lassen sich in Endo- und Exotoxine unterteilen.

Endotoxine, wie das Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien, werden bei der Zellteilung oder der Zerstörung des bakteriellen Erregers frei und aktivieren Monozyten und Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, wie Interleukine und TNF- α (Osterud, 2003).

Die zweite Gruppe bilden die Exotoxine, zu denen das unten beschriebene α -Toxin von *Staphylococcus aureus* gehört.

1.1. *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tritt zum einen zeitweilig als ein harmloser Besiedler von Haut und Nasenschleimhäuten bei einem Drittel der Bevölkerung auf (John, 2009). Zum anderen ist er auch ein verbreiteter Krankenhauskeim, der lebensbedrohliche Krankheiten verursachen kann (Vandenbergh et al., 1999). So verursacht *Staphylococcus aureus* ca. 70% aller Wundinfektionen, ca. 10% aller Pneumonien und ca. 30 % der auftretenden lebensbedrohlichen Infektionen wie Endokarditis und Sepsis (Gatermann, 2012). Die durch *Staphylococcus*-Infektionen ausgelösten Erkrankungen sind durch eine modifizierte Thrombozytenfunktion charakterisiert, die für die Bildung von Thromben, eine gestörte Mikrozirkulation und multiples Organversagen, verbunden mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität, verantwortlich ist (Lowy, 1998).

Die Pathogenität von *Staphylococcus aureus* wird durch seine Fähigkeit bestimmt, eine Vielzahl von verschiedenen Exotoxinen (Hemolysine, Enterotoxine, Leukocidine) und Exoenzymen (Coagulase, Proteasen, Kinasen, Lyasen) zu bilden.

Ein wichtiger Virulenzfaktor von *St. aureus* ist α -Toxin, auch als α -Hemolysin bezeichnet. Alpha-Toxin ist ein 34kDa großes Polypeptid, das als wasserlösliches Monomer mit einer Länge von 293 Aminosäuren freigesetzt wird (Patel et al., 1987). Die Bindung an Zelloberflächen führt zur Oligomerisation und Bildung einer ringförmigen Transmembranpore mit einem Durchmesser von 1-2 nm. Die gebildete nicht-selektive Transmembranpore ist für anorganische Kationen und kleine Moleküle wie ATP und ADP durchlässig (Gouaux et al.,

1998; Bhakdi et al., 2005). In humanen Thrombozyten führt der α -Toxin-induzierte Kalziumeinstrom zur Aggregation und zur Sekretion von Plättchenfaktor 4 und Faktor V aus α -Granula (Bhakdi et al., 1991). Darüber hinaus kommt es zur Bildung von Mediatoren wie Thromboxan A₂ (TxA₂) und Prostaglandin I₂ (Sibeliu et al., 2000).

Die Bildung der Transmembranpore mit nachfolgenden Ionenströmen und sekundärer Signalkaskaden gilt als Hauptwirkmechanismus von α -Toxin. Dabei sind verschiedene Zelltypen in Abhängigkeit von der Spezies unterschiedlich stark betroffen. Im Menschen sind mehrere Zelltypen einschließlich Keratinozyten (Walev et al., 1993), Endothelzellen (Grimminger et al., 1997) und Blutzellen wie Monozyten (Bhakdi et al., 1989) und Thrombozyten (Bhakdi et al., 2005) betroffen.

1.2. Humane Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose, diskoidale Zellen mit einer Größe von 2-5 μ m, die durch Abschnürung aus Megakaryozyten gebildet werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der primären arteriellen Hämostase und nachfolgender Thrombusbildung, hervorgerufen durch Agonisten wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombin.

Die durch primäre Agonisten wie Kollagen oder Thrombin ausgelöste Thrombozytenaktivierung führt zu einer raschen Formänderung der Thrombozyten (shape change) und ist mit Bildung und Freisetzung von Lipidderivaten wie Thromboxan A₂ (TxA₂) und nachfolgender Sekretion von proaggregatorischen Mediatoren, wie Serotonin und den Adeninnukleotide Adenosin 5'-triphosphate (ATP) und Adenosin 5'-diphosphate (ADP) aus dichten Granula verbunden. In den dichten Granula herrscht ein leicht saurer pH-Wert (pH 6,1) vor und sie enthalten Ionen wie Kalzium, Magnesium und Pyrophosphate (Reed, 2007). Ihren Namen haben sie auf Grund ihrer hohen Dichte im Elektronenmikroskop. Neben den dichten Granula besitzen Thrombozyten weitere Granulatypen: α -Granula und Lysosomen. Während α - und dichte Granula ausschließlich in Thrombozyten vorkommen, sind Lysosomen ubiquitär verbreitet. Die α -Granula haben einen Durchmesser von 200-500nm und sind mit durchschnittlich 80 Stück pro Thrombozyt am häufigsten vorhanden (Harrison et al., 1990). α -Granula enthalten verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie von-Willebrand-Faktor, P-Selektin und Fibrinogen, Wachstumsfaktoren, Koagulationsfaktoren und Chemokine. Die Lysosomen enthalten saure Hydrolasen, Cathepsin D und E sowie CD 63 (Reed, 2007).

TxA₂ ist der wichtigste endogene Arachidonsäuremetabolit in Thrombozyten. Arachidonsäure wird durch die Prostaglandinsynthetase zu TxA₂ metabolisiert. Dabei entsteht das Prostaglandinendoperoxid PGH₂, welches anschließend von der Thromboxansynthase in TxA₂ umgewandelt wird (Samuelsson, 1978). Für TxA₂ ist der Thromboxan- oder Prostanoid-Rezeptor α (TP α), ein Mitglied der Familie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die auf Thrombozyten vorherrschende Isoform (Habib et al., 1999; Hirata et al., 1996). Der

Thromboxanrezeptor α ist sowohl mit Gq- als auch mit G12/13-Proteinen gekoppelt (Offermanns et al., 1994).

Einmal freigesetzt, erzeugt Thromboxan A_2 stimulatorische Schleifen, indem es den Thromboxanrezeptor α auf den Thrombozyten aktiviert und dadurch zur Freisetzung von ADP aus dichten Granula führt, was einen wichtigen Verstärkungsmechanismus für die Thrombozytenfunktionen darstellt (Arita et al., 1999).

Durch Thromboxanrezeptor α -Antagonisten wie Ifetroban und SQ29548 (für unsere Studien verwendet) kann die Thrombozytenaggregation deutlich vermindert werden. Durch Untersuchungen an Mäusen die keinen Thromboxanrezeptor exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die Blutungszeit von TP-deletierten-Mäusen verlängert ist (Thomas et al., 1998), was die wichtige Funktion von Thromboxan A_2 und des Thromboxanrezeptor α belegt.

ADP, der erste bekannte Thrombozytenagonist mit niedriger apparenter Molmasse, ist ein schwacher Agonist. Als solcher induziert ADP in niedrigen Konzentrationen nur den Shape Change und eine reversible Aggregation. Erst in höheren Konzentrationen kommt es auch zur irreversiblen Aggregation. Obwohl ADP selbst nur ein schwacher Agonist ist, nimmt es eine zentrale Rolle in der Thrombozytenfunktion ein, da es die Reaktion der Thrombozyten auf andere Stimuli amplifiziert und die gebildeten Aggregate stabilisiert. Auf der Thrombozytenoberfläche werden zwei Rezeptoren für ADP exprimiert. Zum einen der Gq-gekoppelte P2Y1-Rezeptor, der eine Mobilisierung von Kalzium aus internen Speichern vermittelt, den Shape Change bewirkt und die schnelle reversible Aggregation, und zum anderen der Gi-gekoppelte P2Y12-Rezeptor, der die Adenylatcyclase inhibiert und weitere Signalkaskaden im Thrombozyten verstärkt. Beide P2Y-Rezeptoren zeigen den klassischen Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit sieben transmembranären Domänen (Hechler und Gachet, 2011).

Adrenalin wirkt hauptsächlich über den α_{2A} -Adrenozeptor, der ebenfalls mit einem inhibitorischen G-Protein, Gz, koppelt (Yang et al., 2000). Adrenalin potenziert in Gegenwart anderer Agonisten die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, aber eine alleinige Stimulation mit Adrenalin bewirkt keine Aktivierung (Lanza et al., 1988; Steen et al., 1993). Thrombozyten von Patienten, die auf Adrenalinstimulation keine Reaktion zeigen, so genannte „Epinephrine-nonresponders“, reagieren nur vermindert auf ADP-Stimulation. Dies weist darauf hin, dass sich der α_{2A} -Adrenozeptor und der P2Y12-Rezeptor intrazelluläre Signalwege teilen (Nakahashi et al., 2001).

1.3. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen in humanen Thrombozyten

In Thrombozyten sind zahlreiche Proteine an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Durch Aktivierung und Inhibierung der Thrombozyten kommt es zu einer zusätzlichen und/oder vermehrten Phosphorylierung sowie Dephosphorylierung von Proteinen. Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten (=Tyrosinphosphorylierung) ist für die Signaltransduktion in humanen Thrombozyten von grundlegender Bedeutung (Jackson et al., 1996; Presek und Martinson 1997). In Folge der Stimulation durchlaufen Thrombozyten funktionelle Veränderungen, die von unterschiedlichen Signalwegen abhängig sind. In Thrombin-stimulierten Thrombozyten wird die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im apparenten Molmassenbereich zwischen 27 und 170kDa in zeitlich unterschiedlichen Wellen beobachtet (Fälker et al., 2005; Ferrel und Martin 1988). Darüber hinaus wird die Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen durch „outside-in“-Signale des Glykoprotein IIbIIIa-Komplexes reguliert (Ferrel und Martin 1989). Von Fälker et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass Thrombin, über seinen Gq-gekoppelten Rezeptor, durch Freisetzung von ADP aus den dichten Granula und der folgenden Aktivierung der purinergen Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 die Phosphorylierung Proteine mit Molmassen von 27, 29, 31, 34 und 39kDa an Tyrosinresten induziert.

Ergebnisse von vielen Arbeitsgruppen, teilweise durch die Nutzung von natürlich vorkommenden und synthetischen PTK-Inhibitoren, liefern genügend Beweise um eine wichtige Rolle für die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten zu postulieren (Presek und Martinson 1997). Das Niveau der Tyrosinphosphorylierungen ist durch Protein-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Phosphatasen reguliert (Jackson et al., 1996).

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten sind durch die gegensätzlichen Funktionen von Protein-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Phosphatasen im Gleichgewicht, so dass beide Enzymklassen für die Signaltransduktion gleichermaßen bedeutsam sind (Burke et al., 1998).

In Thrombozyten wurden verschiedene Protein-Tyrosin-Phosphatasen, wie PTB1B, SHP-1 und SHP-2, identifiziert (Jackson et al., 1996). Diese Phosphatasen sind an der Regulation einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt (Burke et al., 1998). So sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen für den Phosphorylierungsstatus und die Vermeidung einer Frühaktivierung in ruhenden Thrombozyten verantwortlich. Durch die Aktivierung von PTB1B, durch PKC-abhängige Phosphorylierung an Serinresten, wird die Protein-Tyrosin-Kinase Src an dem Tyrosinrest 527 dephosphoryliert und dadurch aktiviert (Jackson et al., 1996).

1.4. Src

Humane Thrombozyten enthalten große Mengen von nicht-Rezeptor-gekoppelten Proteintyrosinkinassen (PTK). Dazu gehören 7 Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, nämlich Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src und Yes, unter denen c-Src, die am meisten exprimierte und am besten untersuchte PTK ist (Presek und Martinson 1997; Stenberg et al., 1997). Die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen sind strukturell eng verwandt und werden durch ähnliche Mechanismen in ihren Funktionen reguliert. Die Src-Kinase besteht aus mehreren funktionellen Domänen, der N-terminalen Domäne, den beiden peptidbindenden Domänen SH2 und SH3, der katalytischen Untereinheit und der C-terminalen, regulatorischen Region. Die N-terminale Domäne ist verantwortlich für die spezifische Interaktion mit Rezeptoren und umfasst die Bindungsstellen für Proteinkinase C (PKC) (Totosyan und Mizenina, 2000).

In ruhenden Thrombozyten liegt Src größtenteils in seiner inaktiven Form vor, die durch intramolekulare Interaktion zwischen der SH2-Domäne und der C-terminalen Region mit phosphoryliertem Tyrosin-527, sowie zwischen SH3-Domäne und dem N-Terminus der katalytischen Untereinheit zustande kommt (Totosyan und Mizenina, 2000). Die Phosphorylierung von Tyrosin-527 durch die cytoplasmatische Kinase Csk inhibiert die Kinaseaktivität von Src zu nahezu 100% (Totosyan und Mizenina, 2000). Während der Thrombozytenaktivierung wird die Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B aktiviert und Tyrosin-527 dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung von Tyrosin-527 verbunden mit der Phosphorylierung des Tyrosinresten 416 in der katalytischen Untereinheit wird Src aktiviert (Bjorge et al., 2000).

Durch Phosphorylierung an Tyrosin-416, der wichtigen Position für die Autophosphorylierung wird die enzymatische Aktivität erhöht (Reuter et al., 1990). Aktiviertes Src besitzt eine höhere Affinität zu seinen Substraten (Liebenhoff et al., 1993) und es kommt zur Translokation von der Plasmamembran in das Zytoskelett (Horvath et al., 1992). Ausserdem wird Src durch die Kalzium-abhängige Cysteinprotease Calpain gespalten (Oda et al., 1993), wodurch ebenfalls seine Kinaseaktivität verändert wird.

Die onkogene Form der Src-Kinase (v-Src), die durch das Rous Sarcoma Virus kodiert wird, ist die konstitutiv aktive Form des c-Src. Das virale Src verfügt nicht über die C-terminale Region mit dem inhibitorisch wirkenden Tyrosin-527 (Cooper et al., 1986). Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass die Überexpression von v-Src zu einer verstärkten Aktivierung der c-Jun NH2-terminalen Kinase (JNK), einem Mitglied der Familie der MAPKinasen, führt (Xie et al., 1995).

1.5. MAPKinasen

Humane Thrombozyten enthalten mehrere Mitglieder der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK): p38 MAPkinase (Kramer et al., 1995), JNK1 und JNK2 (c-Jun amino-terminal kinase 1 und 2) (Bugaud et al., 1999), ERK1 und ERK 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 und 2) (Papkoff et al., 1994).

Die MAPKinasen sind eine Familie von ubiquitär verbreiteten Serin-Threonin-Kinasen (Rossomando et al., 1989), deren Beteiligung an vielen Funktionen der Säugetierzelle wie Zellproliferation und Differenzierung, Zellbewegung, Genexpression und Zellüberleben, während der letzten Jahrzehnte entdeckt wurde. Neben Funktionen im Zellkern, beeinflusst die Aktivierung der MAPKinasen Strukturen in der Zellmembran, dem Zytosol, dem Zytoskelett sowie den in Mitochondrien (Geest et al., 2009).

Während der Thrombozytenaktivierung durch primären Agonisten wie Thrombin und Kollagen werden die Mitglieder der Familie der MAPKinasen phosphoryliert. Die Aktivierung der MAPKinasen erfolgt durch extrazelluläre Stimuli über Liganden gesteuerte Ionenkanäle, Rezeptortyrosinkinasen (RTK), oder durch G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die alle zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasekaskaden führen (Adam et al. 2008).

Die Aktivierung der MAPKinasen erfordert eine duale Phosphorylierung zuerst an einem Tyrosin- und anschließend an einem Threoninrest, die durch eine Aminosäure (Thr-X-Tyr) getrennt sind (Payne et al, 1991). Das dual phosphorylierte Protein gilt als aktives Enzym (Pearson et al, 2001).

Die ERK-Kaskade kann durch Thrombin oder Kollagen aktiviert werden. Jede Klasse von MAPKinasen wird durch eine bestimmte Kinasekaskade aktiviert. Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt über eine Phosphorylierung durch MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase) (Geest et al, 2009), ist aber auch von der Proteinkinase C (PKC) abhängig (Nadal-Wollbold et al, 2002). Eine wichtige Rolle für ERK2 wurde bei der Adhäsion und der Thrombozytenspreizung beobachtet (Mazharian et al 2007). Mit niedrigen Konzentrationen von Kollagen oder Thrombin ist ERK2 an der Aggregation beteiligt (Fälker et al, 2004). Unter diesen Bedingungen beeinflusst ERK2 die Sekretion und Aktivierung der Myosin-Light-Chain-Kinase (Roger et al, 2004).

Zu der Gruppe der stressinduzierten Proteinkinase in Thrombozyten gehören p38, die JNK-Isoformen JNK1 (46kDa) und JNK2 (55kDa), die auch an apoptotischen Vorgängen beteiligt sind (Chen et al, 1998; Verheij et al, 1996). Die MAPKinase p38 wird nach Aktivierung von den MAPKinase Kinasen 3 und 6 phosphoryliert. Das bekannteste Substrat von p38 ist die Phospholipase A₂ (Kramer et al, 1995), die an der Aggregation unter niedrigen Konzentrationen von Kollagen oder von-Willebrand-Faktor beteiligt ist (Saklatvala et al, 1996). p38 ist auch an der Freisetzung von Arachidonsäure zur Synthese von TxA₂ beteiligt (Cannobio et al, 2004).

Von Begonja et al. (2007) wurde gezeigt, dass p38 für die Adhäsion an einer Kollagenmatrix erforderlich ist.

Im Gegensatz zu ERK2 und p38 ist relativ wenig über die Aktivierung und die Rolle von JNK1 und JNK1/2 in Thrombozyten bekannt (Adam et al, 2008). Die Signalkaskade von JNK1/2 kann durch verschiedene Stressfaktoren (UV-Strahlung, Hitze, Röntgenstrahlung, osmotischer Schock), Cytokine (TNF- α und Interleukin-1) und schwach durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Guo et al, 1998; Tokiwa et al, 1996). In menschlichen Thrombozyten wird die JNK1-Isoform durch Thrombin (Bugaud et al, 1999), vWF (Song et al, 2000) und Kollagen (Kauskot et al, 2007) aktiviert. Diese Stimuli führen zur Aktivierung der MAPKinase Kinasen 4 und 7 (MKK4, MKK7), die eine Aktivierung der JNK-Isoformen bewirken (Geest et al, 2009).

Darüber hinaus werden die beiden MAPKinasen JNK1 und ERK2 durch GPIIbIIIa-Aktivierung negativ reguliert (Bugaud et al, 1999). Frühere Studien mit Hemmstoffen aller JNK-Isoformen (JNK1, JNK1/2, JNK3) deuten auf eine Funktion der JNK-Isoformen bei Adhäsion, Sekretion und Thrombusbildung hin (Adam et al, 2010).

2. Zielsetzung

Die Wirkung des Gram-positiven Pathogens *Staphylococcus aureus* auf Thrombozyten wurde bisher zumeist als Folge eines direkten Kontakts des Bakteriums mit Thrombozyten angesehen (Fitzgerald et al, 2006). Dabei konnte bereits von Siegel und Cohen (1964) gezeigt werden, dass auch α -Toxin, ein wichtiger Virulenzfaktor des *S. aureus*, zur Aktivierung von humanen Thrombozyten führt.

In dieser Arbeit sollten daher Wirkung und molekulare Mechanismen des Membranporenbildenden α -Toxins auf Signalwege in humanen Thrombozyten untersucht werden, über die wenig bekannt ist:

1. Die membrangebundene Disintegrin-and-Metalloprotease 10 (ADAM10) dient als hochaffine Bindungsstelle für α -Toxin auf Epithelzellen. Dies sollte auch für Thrombozyten geprüft werden.
2. Von Interesse waren Änderungen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Hierbei wurde der Fokus auf die Tyrosinphosphorylierung eines Proteins von 27kDa und der Tyrosinkinase Src gerichtet.
3. Zur Bedeutung der Familie der Src-Kinasen für die α -Toxin-abhängige Aggregation und Aktivierung der stressinduzierten MAPKinasen p38 und JNK1/2 wurden Wirkungen der Inhibitoren PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss des TxA₂-Rezeptors auf die α -Toxin-abhängige Thrombozytenaggregation und Aktivierung von p38 und JNK1/2 analysiert.
4. Nach Aktivierung der Thrombozyten mit α -Toxin sollten auch andere wichtige Signalmoleküle wie die Protease Calpain und die Proteinkinase B untersucht werden.

3. Material

3.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Sigma, München
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	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-ethan-sulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Ovalalbumin	Sigma, München
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
PBS (phosphate buffered saline), ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	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-diamin)	Sigma, München
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurat)	Sigma, München
Harnstoff	Roth, Karlsruhe

3.2. Agonisten

Substanz

α -Toxin (α -Hemolysin) von <i>Staphylococcus aureus</i>
ADP (Adenosin 5'-Diphosphat)
Kalziumionophore A23187 (Calcimycin)
Adrenalin (Epinephrin)
Kollagen
Thrombin, bovines

Bezugsquelle

Sigma, München
Roche, Penzberg
Sigma, München
Sigma, München
Nycomed, Ismaning
Sigma, München

3.3. Antagonisten und Inhibitoren

Substanz

Apyrase, grade III, from potato
Akt-Inhibitor XVII (SC-66)
Calpepetin
Dasatinib (BMS-35482)
Hirudin
PP1
PP2
PP2
SQ29548
SU6656

Bezugsquelle

Sigma, München
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Sigma, München
Loxo, Dossenheim
Merck, Darmstadt
Sigma, München
Merck, Darmstadt
Biomol, Hamburg
Sigma, München

3.4. Antikörper

3.4.1. Primäre Antikörper

Substanz

Anti-ACTIVE JNK, polyklonaler

Kaninchen-Antikörper

Anti-Phosphotyrosin, monoklonaler

Maus-Antikörper, Klon 4G10,

Anti-RAN, monoklonaler

Maus-Antikörper

Anti-v-Src (AB-1), monoklonaler

Maus-Antikörper mAb 327

Phospho-Akt Substrat (110B7E) monoklonaler

Kaninchen-Antikörper

Phospho-p38 MAPK (28B10),), monoklonaler

Maus-Antikörper

Phospho-p44/p42 MAPK (E10), monoklonaler

Maus-Antikörper

Phospho-Src Family (Tyr 416), polyklonaler

Kaninchen-Antikörper

Bezugsquelle

Promega, Mannheim

Upstate Biotechnology

Biomol, Hamburg

BD Biosciences, Heidelberg

Merck, Darmstadt

Cell Signaling Technology,
(NEB Frankfurt)

3.4.2. Sekundäre Antikörper

Substanz

Anti-Maus-Antikörper vom Kaninchen

(HRP-konjugiert, monoklonal)

Anti-Kaninchen-Antikörper vom Schwein

(HRP-konjugiert, monoklonal)

Bezugsquelle

Sigma, München

Sigma, München

3.4.3. Antikörper für Durchflusszytometrie

Substanz

PAC-1, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert

Anti-human CD62P, Phycoerythrin (PE) konjugiert

Bezugsquelle

BD Biosciences, Heidelberg

eBioscience, Frankfurt

3.5. Geräte und Materialien

Geräte und Materialien

Aggregometer (Platelet aggregation profiler PAP 8)

Biofufe fresco

Biofuge primo

Blotkammer (Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer) Biorad, München

Densitometer GS 800 und Quantity OneR Software

Glasküvetten, silikonisiert

Inolab pH720 (pH-Meter)

Nitrozellulose (Protran; 0,45µm)

Cronex 5 Filmfolien (18 x 24cm)

Thermomixer

Bezugsquelle

Mölab, Langenfeld

Heraeus (Kendro), Hanau

Heraeus (Kendro), Hanau

Biorad, München

Mölab, Langenfeld

WTW, Weilheim

Schleicher und Schuell, Dassel

Agfa, Mortsel, Belgien

Eppendorf, Hamburg

4. Methoden

4.1. Reinigung von humanen Thrombozyten

Zur Isolierung der Thrombozyten wird das Blut gesunder, freiwilliger Spender verwendet. Für die Blutentnahme bei gesunden Probanden und das Procedere liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor.

Die Spender dürfen über einen Zeitraum von 2 Wochen vor der Blutentnahme keine Medikamente eingenommen haben, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Insbesondere zählen hierzu nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) wie Acetylsalicylsäure (ASS), Ibuprofen und Diclofenac sowie selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI). Die Thrombozytenisolierung wird nach der Methode von Greinacher et. al (1991) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Vermeidung der Koagulation wird sofort nach Entnahme dem Blut ACD-A-Lösung (2,2% Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 0,8% Citronensäure-Monohydrat, 2,5% α -D(+)-Glucose) im Verhältnis 1:6 (v/v) zugesetzt. Um plättchenreiches Plasma (PRP) zu erhalten, wird das Vollblut in 13ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) transferiert und bei 275 x g für 20min zentrifugiert. Das PRP, die obere Phase, wird vorsichtig abgenommen, um Verunreinigungen mit Erythrozyten, Leukozyten und Granulozyten aus den unteren Phasen zu vermeiden. Dem gewonnenen PRP wird pro 1ml 111 μ l ACD-A-Lösung zugesetzt. Anschließend wird das PRP für 10min bei 800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so aus 20ml Vollblut gewonnene Thrombozytensediment wird in 4ml Waschpuffer (137mM NaCl, 2,68mM KCl, 12mM NaHCO₃, 0,36mM NaH₂PO₄, 10mM HEPES, 5,5mM α -D(+)-Glucose, 1U/ml Apyrase, 1U/ml Hirudin, pH 6,4) resuspendiert und anschließend 20min im Wasserbad inkubiert. Dem Puffer wird Apyrase zugesetzt, um eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten durch freigesetztes ADP zu verhindern. Der Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt. Für den 2. Waschschrift wird der Puffer ohne Hirudin verwendet, um in den weiteren Experimenten die Hemmung von Thrombin durch Hirudin zu vermeiden. Nach der Inkubation im Wasserbad folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (10min bei 400 x g). Die Resuspension der gereinigten Thrombyzyten erfolgt in Suspensionspuffer (137mM NaCl, 2,68mM KCl, 12mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 10mM HEPES, 5,5mM α -D(+)-Glucose, 0,02U/ml Apyrase, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, pH 7,4) entsprechend der gewünschten Thrombozytenzahl.

4.2. Bestimmung der Zellzahl

Die gereinigten Thrombozyten werden im Verhältnis 1:100 mit Suspensionspuffer verdünnt. Jeweils 10µl dieser Verdünnung werden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops in drei Kleinstquadraten gezählt. Die Thrombozytenzahl pro ml berechnet sich aus dem Mittelwert der gezählten Zellen x 100 (Verdünnungsfaktor) x 256000.

4.3. Aggregationsmessung

Die Aggregation der Thrombozyten wird nach der Methode von Born (1963) im Aggregometer (Platelet Aggregation Profiler PAP8) gemessen. Die Konzentration der Thrombozyten für die Aggregationsmessung beträgt 3×10^8 Zellen pro ml. Um das Gerät auf den Nullwert zu eichen, wird Suspensionspuffer verwendet. Zur Durchführung der Reaktion werden 225µl der Thrombozytensuspension in silikonisierte Glasküvetten mit je einem Magnetrührer überführt. Die Proben werden mit je 12,5µl spezifischen Rezeptorantagonist, Inhibitor oder Suspensionspuffer unter ständigem Rühren (900rpm) bei 37°C für 5min vorinkubiert. Durch Zugabe von ebenfalls 12,5µl eines Agonisten werden die Thrombozyten aktiviert und das Ausmaß der Aggregation gemessen. Das Gesamtvolumen beträgt 250µl. Das Ausmaß der Aggregation in Prozent wird indirekt als Maß der zunehmenden Lichtdurchlässigkeit aufgezeichnet.

4.4. Stimulation der Thrombozyten zur Proteinanalyse mit dem Immuno-Blot-Verfahren (Western Blot)

Für die Stimulationsexperimente wird eine Thrombozytensuspension mit 5×10^8 Thrombozyten pro ml hergestellt. Von der vorliegenden Suspension werden 180µl in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und jeweils mit 10µl Rezeptorantagonist, Inhibitor oder Suspensionspuffer für 5min vorinkubiert und anschließend mit 10µl Agonist versetzt. Die Stimulation in einem Endvolumen von 200µl erfolgt bei 37°C auf einem Thermomixer (Eppendorf) unter ständigem Rühren mit einem Stahlkügelchen bei 700rpm. Zu den im Text angegebenen Zeiten wird die Reaktion durch Zugabe von 50µl SDS-Probenpuffer (10% SDS (w/v), 1,43M β-Mercaptoethanol, 20% Glycin (w/v), 20% 0,625M Tris-HCL pH 6,8 (v/v), 6M Harnstoff, Bromphenolblau ad lib) beendet und die Proben anschließend für 5min bei 95°C erhitzt. Bis zur Verwendung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und der Western-Blot-Analytik können die Proben bei -80°C gelagert werden.

4.5. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach der Methode ursprünglich von Laemmli in Gegenwart von SDS (SDS-PAGE) werden alle Polypeptide eines Proteingemisches durch Erhitzen auf 95°C mit dem Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) entfaltet, negativ geladen und nachfolgend im Polyacrylamidgel nach ihren relativen Molmassen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt in vertikaler Richtung in Mini-Trans-Elektrophoresekammern der Firma Biorad, München. Dazu werden Gelelektrophoresekammern, die mit Laufpuffer (25mM Tris, 200mM Glycin, 0,1% SDS (w/v)) gefüllt sind, verwendet. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgt in 10%igen Trenngelen. Mit Markerproteinen werden die relativen Molmassen der Proteine bestimmt. Dazu wird zum einen ein selbst hergestelltes Gemisch aus Markerproteinen mit folgender Zusammensetzung verwendet: Rinderserumalbumin (66kDa), Katalase (60kDa), Ovalalbumin (45kDa), Carboanhydrase (29kDa) und Trypsinogen (24kDa). Zum anderen wird der kommerzielle Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Fischer Scientific, Schwerte, verwendet. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn die Front des Bromphenolbau-Farbstoffs vom SDS-Probenpuffer aus dem Gel herausgelaufen ist. Nachfolgend kann mit dem Gel eine Coomassie-Färbung mit Färbelösung (25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,05% Coomassie-R250 (w/v)) durchgeführt werden. Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wird das Gel mit 10% Essigsäure entfärbt. Sollen die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran zum immunochemischen Nachweis geblottet werden, wird auf eine Färbung der Gele verzichtet.

4.6. Elektrophoretischer Transfer zum immunochemischen Nachweis (Western Blotting)

Im Anschluss an die SDS-Page werden die Polypeptide aus den ungefärbten Gelen elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen („geblottet“) und immunochemisch nachgewiesen. Für jedes Gel werden eine größenmassig passende Nitrocellulosemembran und 6 passende Stücke Filterpapier zugeschnitten. Alle Filterpapierbögen und Nitrocellulosemembranen werden mit Blotpuffer (20mM Tris, 300mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,015% SDS (w/v)) befeuchtet und in eine vertikale Blotkammer gepackt: Um ein optimales Blotergebnis zu erhalten, dürfen zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen eingeschlossen werden.

Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 1,8mA pro cm² Gelfläche im Nass-Blot-Verfahren für 3 Stunden bei 4°C durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird geprüft, ob die aufgetrennten Proteine effektiv auf die Membran transferiert worden sind. Dies geschieht zum einen über eine Proteinfärbung des Gels und zum anderen über eine Färbung der Membran mit Ponceau-Färbelösung (0,5% Ponceau S (w/v), 5% Essigsäure (v/v)). Anschließend wird die Membran mit TBS-T-Puffer (Tris-buffered saline: 20mM Tris-HCl pH 8,0; 300mM NaCl und 0,1% (w/v) Tween 20) entfärbt. Zur Verhinderung von unspezifischen

Bindungen des Antikörpers an die proteinfreien Zonen der Membran, was zu einer unspezifischen Nachweisreaktion führen würde, wird die Membran mit 7,5ml Blockierlösung (5% BSA (w/v) oder 5% MMP (w/v) in TBS-T) mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blocken wird die Membran in drei 5-minütigen Schritten gewaschen und anschließend mit dem gewünschten Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Antikörperlösung dekantiert, die Membran dreimal für 5min bei Raumtemperatur mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit dem korrespondierenden zweiten Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten drei 10-minütigen Waschschritten wird die Nitrocellulosemembran mit einer Mischung aus ECL-Lösung 1 (2,5mM Luminol; 0,4mM p-Cumarinsäure) und ECL-Lösung 2 (100mM Tris/HCL pH 8,5; 0,18% H₂O₂) für 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Peroxidase, die an den zweiten Antikörper konjugiert ist, wird die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysiert. Die ausgesendete Lichtemission wird auf Cronex 5 Filmfolien (Agfa; Mortsel, Belgien) aufgezeichnet und durch Entwickeln der Filmfolien sichtbar gemacht. Die Intensität der Phosphorylierungen wird innerhalb eines linearen Bereichs von 0 bis 160 OD/mm² mit einem GS800 Densitometer (BioRad, München) und entsprechender Software (Quantity One®, BioRad) quantifiziert.

Von der Nitrocellulosemembran, die für einen immunochemischen Nachweis verwendet wurde, können die Antikörper nach der ECL-Reaktion entfernt werden, um die Membranen für die Kontrolle der Gesamtproteinmenge in den einzelnen Proben einzusetzen. Dafür werden die Membranen 60min mit Stripping Buffer (60mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 1% β-Mercaptoethanol) inkubiert und anschließend 120-180min mit TBS-T-Puffer gewaschen.

4.7. Durchflusszytometrie (FACS) mit humanen Thrombozyten

Das Grundprinzip der durchflusszytometrischen Analytik der Thrombozytenfunktion beruht auf der Markierung von Adhäsionsrezeptoren (GPIIb/IIIa) und aktivitätsabhängig exprimierten Antigenen (P-Selektin) mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Anschließend wird der Anteil antigen-positiver Thrombozyten vermessen und quantifiziert (Ruf et al. 2007). Das verwendete Protokoll folgt dabei den Richtlinien der European Working Group on Clinical Cell Analysis und der Deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (Schmitz et al. 1998).

Für die Messung wird die Thrombozytensuspension auf 1–5 x 10⁷ Thrombozyten/ ml in Suspensionspuffer eingestellt. Die Reaktion wird in 2ml Reaktionsgefäßen bei 37°C und einem Gesamtvolumen von 200µl durchgeführt. Zu den im Text angegebenen Zeiten wird die Reaktion durch Zugabe von 100µl Stabilisierungslösung (0,2% Glyoxal (v/v), 0,05% Formaldehyd (v/v), in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,2) fixiert und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 50µl verdünnte, stabilisierte

Thrombozytensuspension in 12 x 75mm Röhren (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) transferiert. Diese enthalten 5µl PE-konjugierten CD62P-Antikörper (eBioscience, Frankfurt) oder 5µl FITC-konjugierten PAC-1-Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg). Die Proben werden 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln markiert und nach der Zugabe von 400µl Verdünnungslösung (0,2% w/v Glycin, PBS pH 7,2) bei 4°C gelagert, bis sie innerhalb der nächsten 24 Stunden analysiert werden. Bei Einfachmarkierung wird die Thrombozytenpopulation durch Bestimmung der Größe und Verteilung im Vorwärts- und Seitwärtstreulicht identifiziert. Es werden pro Probe mindestens 10.000 Thrombozyten gemessen. Aus den im Streulicht erhaltenen Messdaten wird das Thrombozyten-Cluster eingegrenzt. Die eingegrenzten Thrombozyten werden in einem Dot-Plot-Diagramm dargestellt und durch Einfügen eines Diskriminators wird der Anteil antigenpositiver Thrombozyten bestimmt. Der Diskriminator wird so gesetzt, dass bei der Negativkontrolle 95% der Messwerte links des Diskriminators liegen.

4.8. Untersuchung mit Mäusestrombozyten (Kooperation mit Würzburg)

Die Experimente mit den Mäusethrombozyten wurden im Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard Nieswandt durchgeführt. Alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der Blutentnahme aus dem retro-orbitaler Plexus der Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Michael Popp von mir durchgeführt.

4.8.1 Isolierung von Mäusethrombozyten

Dazu wurden Adam10 fl/fl, PF4-Cre Mäuse (Adam10 ^{-/-}) verwendet (Hofmann et al. 2012).

Zur Gewinnung der Thrombozyten werden die Mäuse mit Isofluran betäubt und mittels einer heparinisierten Glaskapillare 0,7–1ml Blut aus dem retro-orbitaler Plexus in ein Reaktionsgefäß mit 300µl warmer ACD-Lösung (2,5% Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 1,4% Citronensäure-Monohydrat, 2,0% α-D(+)-Glucose) getropft. Im Anschluss werden 200µl Tyrode-Puffer (134mM NaCl, 2,9mM KCl, 12mM NaHCO₃, 0,34mM NaH₂PO₄, 5 mM HEPES, 5mM α-D(+)-Glucose, 0,35% BSA (w/v), 1mM MgCl₂) zugegeben und die Proben bei 400 x g für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die obere Phase (PRP) und die Mischschicht aus Leukozyten und Thrombozyten (buffy coat) großzügig abgenommen und mit weiteren 200µl Tyrode-Puffer versetzt. Diese Suspension wird erneut bei 200 x g bei Raumtemperatur für 6min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand (ca. 0,4-0,6ml) in neue Reaktionsgefäße mit 2µl Apyrase (10U/ml) und 5µl Prostacyclin (1mM) überführt und für 5min bei 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Thrombozytensediment in 1ml Tyrodepuffer, der zusätzlich 2µl Apyrase (10U/ml) und 5µl Prostacyclin (1mM) enthält, resuspendiert. Die Suspension wird 10min bei 37°C inkubiert und nochmals für 5min bei 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird

einmal wiederholt. Das Thrombozytensediment wird mit Tyrode-Puffer resuspendiert und auf die gewünschte Thrombozytenzahl eingestellt.

4.8.2. Aggregationsmessung der Mäusethrombozyten

Die Funktionalität der Mäusethrombozyten wird mittels Aggregationsmessung an einem APACT 4– Aggregometer (Labor Fibrinometer, Ahrensburg) gemessen. Die Suspension wird mit Tyrode-Puffer auf eine Thrombozytenzahl von 5×10^8 /ml eingestellt. 50µl dieser Thrombozytensuspension werden mit 110µl Tyrode-Puffer, der zusätzlich 2mM CaCl₂ enthält, und 10µl des Agonisten bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert. Die Aggregation wird als Ausmaß der zunehmenden Lichtdurchlässigkeit dargestellt.

4.8.3. Durchflusszytometrie (FACS) mit Mäusethrombozyten

Für Messungen am Durchflusszytometer wird den Mäusen 50µl Blut mittels einer heparinisierten Glaskapillare entnommen, in ein Reaktionsgefäß mit 300µl Heparin überführt und 1ml Tyrode-Puffer zugegeben. Anschließend werden die Proben für 5min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in 1ml Tyrodepuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt. Final wird das Sediment in 750µl Tyrode-Puffer, der zusätzlich 2mM CaCl₂ enthält, resuspendiert. 50µl des gewaschenen Blutes werden zusammen mit 10µl PE-konjugiertem anti-active αIIbβ3-Antikörper (4H5, JON/A), 10µl FITC-konjugiertem anti-pSelectin-Antikörper (5C8), 10µl FITC-konjugiertem anti-αIIbβ3-Antikörper (14A3), 10µl FITC-konjugiertem anti-Glycoprotein V-Antikörper (89H11) und 5µl Agonistenlösung 6min bei 37°C und 6min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 500µl PBS beendet und innerhalb der nächsten 5 bis 15min analysiert.

4.9. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgt mit GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Angegeben ist der Mittelwert der Daten ± Standardabweichung (SD). Die Signifikanzprüfung erfolgt mittels gepaarten Student's t-Test.

5. Ergebnisse

5.1. Effekte von α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* auf die Aggregation humaner Thrombozyten

Isolierte menschliche Thrombozyten werden durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin konzentrationsabhängig aktiviert (Abb.1). Die höchste verwendete α -Toxinkonzentration von $3\mu\text{g/ml}$ führt zu einer irreversiblen Aggregation, die mit der Aggregation, wie sie von starken Thrombozytenagonisten wie Thrombin oder Kollagen verursacht wird, vergleichbar ist. Dabei ist die maximale Antwort ($34\pm 5\%$) jedoch nur ungefähr halb so groß wie die mit $0,1\text{U/ml}$ Thrombin ($81\pm 9\%$) beobachteten Antwort. Je niedriger die Toxinkonzentration desto mehr verzögert sich das Einsetzen der Aggregation: Mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin beginnt die Aggregation ungefähr 2min nach der Zugabe des Toxins, wohingegen die Aggregation mit $0,18\mu\text{g/ml}$ α -Toxin erst nach 3min einsetzt. Konzentrationen des α -Toxins von $0,06\mu\text{g/ml}$ und weniger führen nicht mehr zu einer Aggregation der Thrombozyten.

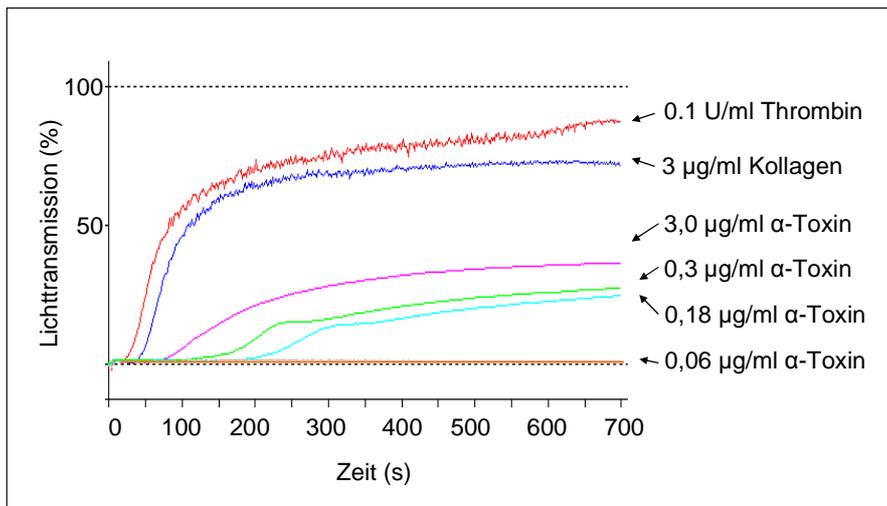


Abbildung 1: α -Toxin-induzierte Aggregation humaner Thrombozyten

Isolierte humane Thrombozyten ($3 \times 10^8/\text{ml}$) wurden bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen von α -Toxin, $0,1\text{U/ml}$ Thrombin und $3\mu\text{g/ml}$ Kollagen unter Rühren stimuliert. Die Aggregation wurde nach der Methode von Born gemessen, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Die Kurven bilden die Lichttransmission in Prozent ab, die mit dem ansteigenden Ausmaß der Aggregation im Vergleich zu Suspensionspuffer zunimmt. Die gezeigten Aggregationsprofile sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente.

5.2. Einfluss von α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* auf die GPIIbIIIa-Aktivierung humaner Thrombozyten

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Aktivierung von Thrombozyten stellt die Durchflusszytometrie dar. Dabei bindet der monoklonale Antikörper PAC-1 an aktiviertes GPIIbIIIa und dient als quantitativer Marker für die Fibrinogenbindung als Grundlage für die Aggregation in der Durchflusszytometrie (Schmitz et al, 1998). Der Zeitverlauf der PAC-1-

Bindung an Thrombin und α -Toxin aktivierte Thrombozyten ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Daten zeigen 1min nach Stimulation mit 0,1U/ml Thrombin eine Aktivierung von GPIIbIIIa von $86\pm 1\%$ der gemessenen Thrombozyten, die sich innerhalb der nächsten 10min nicht verändert. Mit einer α -Toxinkonzentration von $3\mu\text{g/ml}$ wird die maximale GPIIbIIIa-Aktivierung nach 2min bei $21\pm 9\%$ der untersuchten Thrombozyten erreicht. Anschließend fällt die GPIIbIIIa-Aktivierung wieder auf das Niveau von unstimulierten Thrombozyten zurück. Mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin ist die maximale GPIIbIIIa-Aktivierung von $11\pm 6\%$ erst nach 3min erreicht und fällt dann wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Daraus folgt, dass, die in der Durchflusszytometrie gemessene Kinetik der GPIIbIIIa-Aktivierung, durch α -Toxin nicht die in der Aggregationsmessung nach Born erhaltenen Ergebnisse bestätigen, da in der Aggregationsmessung keine Reversibilität beobachtet wird.

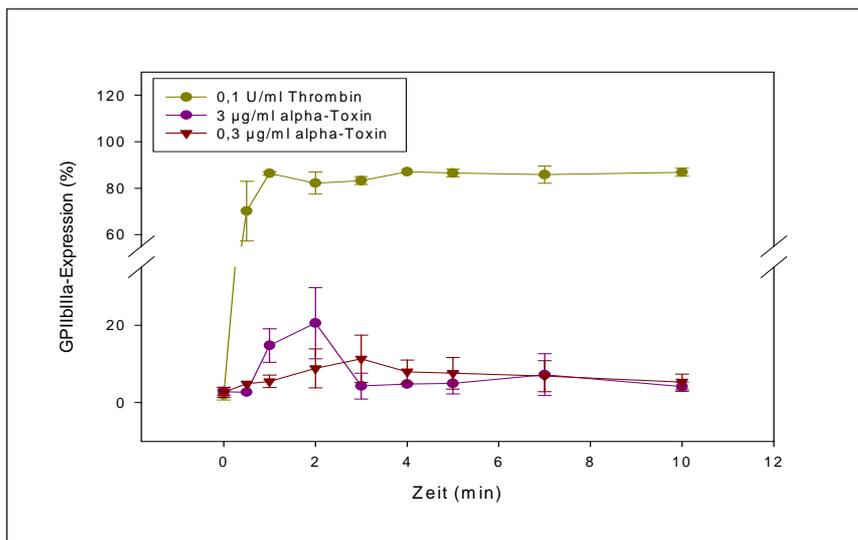


Abbildung 2: Quantifizierung der zeitabhängigen PAC-1-Bindung

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit 0,1U/ml Thrombin, $3\mu\text{g/ml}$ und $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin für die angegebenen Zeiten stimuliert. PAC-1-Bindung wurde, wie im Kapitel Material und Methode beschrieben, gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD für die PAC-1-Bindung aus 5 unabhängigen Experimenten.

5.3. Einfluss von α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* auf die Freisetzung von α -Granula-inhaltsstoffen aus humanen Thrombozyten

Während der Thrombozytenaktivierung werden Granulainhaltsstoffe freigesetzt. Dabei verschmelzen die Membranen der Granula mit der Thrombozytenmembran und es werden auf der Thrombozytenoberfläche spezifische Marker exprimiert. Als Marker für die Freisetzung von Inhaltsstoffen der α -Granula aus aktivierten Thrombozyten dient P-Selectin (CD62), das in ruhenden Thrombozyten in der Membran von α -Granula lokalisiert ist und nach der Verschmelzung der Granulamembran auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird. Der Zeitverlauf der Thrombin sowie α -Toxin induzierten Freisetzung von Inhaltsstoffen der α -Granula, ermittelt aus der P-Selectinexpression, ist in Abbildung 3 dargestellt. Nach Stimulation

mit 0,1U/ml Thrombin kann innerhalb von 3min eine maximale P-Selectinexpression auf der Oberfläche bei $78\pm 4\%$ der untersuchten Thrombozyten gemessen werden. Bei Stimulation mit $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin wird eine maximale P-Selectinexpression nach 3min erreicht, aber mit einer P-Selectinexpression auf der Oberfläche von $11\pm 4\%$ der untersuchten Thrombozyten beträgt diese nur ein siebentel im Vergleich mit der Thrombin induzierten P-Selectinexpression. Mit der niedrigeren Toxinkonzentration von $0,3\mu\text{g/ml}$ ist die P-Selectinexpression auf der Thrombozytenoberfläche weiter verzögert und beträgt nach 4min $9\pm 4\%$.

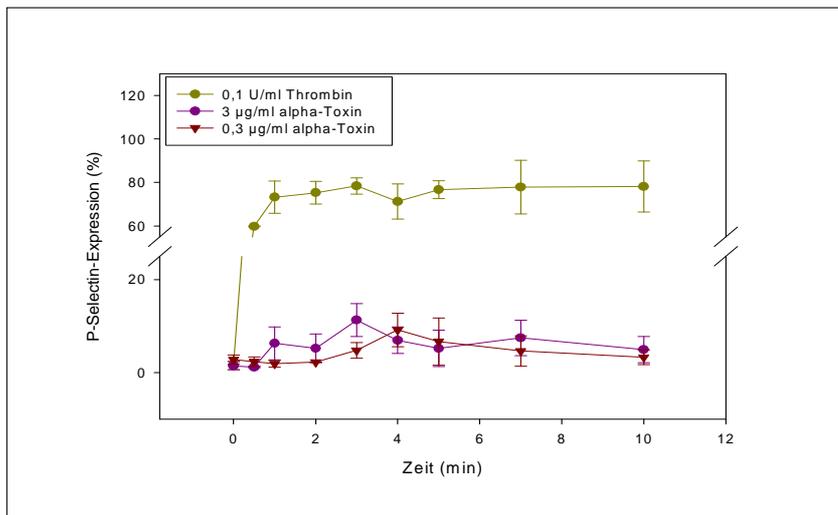


Abbildung 3: Quantifizierung der zeitabhängigen P-Selectinexpression

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit 0,1U/ml Thrombin, $3\mu\text{g/ml}$ und $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin für die angegebenen Zeiten stimuliert. P-Selectinexpression wurde, wie im Kapitel Material und Methode beschrieben, gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD für die P-Selectinexpression aus 4 unabhängigen Experimenten.

5.4. Rolle von ADAM10 bei der α -Toxin abhängigen Thrombozytenaktivierung

Zur Frage nach dem Mechanismus wurde von Wilke et al. (2010) berichtet, dass α -Toxin in humanen Epithelzellen durch ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) wirkt und diese für die Porenbildung notwendig ist. Bereits 2002 konnten Colciaghi et al. auf der Zelloberfläche von humanen Thrombozyten ADAM10 nachweisen. Daher lag es nahe zu prüfen, ob die Wirkung von α -Toxin auf Thrombozyten ADAM10 abhängig ist. Dazu wurden ADAM10-depletierte Thrombozyten mit normalen Wildtyp-Thrombozyten verglichen (Hofmann et al., 2012).

Die Thrombozyten von Wildtypmäusen werden durch α -Toxin von *Staphylococcus aureus* konzentrationsabhängig aktiviert (Abb.4) wie humane Thrombozyten auch. Bei sehr hohen Toxinkonzentrationen von 10 und $20\mu\text{g/ml}$ ist die maximale Aggregation der Wildtyp-mäuse-thrombozyten innerhalb von 10min mit der Antwort auf starke Thrombozytenagonisten wie Kollagen oder Thrombin vergleichbar (Abb.4). Bei niedrigeren Toxinkonzentrationen von 2 bis $5\mu\text{g/ml}$ ist der Beginn der Aggregation wie bei humanen Thrombozyten verzögert.

ADAM10-depletierte Mäuse thrombozyten können in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 20 µg/ml α -Toxin nicht aktiviert werden (Abb.4).

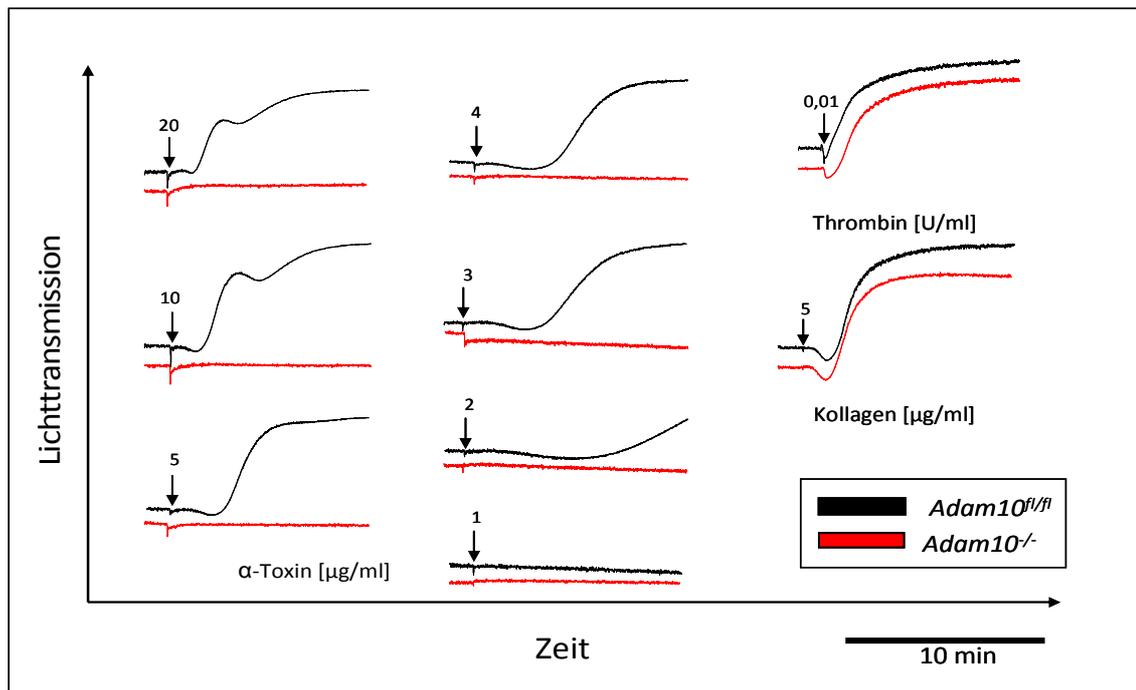


Abbildung 4: Vergleich der α -Toxin-induzierte Aggregation von ADAM10-depletierten Mäuse thrombozyten mit Thrombozyten von Wildtypmäusen

Thrombozyten von ADAM10-depletierten Mäusen und Wildtypmäusen wurden bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen von α -Toxin, 0,01U/ml Thrombin und 5µg/ml Kollagen unter Rühren für 11min stimuliert. Die Aggregation wurde nach der Methode von Born gemessen, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Die Aggregation ist dargestellt als Lichttransmission in Prozent, die mit Zunahme der Aggregate ansteigt. Die gezeigten Aggregationsprofile sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente von 12 Mäusen.

Neben dem Einfluss von ADAM10 auf die Aggregation sollten auch die Effekte auf die GPIIbIIIa-Aktivierung und die Freisetzung von Granulainhaltsstoffen untersucht werden. In Abbildung 5 ist die Bindung von JON/A an aktivierte Thrombozyten dargestellt. JON/A ist ein Antikörper der selektiv an aktiviertes GPIIbIIIa bindet und als quantitativer Marker für die Fibrinogenbindung verwendet werden kann.

Die Aktivierung von GPIIbIIIa auf Thrombozyten von Wildtypmäusen und die ADAM10-depletierten Mäuse thrombozyten erfolgt nur durch α -Toxinkonzentration von 10 und 20µg/ml, mit niedrigeren Toxinkonzentrationen ist keine Aktivierung von GPIIbIIIa nachweisbar.

Der Vergleich von Wildtypmäuse thrombozyten mit ADAM10-depletierten Mäuse thrombozyten zeigt, dass die Aktivierung von GPIIbIIIa durch 10 und 20µg/ml α -Toxin nach einer Stimulationszeit von 10min signifikant gehemmt ist. Verglichen mit α -Toxin führt Thrombin zu einer 4fach höheren GPIIbIIIa-Aktivierung in Wildtypmäuse thrombozyten, während die GPIIbIIIa-Aktivierung durch 10µg/ml CRP (Kollagen relating peptide) verdoppelt wird.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Aggregationsanalyse, wo für ADAM10-depletierten Mäuse thrombozyten nach Stimulation mit α -Toxin keine Aggregation beobachtet wird, während die Thrombin-induzierte Aggregation nicht betroffen ist.

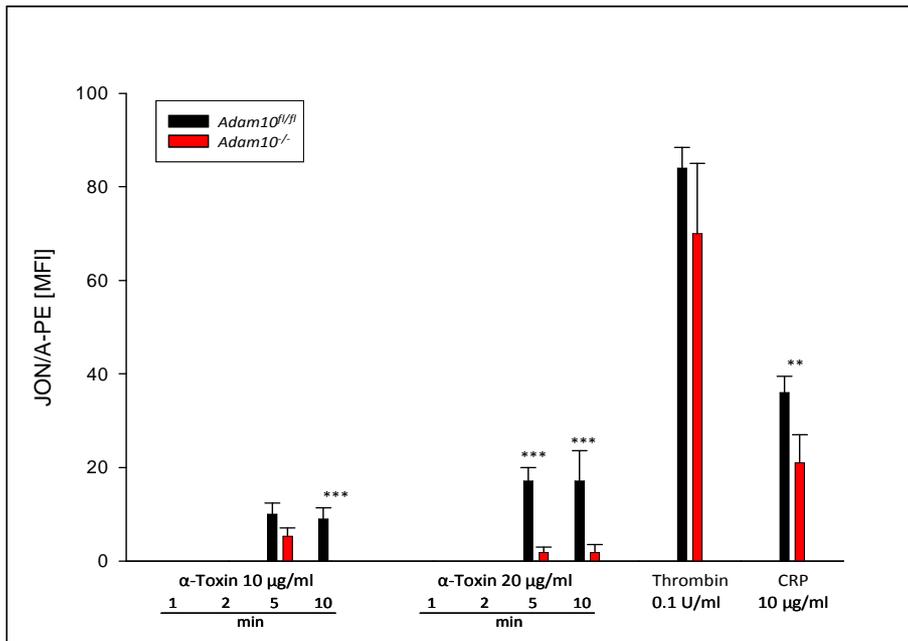


Abbildung 5: Quantifizierung der zeitabhängigen Aktivierung von GPIIb/IIIa auf ADAM10-depletierten Mäusethrombozyten durch α -Toxin

Mäusethrombozyten wurden mit 0,1U/ml Thrombin, 10 μ g/ml CRP (Kollagen relating peptide), 10 μ g/ml und 20 μ g/ml α -Toxin für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Expression von GPIIb/IIIa auf der Oberfläche der Mäusethrombozyten wurde, wie im Kapitel Material und Methode beschrieben, gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD für die GPIIb/IIIa-Aktivierung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Für die irreversible Aggregation ist die Freisetzung von Granulainhaltsstoffen wie ADP Voraussetzung. Im nächsten Schritt haben wir deshalb die P-Selectinexpression auf der Thrombozytenoberfläche untersucht, da P-Selectin (CD62) als Marker für die Freisetzung von Inhaltsstoffen der α -Granula aus aktivierten Thrombozyten dient.

Nach Stimulation mit α -Toxinkonzentrationen von 10 und 20 μ g/ml ist die Freisetzung von α -Granulainhaltstoffen aus ADAM10-depletierten Mäusethrombozyten im Vergleich zu den Thrombozyten von Wildtypmäusen nicht verändert (Abb.6). Erst nach einer Stimulationszeit von 10min ist eine signifikante Hemmung der P-Selectinexpression zu beobachten. Im Vergleich mit Thrombin ist die P-Selectinexpression auf Mäusethrombozyten reduziert, wie auch bei humanen Thrombozyten.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass ADAM10 für die Bindung von α -Toxin an die Zelloberfläche und der resultierenden Aktivierung eine unabdingbare Voraussetzung darstellt.

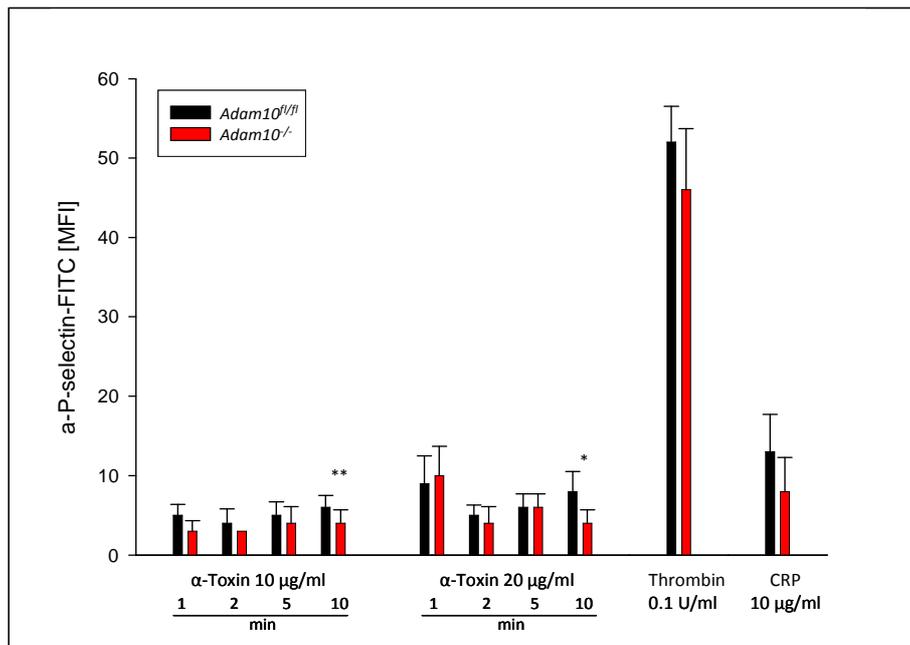


Abbildung 6: Quantifizierung der zeitabhängigen P-Selectinexpression auf ADAM10-depletierten Mäusethrombozyten durch α -Toxin

Mäusethrombozyten wurden mit 0,1U/ml Thrombin, 10 μ g/ml CRP (Collagen relating peptide) und 1 μ g/ml, 10 μ g/ml und 20 μ g/ml α -Toxin für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die P-Selectinexpression wurde, wie im Kapitel Material und Methode beschrieben, gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD für die GPIIb/IIIa-Aktivierung aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.5. Konzentrationsabhängige Effekte von α -Toxin auf die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung

Unter physiologischen Bedingungen können humanen Thrombozyten auch durch Thrombin aktiviert werden. In Folge dieser Aktivierung kommt es zu einer Vielzahl von Phosphorylierungen von Proteinen an Tyrosinresten, die in zeitlich unterschiedlichen Phasen verlaufen (Fälker et al., 2005; Ferrell und Martin, 1988). Zur systematischen Beschreibung der zeitabhängigen Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten wurden humane Thrombozyten für verschiedene Zeiten mit α -Toxin stimuliert. Die Untersuchung der Signaltransduktion von α -Toxin behandelten Thrombozyten zeigt ein Muster von an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen, welches dem Muster sehr ähnlich ist, das mit wichtigen Agonisten wie Kollagen und Thrombin (Abb.7) beobachtet wird. Der Zeitverlauf der Tyrosinphosphorylierung ist dabei von der Toxinkonzentration abhängig. Bei der Verwendung von 3 μ g/ml α -Toxin ist die maximale Tyrosinphosphorylierung fast aller beteiligten Proteine am höchsten und tritt innerhalb von 30s ein und damit schneller als mit niedrigeren Toxinkonzentrationen (Abb.7). Zur Bestätigung, dass in allen Proben identische Proteinmengen enthalten sind, wurde der Gesamtgehalt des kleinen GTP-bindenden Proteins RAN, das keiner proteolytischen Degradation unterliegt, in den einzelnen Proben bestimmt.

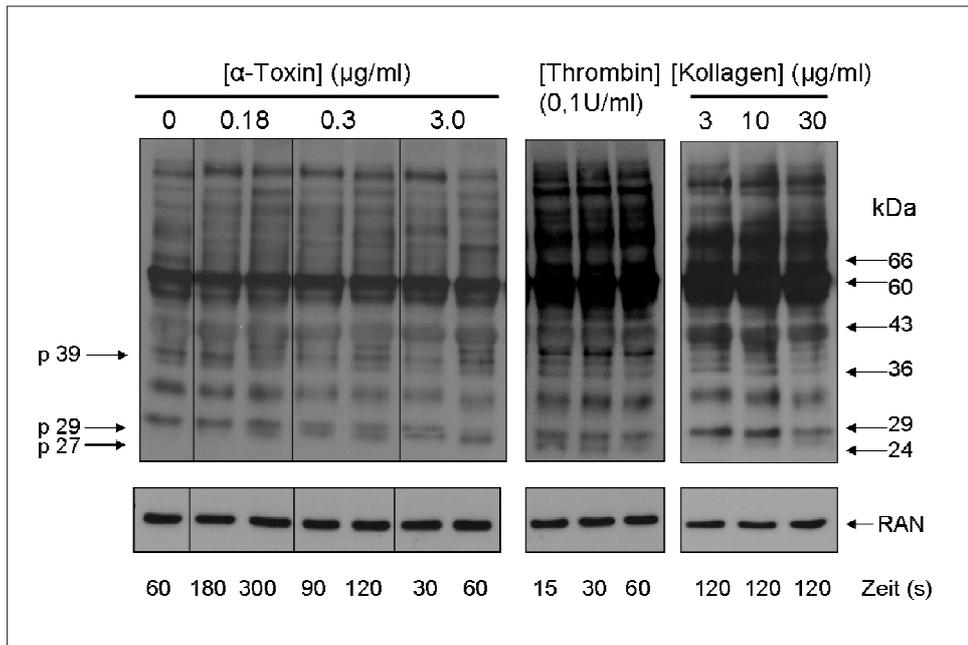


Abbildung 7: Konzentrationsabhängigkeit der α -Toxin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten

Gewaschene humane Thrombozyten wurden mit verschiedenen Agonisten für die jeweils angegebenen Zeiten unter ständigem Rühren bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine wurde der monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 eingesetzt. Zum quantitativen Vergleich der Proteinmengen wurde in jeder einzelnen Probe mit dem Anti-RAN-Antikörper die RAN-Menge bestimmt (unterer Teil der Abbildung).

Die dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils drei gleiche, unabhängige Experimente. Der Index am rechten Bildrand markiert Molmassen standardisierter Proteine in kDa. Am linken Bildrand sind die Molmassen von 3 Proteinen gekennzeichnet, bei denen sich die Menge der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine im zeitlichen Verlauf ändert

α -Toxin führt nicht nur zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten, sondern bewirkt auch in direktem zeitlichen Anschluss eine rasche Dephosphorylierung fast aller an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine, die besonders bei Proteinen mit einer relativen Molmasse kleiner als 60kDa ausgeprägt ist (Abb.8). Bei der Inkubation mit 3 μ g/ml α -Toxin tritt die Dephosphorylierung bereits nach 90s ein, wohingegen die Dephosphorylierung mit der sehr niedrigen α -Toxinkonzentration von 0,18 μ g/ml erst nach 10min sichtbar wird.

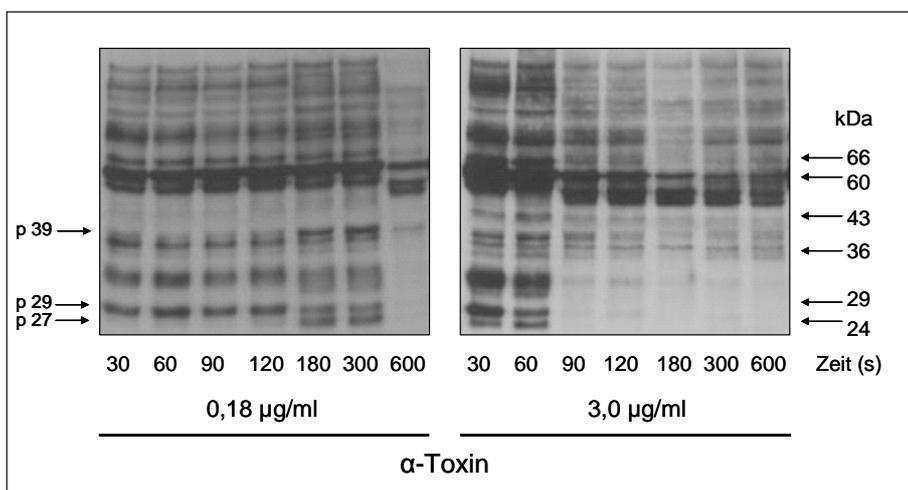


Abbildung 8: Zeitabhängigkeit der α -Toxin-induzierten Phosphorylierung an Tyrosinresten

Gereinigte humane Thrombozyten wurden mit α -Toxin (links: 0,18 μ g/ml, rechts: 3 μ g/ml) unter ständigem Rühren für die jeweils angegebenen Zeiten bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Die Detektion der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine erfolgte mittels des monoklonalen 4G10-Antikörpers.

Die dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils drei gleiche, unabhängige Experimente. Am linken Bildrand sind die Molmassen von 3 Proteinen gekennzeichnet, bei denen sich die Menge der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine im zeitlichen Verlauf ändert. Der Index am rechten Bildrand markiert Molmassen standardisierter Proteine in kDa.

In unstimulierten Thrombozyten sind die Proteine von 29kDa (p29) und 39kDa (p39) bereits an Tyrosinresten phosphoryliert. Nach Stimulation mit α -Toxin nehmen diese Phosphorylierungen zu und es kommt ein an Tyrosinresten phosphoryliertes Protein mit 27kDa (p27) hinzu. Wie aus den Zeitverläufen dieser 3 Proteinen zu erkennen ist, hängt die maximale Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten und die nachfolgende Dephosphorylierung von der Toxinkonzentration ab (Tab.1). Die maximale Proteintyrosinphosphorylierung der drei Proteine wird mit einer Toxinkonzentration von 3 μ g/ml innerhalb von 1min erreicht und verschiebt sich bis zu 5min bei der niedrigsten Toxinkonzentration von 0,18 μ g/ml. Innerhalb von 10min werden alle 3 Proteine dephosphoryliert, variieren aber im Grad der Dephosphorylierung. Im Vergleich zu p27 und p29 wird p39 langsamer und unvollständig dephosphoryliert besonders mit 0,18 μ g/ml α -Toxin.

Tabelle 1: Zeitabhängige Änderungen der Tyrosinphosphorylierungen von p27, p29 und p39 nach Stimulation mit α -Toxin

	SP	[α -Toxin]	30s	60s	90s	120s	180s	300s	600s
p27	36 \pm 4 (9)	0.18 μ g/ml	38 \pm 9 (5)	35 \pm 9 (6)	45 \pm 10 (5)	49 \pm 7 (10)	75 \pm 16 (6)	98 \pm 2 (8)	7 \pm 5 (4)
	5 \pm 6 (7)	0.3 μ g/ml	12 (2)	16 \pm 7 (5)	55 \pm 18 (4)	93 \pm 4 (8)	54 \pm 20 (6)	6 \pm 6 (6)	0 \pm 0 (3)
	4 \pm 4 (7)	3.0 μ g/ml	54 \pm 4 (3)	100 (6)	32 \pm 18 (4)	6 \pm 5 (5)	0 \pm 0 (4)	0 \pm 0 (4)	1 \pm 1 (3)
p29	86 \pm 4 (9)	0.18 μ g/ml	89 \pm 6 (5)	87 \pm 6 (6)	85 \pm 6 (5)	91 \pm 4 (10)	73 \pm 11 (6)	63 \pm 9 (8)	5 \pm 4 (4)
	73 \pm 7 (7)	0.3 μ g/ml	83 \pm 9 (3)	84 \pm 3(6)	96 \pm 2 (5)	89 \pm 5 (9)	56 \pm 19 (5)	2 \pm 1 (7)	1 \pm 1 (5)
	74 \pm 14 (4)	3.0 μ g/ml	100 (4)	82 \pm 11 (6)	27 \pm 13 (4)	2 \pm 1 (4)	2 \pm 2 (4)	0 \pm 0 (4)	1 \pm 0 (3)
p39	74 \pm 7 (9)	0.18 μ g/ml	71 \pm 14 (5)	74 \pm 13 (6)	76 \pm 13 (5)	75 \pm 6 (10)	86 \pm 6 (6)	95 \pm 5 (8)	40 \pm 16 (4)
	58 \pm 7 (7)	0.3 μ g/ml	50 \pm 2 (3)	53 \pm 11 (7)	77 \pm 7 (9)	90 \pm 5 (9)	69 \pm 14 (7)	44 \pm 11 (7)	19 \pm 5 (4)
	50 \pm 8 (6)	3.0 μ g/ml	61 \pm 13 (4)	100 (6)	65 \pm 11 (4)	35 \pm 5 (4)	28 \pm 11 (3)	18 \pm 5 (4)	19 \pm 10 (3)

Gereinigte humane Thrombozyten wurden mit verschiedenen α -Toxinkonzentrationen unter ständigem Rühren für die jeweils angegebenen Zeiten bei 37°C stimuliert. Die Proben für die Kontrollen wurden mit Suspensionspuffer (SP) anstelle von α -Toxin für 90 oder 120s inkubiert.

Die Phosphorylierungsmuster von mehreren Experimenten (in Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben), wie in den Abbildungen 7 und 8 exemplarisch dargestellt, wurden wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, durch densitometrische Analyse quantifiziert. Dabei wurde die jeweils höchste Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,18 μ g/ml, 0,3 μ g/ml und 3 μ g/ml α -Toxin als 100% für das jeweilige Protein festgelegt. Die relativ hohen Werte für die Intensität des Phosphoproteinsignals in den Kontrollproben mit Suspensionspuffer verglichen mit den maximalen Phosphorylierungsintensitäten nach Stimulation mit 0,18 μ g/ml α -Toxin bei 300s ergeben sich daraus, dass die maximale Intensität des Phosphoproteinsignals relativ niedrig ist, verglichen mit der Intensität des Phosphoproteinsignals mit höheren Toxinkonzentrationen. Die, in der Tabelle, gezeigten Intensitäten sind Mittelwerte \pm SD in Prozent.

5.6. Vergleich der Effekte von α -Toxin und der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) auf die Proteintyrosinphosphorylierung

Die zellulären Effekte von α -Toxin auf Thrombozyten werden auf die Porenbildung und den damit verbundenen Kalziumeinstrom in die Zelle zurückgeführt (Bhakdi et al., 2005). Deshalb wird das Proteintyrosinphosphorylierungsmuster und dessen Zeitverlauf am Beispiel von p27 mit der gut charakterisierten Kalziumionophore Calcimycin (A23187) verglichen (Abb.9). Im linken Teil ist die Tyrosinphosphorylierung und Dephosphorylierung dargestellt. Das abgebildete Phosphorylierungsmuster von Calcimycin (Abb.9, links) ist im zeitlichen Verlauf dem Muster von 3 μ g/ml α -Toxin sehr ähnlich (Abb.8). Eine vergleichende Analyse ist exemplarisch für p27 im rechten Teil gezeigt. Bei der Verwendung von 3 μ g/ml α -Toxin oder 10 μ M Calcimycin wird die maximale Proteintyrosinphosphorylierung nach 1min erreicht und fällt anschließend nahezu vollständig ab. Bei der Inkubation mit 0,3 μ g/ml α -Toxin ist die p27-Tyrosinphosphorylierung verzögert (Maximum nach 5min). Innerhalb von weiten 5min kommt es zu einer vollständigen Dephosphorylierung.

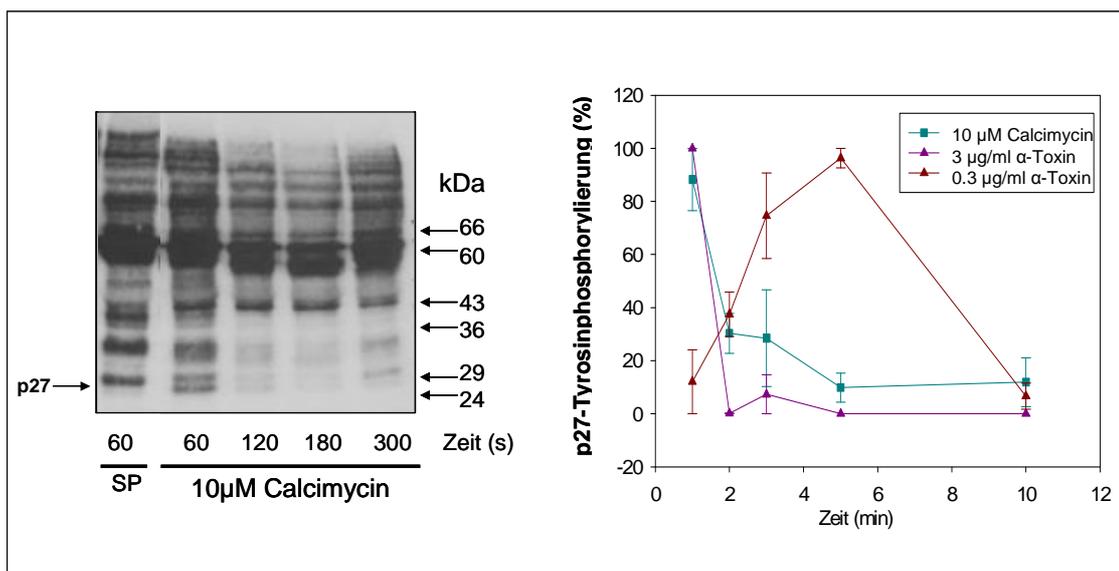


Abbildung 9: Effekt der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) auf die p27-Tyrosinphosphorylierungen

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit unterschiedlichen Agonisten bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Die Detektion der an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine erfolgte mittels des monoklonalen 4G10-Antikörpers. Die dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils drei gleiche, unabhängige Experimente.

Links: Stimulation mit 10 μ M Calcimycin (A23187). Die Kontrollen wurden mit Suspensionspuffer (SP) anstelle von Calcimycin durchgeführt. Die Pfeile markieren die Molmassen standardisierter Proteine in kDa.

Rechts: Quantifizierung der p27-Phosphorylierung. Die Phosphorylierungsmuster von 6 Experimenten, wie in den Abbildungen 7 und 8 exemplarisch dargestellt, wurden wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, durch densitometrische Analyse quantifiziert. Dabei wurde die jeweils höchste Intensität des Phosphoproteinsignals für 10 μ M Calcimycin, 0,3 μ g/ml und 3 μ g/ml α -Toxin als 100% festgelegt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD in Prozent.

5.7. Zeitabhängige Phosphorylierung von Proteinkinase B-Substraten

Proteinkinase B (PKB, Akt), eine Serin/Threoninkinase, ist in die Regulation verschiedener Thrombozytenfunktionen, wie Aggregation, Sekretion und Thrombusbildung, involviert (Woulfe 2010). In humanen Thrombozyten sind drei Isoformen, Akt 1, Akt 2 und Akt 3, bekannt, die unterschiedliche Substrate phosphorylieren. Zur Untersuchung der α -Toxin-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase B, haben wir die Phosphorylierung von einigen Substraten untersucht. In Abbildung 10 (links) ist die Phosphorylierung verschiedener Akt-Substrate durch α -Toxin dargestellt. Nach Stimulation mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin ist die Phosphorylierung von PRAS40 deutlich zu erkennen. Das Maximum der Phosphorylierung wird 5min nach Stimulationsbeginn erreicht.

Abbildung 10 (rechts) zeigt die quantitative Analyse der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von PRAS40 im Vergleich mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen ($0,1\text{--}3\text{U/ml}$). Die Zunahme der Phosphorylierung nach Thrombinstimulation ist bereits nach 2min deutlich zu erkennen, wohingegen die Phosphorylierung mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin erst nach 3min beginnt und ihr Maximum bei 5min erreicht. Nachfolgend kommt es innerhalb von 10min zu einer vollständigen Dephosphorylierung. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass durch die α -Toxinwirkung, neben Tyrosinphosphatasen auch Serin/Threoninphosphatasen aktiviert werden.

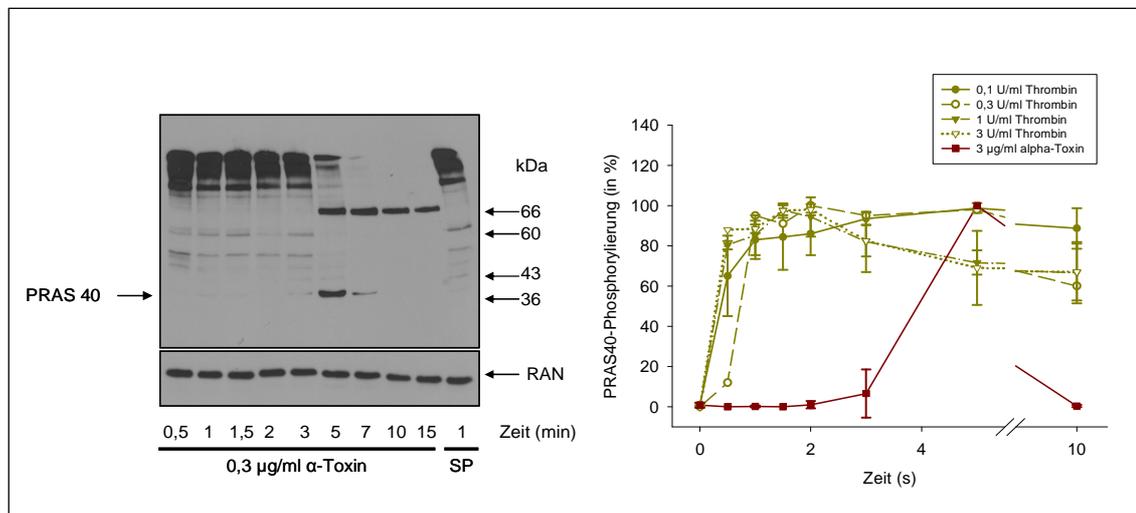


Abbildung 10: Zeitabhängige Phosphorylierung von Substraten der Proteinkinase B (Akt)

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Die Detektion der an Serin- und Threoninresten phosphorylierten Proteine erfolgte mit einem monoklonalen Akt-Substrat-Antikörper. Zum quantitativen Vergleich der Proteinmengen wurde in jeder einzelnen Probe mit dem Anti-RAN-Antikörper die RAN-Menge bestimmt. Die dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils drei gleiche, unabhängige Experimente.

Links: Stimulation mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin. Die Kontrollen wurden mit Suspensionspuffer (SP) anstelle von α -Toxin durchgeführt. Die Pfeile markieren die Molmassen standardisierter Proteine in kDa.

Rechts: Quantifizierung der Phosphorylierung des Prolin-reichen Akt-Substrats von 40kDa (PRAS40). Die Intensität der Phosphorylierung von PRAS40, wie in der linken Abbildung dargestellt, wurde durch densitometrische Analyse quantifiziert. Dabei wurde die jeweils höchste Intensität des Phosphoproteinsignals für die verschiedenen Thrombinkonzentration und $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin als 100% festgelegt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD.

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Proteinkinase B auf die Aggregation untersucht. Tabelle 2 zeigt die quantitative Auswertung von Aggregationskurven nach 5-minütiger Stimulation mit α -Toxin, Thrombin und Kollagen. Durch Vorinkubation mit dem Akt-Inhibitor XVIII (SC-66), einem unspezifischen Inhibitor der Proteinkinase B, lässt sich die Aggregation mit 0,3 μ g/ml und 3 μ g/ml α -Toxin um 34% bzw. 37% und mit 0,1U/ml Thrombin um 96% hemmen. Im Gegensatz dazu ist die Aggregation mit 3 μ g/ml Kollagen deutlich weniger betroffen (Hemmung um 14%). Da die Kollagen-induzierten Signalwege eine ausgeprägte Abhängigkeit von Akt1 zeigen (Dangelmaier et al., 2013), führen diese Ergebnisse zu der Annahme, dass der Akt-Inhibitor XVIII die Akt1-Isoform weniger beeinflusst.

Tabelle 2: Effekte des Akt-Inhibitors XVII (SC-66) auf die Aggregation humaner Thrombozyten

	Kontrolle	0,3 μ g/ml α -Toxin	3 μ g/ml α -Toxin	0,1 U/ml Thrombin	3 μ g/ml Kollagen
Puffer	2 \pm 1 (n=6)	15 \pm 6 (n=22)	35 \pm 5 (n=20)	86 \pm 7 (n=25)	70 \pm 11 (n=25)
10 μ M Akt-Inhibitor XVII	1 \pm 1 (n=3)	10 \pm 7 (n=5)	22 \pm 7 (n=5)	3 \pm 5 (n=5)	60 \pm 8 (n=5)

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 5min mit dem Akt-Inhibitor XVII vorinkubiert und anschließend mit den angegebenen Agonisten bei 37°C unter rühren stimuliert. Die Aggregation wurde nach der Methode von Born gemessen, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD in Prozent der Lichttransmission, die mit dem ansteigenden Ausmaß der Aggregation zunimmt in Vergleich zu Suspensionspuffer, gemessen 5min nach Agonistzugabe. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

5.8. Kalziumabhängige Effekte von α -Toxin auf die zelluläre Proteintyrosinkinase Src

Die Aktivierung von Thrombozyten mit α -Toxin führt einerseits zur Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen und andererseits auch zur charakteristischen Spaltung eines Proteins mit einer relativen Molmasse von 60kDa. Bei diesem Protein handelt es sich um Src, die häufigste zelluläre Proteintyrosinkinase in Thrombozyten. Nach Stimulation mit 3 μ g/ml α -Toxin wird Src zeitabhängig gespalten (Abb.11). In Gegenwart von 2mM extrazellulärem Kalzium, ist innerhalb von 2min eine proteolytische Spaltung von Src nachweisbar. Parallel dazu ist die Bildung eines 54kDa Bruchstücks und eine kleine Menge eines 52kDa Bruchstücks zu beobachten. Das Maximum der proteolytischen Degradation ist nach 5-minütiger Inkubation mit 3 μ g/ml α -Toxin erreicht. Innerhalb von weiteren 5min nimmt die Menge an Degradationsprodukten nur noch geringfügig zu (Abb.12, links).

Die Quantifizierung der Degradation zeigt Abbildung 12 (rechts). Ohne zusätzliches Kalzium im Suspensionspuffer kommt es zu keiner Zunahme der Degradation innerhalb von 5min, woraus sich eine offensichtliche Kalziumabhängigkeit der Src-Degradation ableiten lässt. In Gegenwart von 2mM Kalzium im Suspensionspuffer werden hingegen etwa 50% der

vorhandenen Proteinmenge von Src gespalten. Gleichzeitig vergrößert sich die Menge des 54kDa Bruchstücks auf $47 \pm 11\%$ der Gesamtproteinmenge von Src.

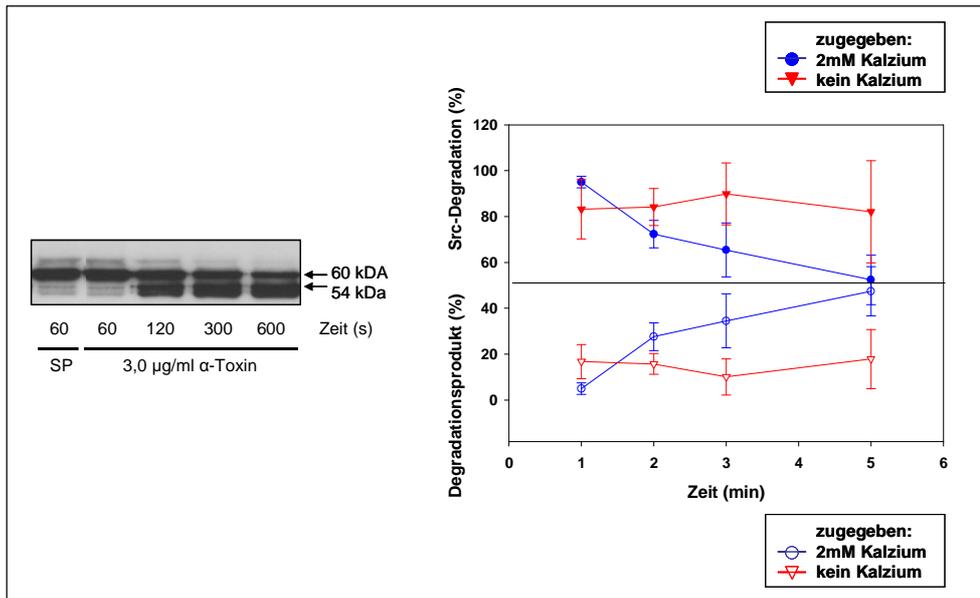


Abbildung 11: α -Toxin-induzierte proteolytische Degradation der Proteintyrosinkinase Src

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten in Suspensionspuffer (2mM Kalzium) oder in modifizierten Suspensionspuffer (ohne zugegebenem Kalzium mit 1mM Citrat) stimuliert. Thrombozyten wurden mit $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Src und seine Abbauprodukte wurden mit dem monoklonalen Antikörper mAb327 detektiert. Links: Zeitabhängige Spaltung von Src. Die Pfeile markieren die Position von Src und seinen 54 und 52kDa Abbauprodukten. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente in Gegenwart von 2mM Kalzium in Suspensionspuffer.

Rechts: Quantitative Auswertung der Src-Spaltung. Durch densitometrische Auswertung der Ergebnisse auf der linken Seite in Gegenwart von 2mM Kalzium (Kreise) und gleiche Experimente ohne zusätzliches Kalzium (Dreiecke) wurde das Verhältnis von Src und seinen Abbauprodukten ermittelt. Dabei wurde die Summe der Intensitäten der Proteinsignale von Src und seinen Abbauprodukten für die jeweilige Zeit als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD.

Auf der Suche nach dem Src-spaltenden Enzym rückte die kalziumabhängige Protease Calpain in den Fokus. Es wurde erstmalig von Oda et al. (1993) gezeigt, dass in menschlichen Thrombozyten Src ein Substrat von Calpain ist und nach Stimulation mit diversen Agonisten gespalten wird. Calpeptin, ein zellmembrangängiger Hemmstoff von Calpain, ist im Stande die Degradierung von Src in α -Toxin-stimulierten Thrombozyten zu verhindern (Abb.13). Mit $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin hemmt Calpeptin die Degradation von Src vollständig, wodurch sich ableiten lässt, dass die Protease Calpain, wie vermutet, für die Spaltung von Src verantwortlich ist.

Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass in einem Suspensionspuffer ohne zusätzliches Kalzium und in Gegenwart von 1mM Citrat (pH 7.4), welches einer kalkulierten Kalziumkonzentration von $\leq 5\mu\text{M}$ entspricht, nach Stimulation mit $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin keine zeitabhängige Zunahme der Degradierung von Src beobachtet wird. Im Gegensatz zu Thrombozyten, die mit Calpeptin behandelt sind, wird die Degradation von Src in einem Suspensionspuffer ohne zusätzliches Kalzium nicht vollständig gehemmt.

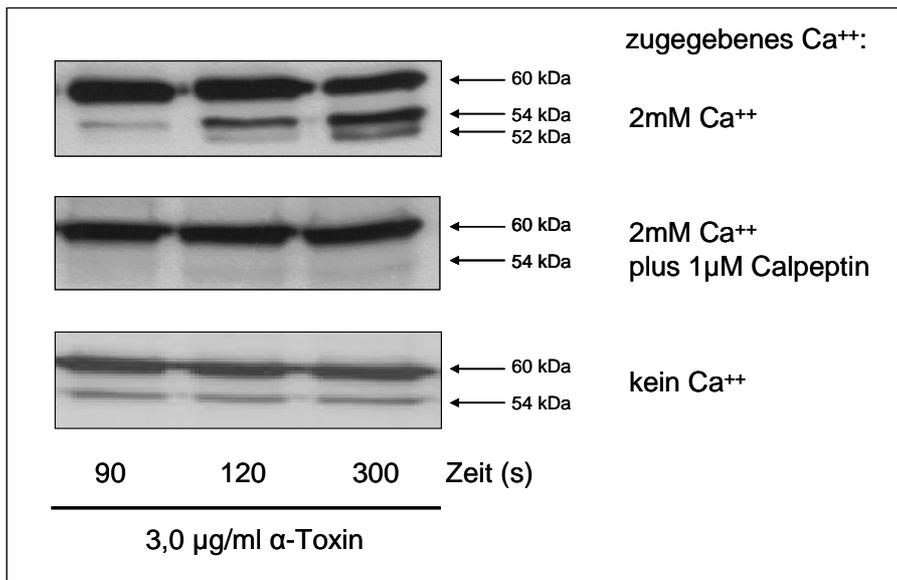


Abbildung 12: Inhibierung der proteolytischen Spaltung von Src

Gewaschene humane Thrombozyten wurden mit Suspensionspuffer (2mM Ca²⁺), mit Suspensionspuffer mit 1µM Calpeptin für 5min oder mit modifiziertem Suspensionspuffer ohne zugegebenem Kalzium und mit 1mM Citrat (pH 7,4) inkubiert. Zur Aktivierung wurden die Thrombozyten mit 3µg/ml α-Toxin für die angegebenen Zeiten unter ständigem Rühren bei 37°C stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Src und seine Abbauprodukte wurden mittels des monoklonalen Antikörpers mAb327 detektiert. Die Pfeile markieren die Position von Src und seinen Abbauprodukten. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

5.9. Effekte auf die Src-Autophosphorylierung

Die Autophosphorylierung von Src an Tyr-416 wird als indirektes Maß für den enzymatischen Aktivierungszustand betrachtet (Irtegun et al., 2013). In Abbildung 13 ist die Src-Autophosphorylierung an Tyr-416 für verschiedenen Agonisten dargestellt. Mit starken Thrombozytenagonisten wie Thrombin und der Kalziumionophore Calcimycin wird eine maximale Tyr-416-Phosphorylierung innerhalb von 30s erreicht. Gleiches wird auch für 3µg/ml α-Toxin beobachtet, während das Maximum der Tyr-416-Phosphorylierung mit 0,3µg/ml α-Toxin bis zu 120s verzögert ist. Sowohl nach Stimulation mit den beiden α-Toxinkonzentrationen als auch mit Calcimycin kommt es zu einer ausgeprägten, vollständigen Dephosphorylierung innerhalb von 10min. Im Gegensatz dazu stagniert mit 0,1U/ml Thrombin die Dephosphorylierung auf einem Niveau vergleichbar mit unstimulierten Thrombozyten.

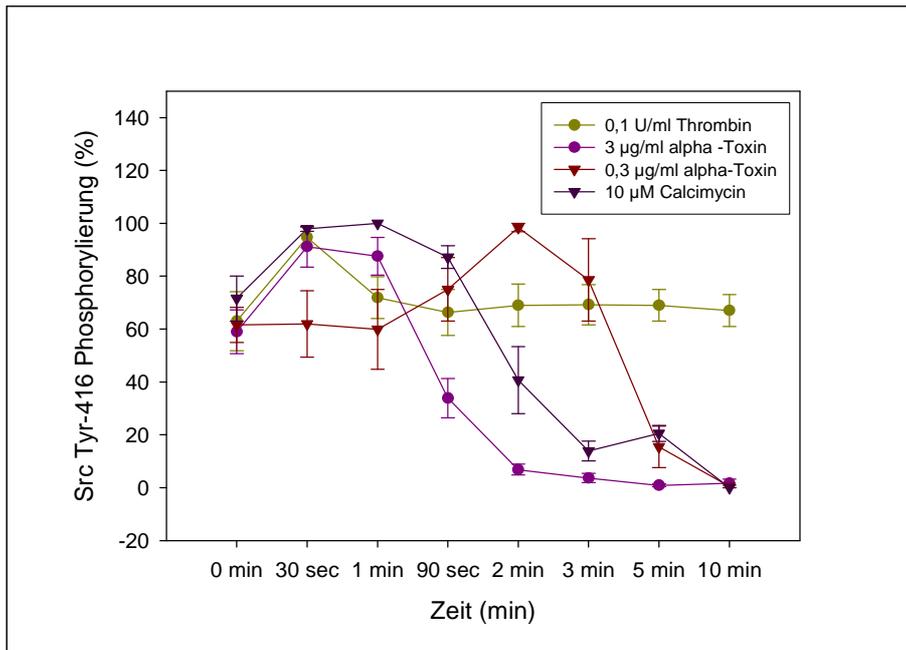


Abbildung 13: Zeitabhängige Änderungen der Src-Autophosphorylierung durch verschiedenen Agonisten

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit verschiedenen Agonisten bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Autophosphorylierung von Src wurde ein polyklonaler Antikörper, der die Src-Autophosphorylierungsstelle Tyrosin-416 erkennt, verwendet. Dabei wurde die jeweils höchste Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,1U/ml Thrombin, 10µM Calcimycin, 0,3µg/ml und 3µg/ml α -Toxin als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD.

5.10. Die Inhibierung von Calpain verhindert die Thrombozytenaggregation

Calpain ist an einer Vielzahl von Signalwegen in Thrombozyten beteiligt, wie der Aggregation, Sekretion und Ausbildung von Pseudopodien (Kuchay und Chishti 2007). Deshalb haben wir die Wirkung von Calpain auf die α -Toxin-induzierte Aggregation untersucht. In Gegenwart des Calpaininhibitor Calpeptin (1µM/ml) wird die Aggregation bei einer α -Toxinkonzentration von 0,3µg/ml fast vollständig gehemmt (Abb.14). Mit einer 10-fachen höheren Konzentration von α -Toxin (3µg/ml) wird die Aggregation kaum gehemmt. Ähnliche konzentrationsabhängige Effekte werden auch mit Calcimycin beobachtet, wohingegen mit 0,1U/ml Thrombin kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass Calpain bei niedrigen Konzentrationen von α -Toxin funktionell eine wichtigere Rolle zukommt als bei höheren Toxinkonzentrationen.

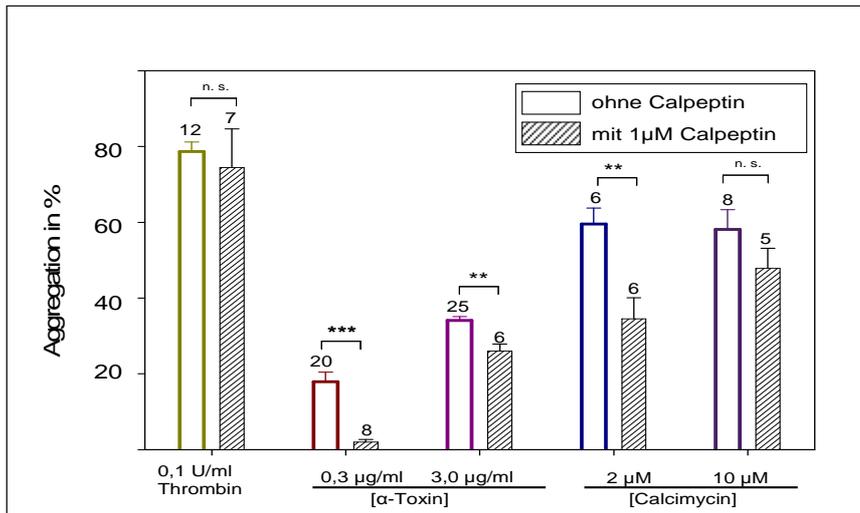


Abbildung 14: Effekte von Calpeptin auf die α -Toxin abhängige Aggregation humaner Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten wurden entweder mit Suspensionspuffer oder mit $1\mu\text{M}$ Calpeptin (in Suspensionspuffer) für 5min bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend mit den angegebenen Agonisten aktiviert. Die Daten sind Mittelwerte in $\% \pm \text{SD}$ der Lichttransmission, die mit dem ansteigen Ausmaß der Aggregation im Vergleich zu Suspensionspuffer zunimmt, gemessen 4min nach Beginn der Stimulation. Die Zahlen über den Blaken geben ist die Anzahl an gleichen Experimenten an. Die Signifikanzprüfung erfolgte mit einem gepaarten t-Test: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns (nicht signifikant).

5.11. Modulation der α -Toxin-induzierten Thrombozytenaggregation

Die für die α -Toxin-induzierte Aggregation gezeigte Abhängigkeit von der Protease Calpain warf die Frage auf, ob Mitglieder der Src-Familie beteiligt sind. In Abbildung 15 ist die Wirkung von verschiedenen Hemmstoffen der Familie der Src-Kinasen (SFK) auf die mit $0,1\text{U/ml}$ Thrombin, $3\mu\text{g/ml}$ Kollagen sowie 3 und $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin hervorgerufene Aggregation dargestellt. Die SFK-Hemmstoffe PP1, PP2 und SU6656 hemmen die Aggregation mit α -Toxin ($0,3\mu\text{g/ml}$) um circa 50%, wohingegen das inaktive PP2-Analoga PP3 keine Wirkung zeigt. Ähnliche Ergebnisse werden auch für $3\mu\text{g/ml}$ Kollagen erhalten. Im Gegensatz dazu haben die Inhibitoren auf die durch $0,1\text{U/ml}$ Thrombin und $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin hervorgerufene Aggregation nur geringfügige Effekte. Für den Inhibitor Dasatinib ist der Effekt bei $3\mu\text{g/ml}$ Kollagen stark ausgeprägt, die Aggregation jedoch hervorgerufen durch Thrombin und α -Toxin ist kaum beeinflusst.

In Abbildung 15 ist ebenfalls die Beteiligung des Thromboxan A_2 -Rezeptors an der Aggregation dargestellt. Nach Vorinkubation mit SQ29548, einem spezifischen Thromboxan A_2 -Rezeptor-Antagonisten, ist bei anschließender Stimulation mit Thrombin keine Hemmung zu erkennen. Bei gleicher Vorinkubation und anschließender Stimulation mit Kollagen und α -Toxin (beide Konzentrationen) ist die Aggregation signifikant gehemmt (Tab.3).

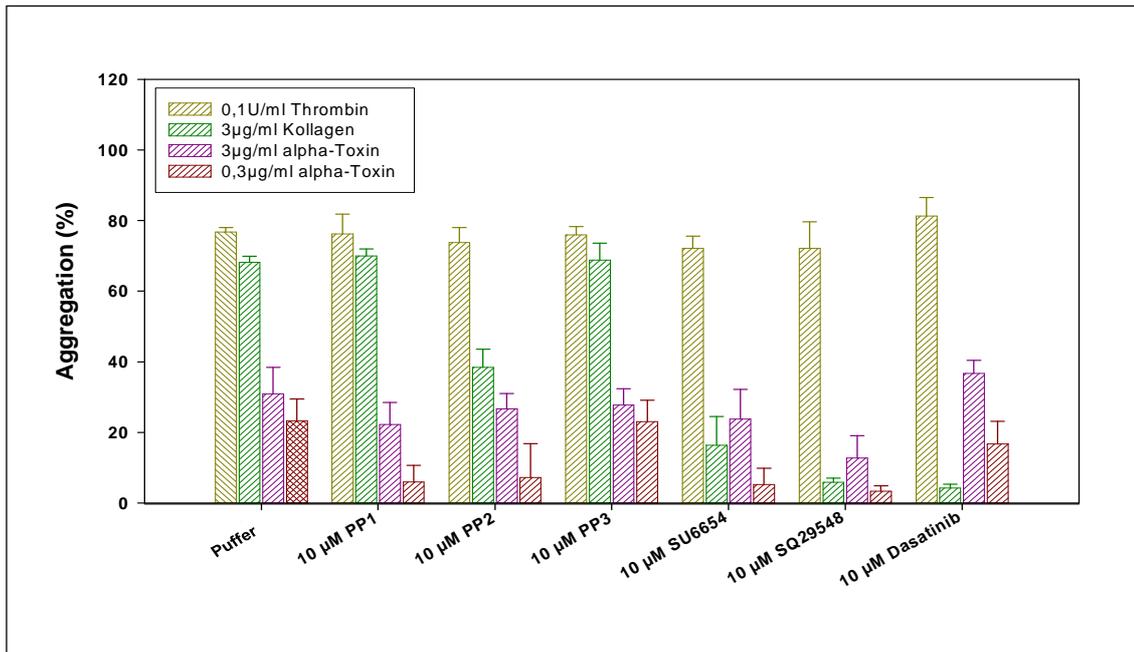


Abbildung 15: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die Aggregation humaner Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten wurden mit je 10µM der verschiedenen Inhibitoren PP1, PP2, PP3, SU6656 und Dasatinib sowie dem Thromboxan A₂-Rezeptorantagonisten SQ29548 in Suspensionspuffer für 5min bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend mit 0,1U/ml Thrombin, 3µg/ml Kollagen oder 3µg/ml und 0,3µg/ml α-Toxin aktiviert. Die Daten sind Mittelwerte in % ± SD der Lichttransmission, die mit dem ansteigen Ausmaß der Aggregation im Vergleich zu Suspensionspuffer zunimmt, gemessen 4min nach Beginn der Stimulation nach der Methode von Born.

Tabelle 3: Signifikanztabelle zu Abbildung 15

	10 µM PP1	10 µM PP2	10 µM PP3	10 µM SU6656	10 µM Dasatinib	10 µM SQ29548
0,1 U/ml Thrombin	n.s. p=0,64	n.s. p=0,72	n.s. p=0,93	n.s. p=0,64	n.s. p=0,53	n.s. p=0,78
3 µg/ml Kollagen	n.s. p=0,84	*** p<0,001	n.s. p=0,88	*** p=0,001	*** p<0,001	*** p<0,001
3 µg/ml α-Toxin	* p=0,03	n.s. p=0,16	n.s. p=0,22	n.s. p=0,06	n.s. p=0,65	*** p=0,003
0,3 µg/ml α-Toxin	** p=0,01	*** p<0,001	n.s. p=0,73	** p=0,01	** p=0,008	*** p=0,001

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

Weitere Versuche bestätigen, dass die hemmenden Effekte von PP2 und SQ29548 durch die Costimulation von 0,3µg/ml α-Toxin mit ADP oder Adrenalin teilweise aufgehoben werden. Die in Abbildung 16 gezeigte Stimulation mit 0,3µg/ml α-Toxin kann durch PP2, SQ29548 sowie einer Kombination aus beiden signifikant gehemmt werden (Tab.12, siehe Tabellenanhang). Dabei wird die durch 0,3µg/ml α-Toxin-induzierte Aggregation (23±6%) durch 10µM PP2 signifikant auf 7±3% gehemmt. Nach Vorinkubation mit PP2 und einer zeitgleichen Stimulation mit α-Toxin und 10µM Adrenalin oder 10µM ADP wird eine signifikante Zunahme der Aggregation auf 31±11% bzw. 30±8% beobachtet. Durch Vorinkubation der Thrombozyten mit SQ29548 wird die Aggregation durch α-Toxin signifikant

auf $3\pm 2\%$ gehemmt. Die Hemmung der α -Toxin-induzierten Aggregation mit SQ29548 kann durch zeitgleiche Stimulation von α -Toxin und $10\mu\text{M}$ Adrenalin teilweise aufgehoben werden, wohingegen die Hemmung durch $10\mu\text{M}$ SQ29548 bei zeitgleicher Stimulation mit α -Toxin und $10\mu\text{M}$ ADP nicht aufgehoben wird. Durch die Kombination der beiden Inhibitoren PP2 und SQ29548 wird die α -Toxin-induzierte Aggregation auf $3\pm 3\%$ gehemmt. Bei zusätzlicher Stimulation mit $10\mu\text{M}$ Adrenalin ($6\pm 3\%$) oder $10\mu\text{M}$ ADP ($7\pm 4\%$) wird unter diesen Bedingungen keine signifikante Steigerung der Aggregation beobachtet.

Auch die zeitgleiche Stimulation der Thrombozyten mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin und $10\mu\text{M}$ Adrenalin oder $10\mu\text{M}$ ADP führt nicht zu einer signifikanten Steigerung der Aggregation gegenüber der alleinigen Aggregation mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin (Tab.12; siehe Tabellenanhang).

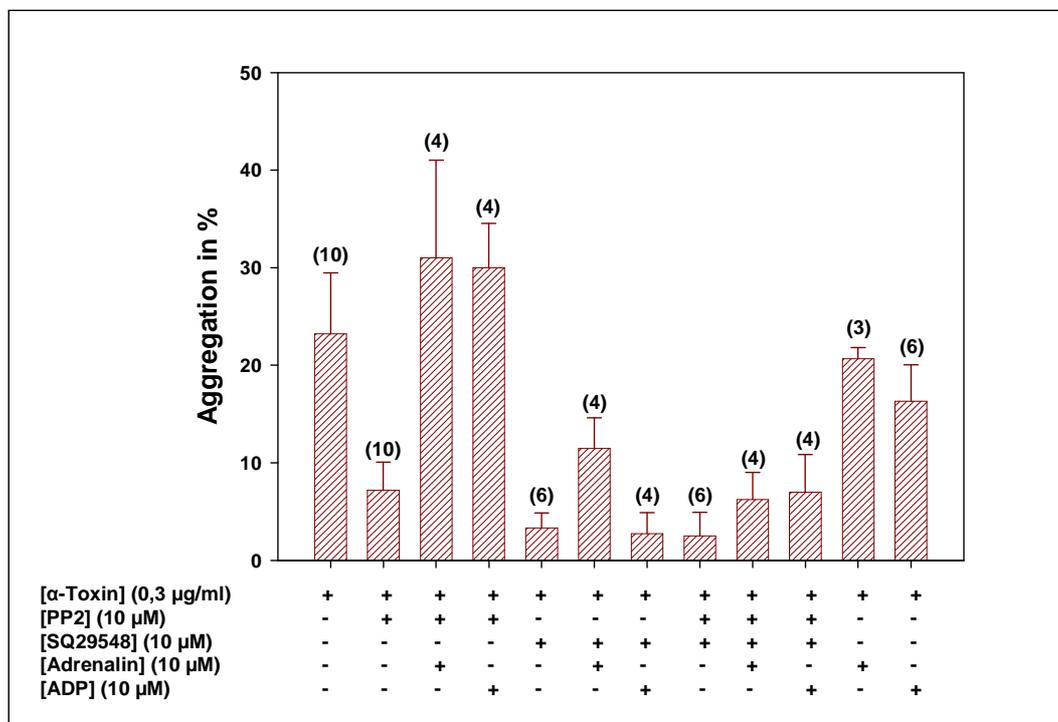


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte Aggregation von humanen Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten ($3 \times 10^8/\text{ml}$) wurden mit $10\mu\text{M}$ PP2 oder $10\mu\text{M}$ SQ29548 in Suspensionspuffer für 5min bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und anschließend mit $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin sowie $10\mu\text{M}$ Adrenalin und $10\mu\text{M}$ ADP aktiviert. Die Daten sind Mittelwerte in $\% \pm \text{SD}$ der Lichttransmission, die mit dem ansteigen Ausmaß der Aggregation im Vergleich zu Suspensionspuffer zunimmt, gemessen 4min nach Beginn der Stimulation im PAP8 Aggregation Profiler. (siehe auch Tabelle 12 im Tabellenanhang).

5.12. Hemmung der α -Toxin-induzierten Autophosphorylierung von Src

Die Autophosphorylierung von Src an Tyr-416 wird, wie oben bereits mehrfach erwähnt, als indirektes Maß für den enzymatischen Aktivierungszustand betrachtet (Irtegun et al., 2013). Deshalb sollten die Effekte der Inhibitoren auf die Wirkung der Src-Autophosphorylierung an Tyr-416 untersucht werden (Abb.17). Die SFK-Hemmstoffe PP1, PP2 und SU6656 hemmen die Src-Autophosphorylierung hervorgerufen durch $0,3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin signifikant (Tab.4). Die

größte Hemmung um ca. 30% wird durch den Inhibitor PP2 hervorgerufen. Das inaktive PP2-Analoga PP3 hat keine hemmende Wirkung. Durch Vorinkubation mit dem Src-Inhibitor Dasatinib lässt sich die mit 0,3µg/ml α -Toxin induzierte Autophosphorylierung nahezu vollständig hemmen.

Ähnliche Ergebnisse werden auch für 3µg/ml Kollagen beobachtet (Abb.17, rechts). Die SFK-Hemmstoffe PP2 und SU6656 hemmen auch die durch 3µg/ml Kollagen hervorgerufene Src-Autophosphorylierung signifikant, wohingegen PP1 nicht zu einer signifikanten Hemmung führt. Durch den Src-Inhibitor Dasatinib wird eine signifikante fast vollständige Hemmung hervorgerufen (Tab.4).

Die SFK-Inhibitoren zeigen bei Stimulation mit 0,1U/ml Thrombin kaum hemmende Effekte auf die Autophosphorylierung von Src an Tyr-416 (Daten nicht gezeigt).

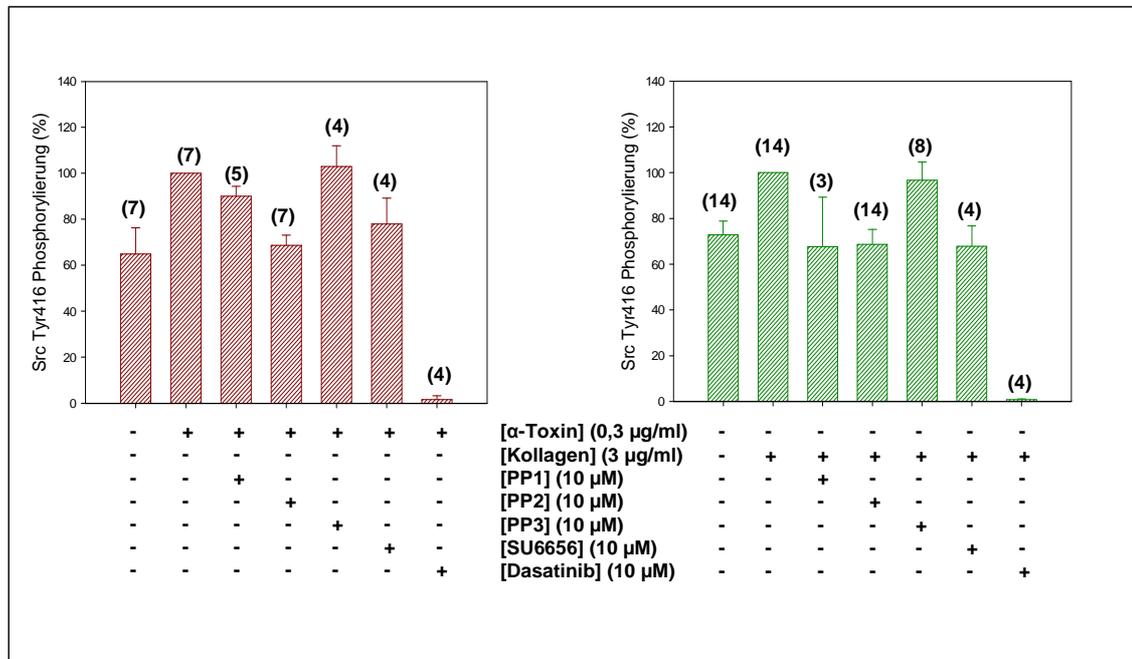


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die Kollagen und α -Toxin-induzierte Src Autophosphorylierung

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 5min mit den angebenen Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit 0,3µg/ml α -Toxin für 3min oder 3µg/ml Kollagen für 30s bei 37°C unter Rühren stimuliert.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Autophosphorylierung von Src wurde ein polyklonaler Antikörper, der die Src-Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 416 erkennt, verwendet. Dabei wurde jeweils die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3µg/ml α -Toxin und 3µg/ml Kollagen allein als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD.

Tabelle 4: Signifikanztabelle zu Abbildung 17

	Puffer	10 µM PP1	10 µM PP2	10 µM PP3	10 µM SU6654	10 µM Dasatinib
3 µg/ml Kollagen	n.s. p=0,09	n.s. p=0,27	*** p<0,001	n.s. p=0,69	* p=0,04	*** p<0,001
0,3 µg/ml α -Toxin	n.s. p=0,09	** p=0,007	*** p<0,001	n.s. p=0,76	* p=0,03	*** p<0,001

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

5.13. Effekte von α -Toxin auf die zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAPKinasen

In humanen Thrombozyten sind die extracellular signal-regulated kinasen 1 und 2 (ERK 1/2), die p38 MAPKinase und die c-Jun amino-terminal kinasen 1 und 2 exprimiert und werden bei Stimulation aktiviert (Adam et al., 2008). Von Kloft et al. (2009) wurde gezeigt, dass in mit dem α -Toxin stimulierten HEK293-Zellen p38 aktiviert wird. Daher war es interessant, inwieweit α -Toxin von *Staphylococcus aureus* in der Lage ist, die MAPKinasen in humanen Thrombozyten zu aktivieren.

Mit 0,3 μ g/ml α -Toxin werden die stressaktivierten MAPKinasen p38 und JNK1/2 zeitabhängig aktiviert (Abb.18). Im weiteren Zeitlauf kommt es zu einer deutlichen und schnellen Deaktivierung. ERK1/2 werden durch 0,3 μ g/ml α -Toxin nicht aktiviert (Abb.19). Auch eine höhere Konzentration von 3 μ g/ml α -Toxin führt nicht zur ERK1/2- Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

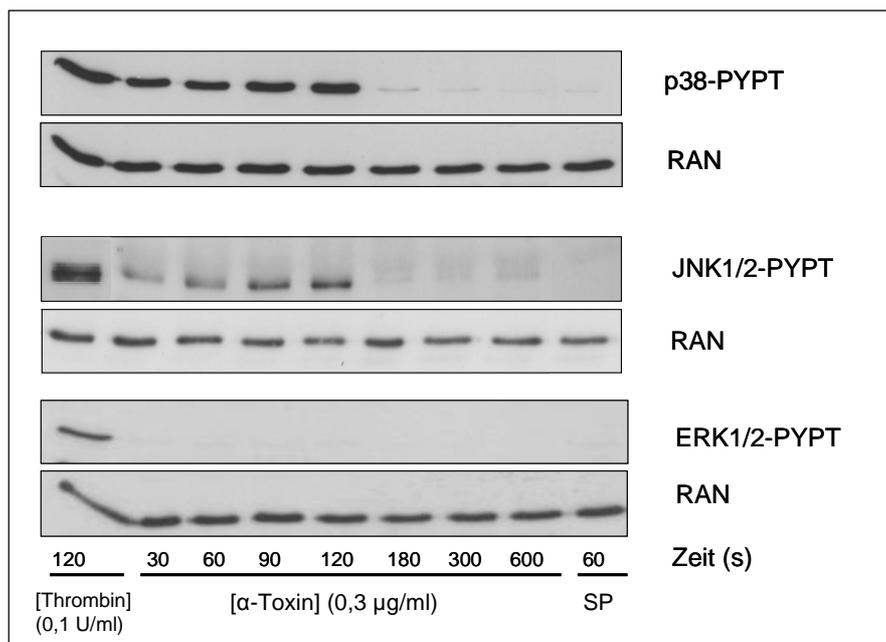


Abbildung 18: α -Toxin-induzierte zeitabhängige Aktivierung der MAPKinasen

Gereinigte Thrombozyten wurden mit 0,3 μ g/ml α -Toxin, 0,1U/ml Thrombin oder Suspensionpuffer (SP) bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten stimuliert. Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes ERK1/2, JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet. Die Bestimmung von RAN diente der Ladungskontrolle. Die gezeigten Western Blots mit ERK 1/2, JNK 1/2, p38 sowie RAN sind repräsentativ für 3 gleiche Experimente.

Das Maximum der Aktivierung nach Stimulation mit 0,3 μ g/ml α -Toxin wird nach 2min für p38 und JNK1/2 erreicht (Abb. 19). Bei Verwendung von 3 μ g/ml α -Toxin kommt es zu einer maximalen Aktivierung von p38 und JNK1/2 bereits innerhalb von 1min. Anschließend kommt es zu einer raschen und vollständigen Deaktivierung der MAPKinasen, was sich mit den relativen spezifischen Kinaseaktivitäten quantifizieren lässt (Abb.19).

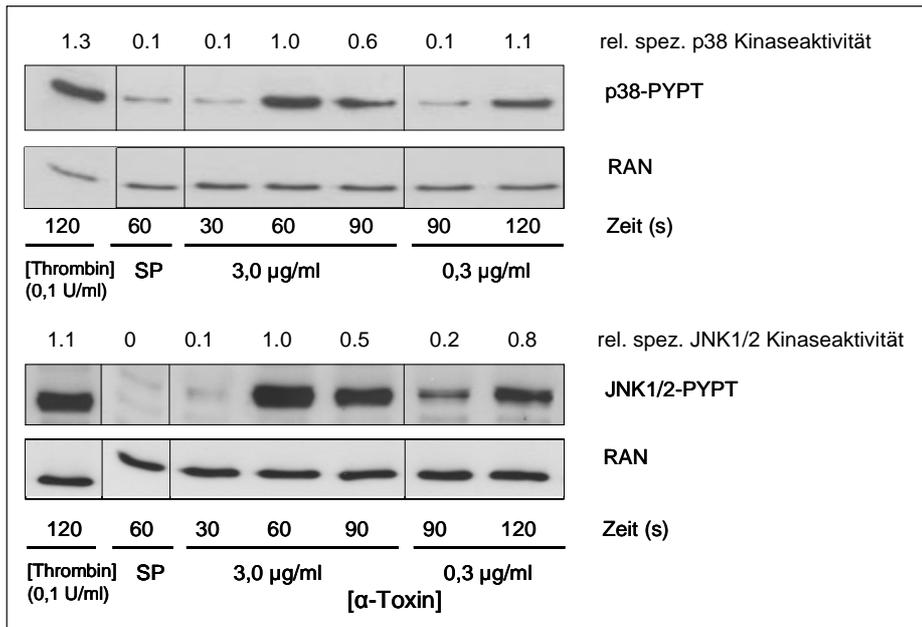


Abbildung 19: Konzentrationsabhängige Aktivierung der MAPKinasen durch α -Toxin

Gereinigte Thrombozyten wurden mit 3 und 0,3µg/ml α -Toxin oder Suspensionpuffer (b) bei 37°C unter ständigem Rühren für die angegebenen Zeiten stimuliert. Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden durch quantitative Densitometrie bestimmt. Die relative spezifische Aktivität von p38 und JNK1/2 wurden aus dem Verhältnis von dualphosphoryliertem p38 und RAN bzw. JNK1/2 und RAN berechnet (Zahlenangaben über den Phosphorylierungsmustern). Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 3µg/ml α -Toxin allein (60s) als 100% festgelegt.

5.14. Beeinflussung der Aktivierung der MAPKinasen durch verschiedene Signalwege

Die MAPKinasen p38 und JNK1/2 werden, wie oben gezeigt, durch α -Toxin aktiviert. Ausgehend von den Ergebnissen der Aggregationsanalysen mit den SFK-Inhibitoren und dem TxA₂-Rezeptor-Antagonisten (Abb.15) stellte sich die Frage nach dem Einfluss der SFK-Inhibitoren und des TxA₂-Rezeptor-Antagonisten auf die Aktivierung der MAPKinasen JNK1/2 und p38.

Nach Vorinkubation mit den verschiedenen SFK-Hemmstoffen und anschließender Stimulation mit 0,3µg/ml α -Toxin ist die Aktivierung der Kinasen p38 und JNK1/2 reduziert (Abb.20). Das inaktive Analoga PP3 hat keinen hemmenden Effekt auf die Aktivität der MAPKinasen. Die größte Hemmung wird durch den Inhibitor PP2 hervorgerufen. Der SFK-Inhibitor Dasatinib hemmt die Aktivierung der beiden MAPKinasen signifikant auf 10±5% für p38 und auf 10±3% für JNK1/2 der maximalen Aktivität (Tab.5).

Mit dem Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten SQ29548 wird die Aktivierung der beiden Kinasen p38 und JNK1/2 reduziert. Die JNK1/2-Aktivierung ist fast völlig gehemmt, während die p38-Aktivierung um ca. 80 % reduziert wird (Abb.20).

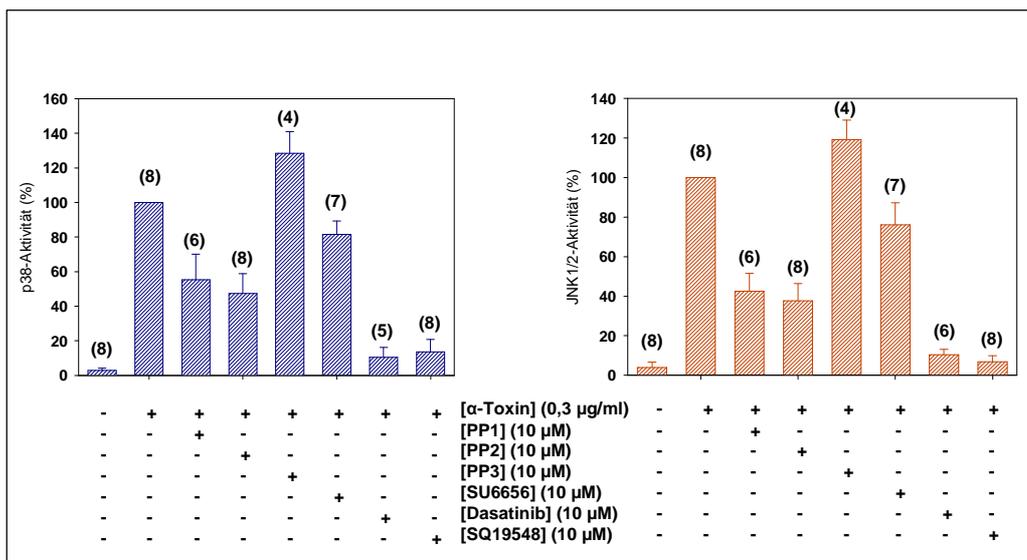


Abbildung 20: Einfluss unterschiedlicher Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte Aktivierung der stressinduzierten Proteinkinasen p38 und JNK1/2

Gereinigte Thrombozyten wurden mit unterschiedlichen Inhibitoren bei 37°C unter ständigem Rühren für 5min vorinkubiert und mit 0,3µg/ml α -Toxin für 3min stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden durch quantitative Densitometrie bestimmt. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3µg/ml α -Toxin allein als 100% festgelegt. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

Tabelle 5: Signifikanztabelle zu Abbildung 21

	Puffer	10 µM PP1	10 µM PP2	10 µM PP3	10 µM SU6656	10 µM Dasatinib	10 µM SQ29548
p38-Phos.	*** p<0,001	* p=0,03	*** p=0,002	n.s. p=0,11	* p=0,05	*** p<0,001	*** p<0,001
JNK1/2-Phos.	*** p<0,001	*** p=0,001	*** p=0,002	n.s. p=0,13	n.s. p=0,07	*** p<0,001	** p<0,001

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

Nachdem für die mit α -Toxin induzierte Aktivierung der beiden MAPKinasen eine Abhängigkeit von der Aktivierung des Thromboxan A₂-Rezeptors und Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen gezeigt werden konnte, wurde zum Vergleich untersucht, wie diese Signale auch an der Kollagen- und Thrombin-induzierten Aktivierung beteiligt sind. Mit 3µg/ml Kollagen sowie 0,1U/ml Thrombin wird jeweils eine Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 beobachtet. Die Hemmung der SFK-Inhibitoren PP1, PP2 und SU6656 auf die Kollagen-induzierte p38-Aktivierung ist im Vergleich zur ERK1/2- und zur JNK1/2-Hemmung (Tabelle 6, oberer Teil) weniger wirkungsvoll. Nach Vorinkubation mit dem SFK-Inhibitor PP2 und der Verwendung von 0,1U/ml Thrombin als primären Agonisten ist die hemmende Wirkung auf die p38-Aktivierung verglichen mit der ERK1/2- und der JNK1/2-Aktivierung am größten. Die umfangreichste Hemmung der Thrombin-induzierten JNK1/2-Aktivierung wird mit 10µM PP1 erreicht (Tabelle 6, unterer Teil).

Auch der Thromboxan A₂-Rezeptor ist in die Aktivierung der MAPKinasen involviert ist. Um eine stimulationsabhängige Aktivierung des Rezeptors zu verhindern, wurden die Thrombozyten vor Stimulation mit Kollagen oder Thrombin mit SQ29548 vorinkubiert. In Tabelle 6 ist eindeutig erkennbar, dass nach Vorinkubation und Stimulation mit Kollagen die Aktivierung der MAPKinasen ERK 1/2 um ca. 86% und JNK um ca. 74% gehemmt ist, wohingegen die Aktivität nach Stimulation mit Thrombin jeweils zur Hälfte gehemmt wird. Die Hemmung der p38-Aktivität ist bei Stimulation mit Kollagen um ca. 59% und nach Stimulation mit Thrombin um ca. 64% reduziert.

Tabelle 6: Abhängigkeit der Thrombin und Kollagen-induzierten Aktivierung der MAPKinasen von verschiedenen Modulatoren

	SP	Kollagen (3 µg/ml)					
	SP	SP	PP1	PP2	PP3	SU6656	SQ29548
ERK1/2	0 ± 0 (n=11)	100 ± 0 (n=11)	62 (n=2)	55 ± 11 (n=11)	77 ± 12 (n=6)	48 ± 19 (n=6)	14 ± 6 (n=9)
JNK 1/2	3 ± 3 (n=10)	100 ± 0 (n=10)	67 (n=2)	52 ± 7 (n=9)	113 ± 18 (n=6)	77 ± 9 (n=4)	26 ± 6 (n=7)
p38	3 ± 2 (n=13)	100 ± 0 (n=13)	86 (n=2)	69 ± 5 (n=13)	88 ± 26 (n=5)	82 ± 19 (n=5)	41 ± 9 (n=9)

	SP	Thrombin (0,1 U/ml)					
	SP	SP	PP1	PP2	PP3	SU6656	SQ29548
ERK1/2	1 ± 2 (n=8)	100 ± 0 (n=8)	62 ± 12 (n=5)	77 ± 16 (n=8)	88 ± 17 (n=5)	76 ± 15 (n=5)	48 ± 8 (n=10)
JNK 1/2	2 ± 1 (n=9)	100 ± 0 (n=10)	33 ± 10 (n=5)	61 ± 10 (n=9)	135 ± 14 (n=6)	137 ± 16 (n=4)	56 ± 10 (n=7)
p38	8 ± 3 (n=12)	100 ± 0 (n=12)	76 ± 6 (n=7)	9 ± 17 (n=12)	157 ± 18 (n=3)	130 ± 37 (n=4)	36 ± 10 (n=9)

Gewaschene humane Thrombozyten wurden mit Suspensionspuffer (SP) oder jeweils 10µM der Inhibitoren PP1, PP2, PP3, SU6656 und SQ29548 vorinkubiert und mit 3µg/ml Kollagen oder 0,1U/ml Thrombin bei 37°C unter ständigem Rühren für 90s stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes ERK1/2, JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden durch quantitative Densitometrie bestimmt. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 3µg/ml Kollagen oder 0,1U/ml Thrombin allein als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

Nachdem wir zeigen konnten, dass die SFK-Inhibitoren und der Thromboxan-Rezeptor-Antagonist die Aktivierung der stressinduzierten MAPKinasen p38 und JNK1/2 durch α-Toxin hemmen, wurde der hemmende Effekte von PP2 und SQ29548 bei Costimulation von 0,3µg/ml α-Toxin mit ADP oder Adrenalin untersucht. Erneut wurde die Aktivierung der MAPKinasen durch 0,3µg/ml α-Toxin bestimmt (Abb.21). Die Inkubation der Thrombozyten mit 10µM PP2 reduziert die Aktivierung signifikant um 64% für p38 und um 68% für JNK1/2 (Tab.13, Tab.14 siehe Tabellenanhang). Nach Vorinkubation mit PP2 und einer zeitgleichen Stimulation mit α-Toxin und 10µM Adrenalin oder 10µM ADP wird eine Zunahme der Aktivierung der beiden

Kinasen beobachtet, die jedoch für p38 und JNK1/2 nur bei Stimulation mit α -Toxin und 10 μ M Adrenalin signifikant ist (Tab.13, Tab.14 siehe Tabellenanhang).

Durch Inkubation der Thrombozyten mit dem TxA₂-Rezeptor-Antagonisten SQ29548 und α -Toxin wird die Aktivierung der von p38 auf 14 \pm 7% und JNK auf 7 \pm 1% signifikant gehemmt. Die Hemmung der α -Toxin-induzierten Aktivierung der beiden Kinasen mit SQ29548 kann durch zeitgleiche Stimulation mit α -Toxin und 10 μ M Adrenalin oder 10 μ M ADP nicht aufgehoben werden.

Bei Kombination der beiden Inhibitoren PP2 und SQ29548 kann durch zeitgleiche Stimulation mit α -Toxin und 10 μ M Adrenalin der hemmende Effekt auf die p38- und JNK1/2-Aktivierung nicht überwunden werden, wohingegen die Costimulation mit α -Toxin und 10 μ M ADP die Hemmung der Aktivierung der beiden Kinasen teilweise aufhebt.

Die zeitgleiche Stimulation der Thrombozyten mit 0,3 μ g/ml α -Toxin und 10 μ M Adrenalin führt nicht zu einer signifikanten Änderung der Aktivierung von p38 und JNK1/2 gegenüber der alleinigen Aktivierung der beiden Kinasen mit 0,3 μ g/ml α -Toxin.

Die zeitgleiche Stimulation der Thrombozyten mit 0,3 μ g/ml α -Toxin und 10 μ M ADP hingegen führt zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierung von p38 und JNK1/2.

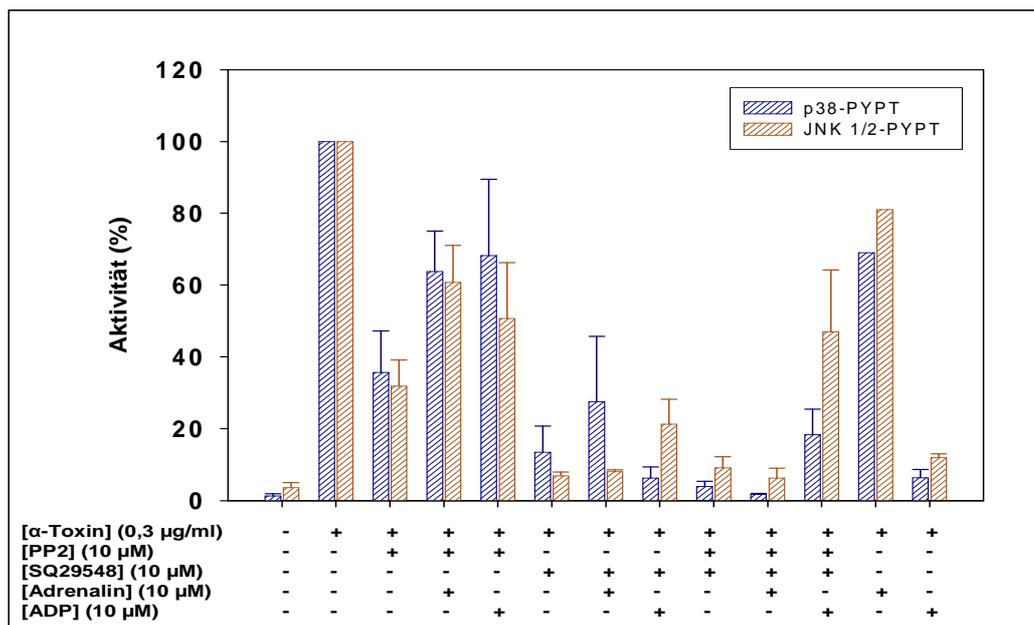


Abbildung 21: Modulation der α -Toxin-induzierten Aktivierung von p38 und JNK1/2 in humanen Thrombozyten

Isolierte humane Thrombozyten wurden jeweils mit 10 μ M PP2 und 10 μ M SQ29548 oder beiden Inhibitoren zusammen für 5min bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und mit diversen Agonisten, wie angegeben, stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden durch quantitative Densitometrie bestimmt. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3 μ g/ml α -Toxin allein als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD. (siehe auch Tabellen 13 und 14 im Tabellenanhang)

Alpha-Toxin bewirkt durch die Porenbildung einen Einstrom von Kalziumionen in die Thrombozyten. Dieser Kalziumeinstrom bewirkt die Aktivierung zahlreicher kalziumabhängiger Enzyme. Calpain ist an mannigfaltigen Signalwegen in Thrombozyten beteiligt, wie der Aggregation, Sekretion und Ausbildung von Pseudopodien (Kuchay und Chishti 2007). Calpeptin, ein zellpermeabler Hemmstoff von Calpain (Ariyoshi et al., 1995), verzögert bei Stimulation mit 0,3µg/ml α -Toxin das Erreichen des Maximums der Aktivierung von p38 und JNK1/2. Während in unbehandelten Thrombozyten das Aktivitätsmaximum nach 2min erreicht ist, wird in Gegenwart von Calpeptin das Maximum erst nach 5min erreicht (Abb.22).

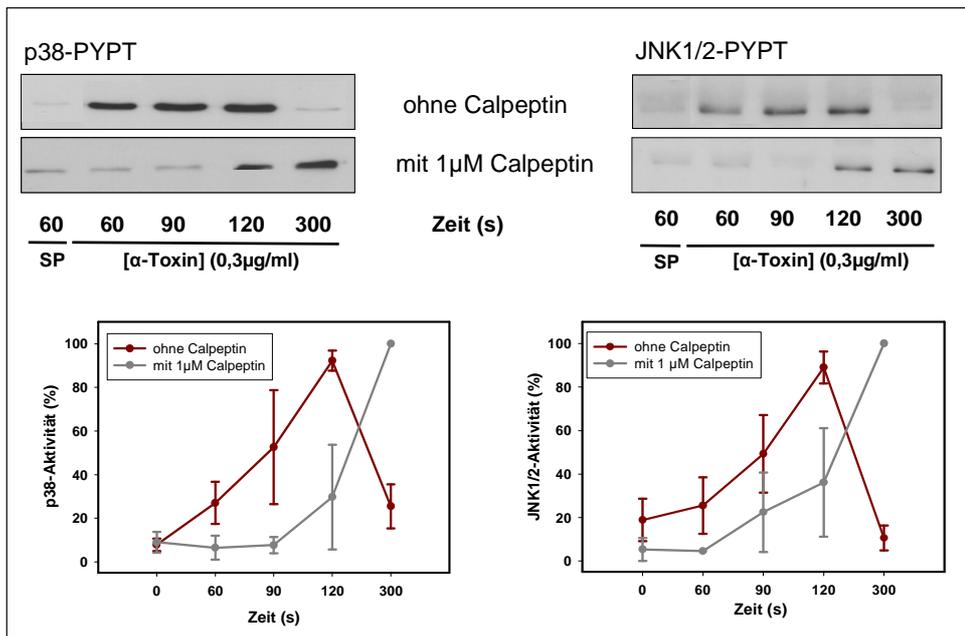


Abbildung 22: Effekte von Calpeptin auf die Aktivierung der MAPKinasen bei Stimulation mit α -Toxin

Isolierte humane Thrombozyten wurden in Suspensionspuffer mit 2mM Kalzium mit oder ohne 1µM Calpeptin vorinkubiert und mit 0,3µg/ml α -Toxin für die angegebenen Zeiten bei 37°C unter ständigem Rühren stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Die dargestellten Phosphorylierungsmuster sind repräsentativ für jeweils drei gleiche, unabhängige Experimente.

Oben: Stimulation mit 0,3µg/ml α -Toxin. Die Kontrollen wurden mit Suspensionspuffer (SP) anstelle von 0,3µg/ml α -Toxin durchgeführt.

Unten: Quantifizierung der Aktivierung der MAPKinasen. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden durch quantitative Densitometrie bestimmt. Dabei wurde die höchste Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3µg/ml α -Toxin allein oder bei 0,3µg/ml α -Toxin in Kombination mit 1µM Calpeptin als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD.

5.15. Phosphataseinhibitoren

Neben der Proteinphosphorylierung induziert α -Toxin, wie bereits mehrfach erwähnt, auch eine charakteristische rasche Proteindephosphorylierung. Zur Untersuchung der Dephosphorylierungsphänomene und funktioneller Konsequenzen wurden die Phosphataseinhibitoren Ciclosporin A, Okadasäure und Natriumorthovanadat benutzt.

In der Tabelle 7 ist die Hemmung durch die Phosphataseinhibitoren Ciclosporin A, Okadasäure und Natriumorthovanadat (Peroxovanadat) der mit 0,3 und 3µg/ml α-Toxin sowie der durch Kollagen und Thrombin hervorgerufenen Aggregation gezeigt. Es ist offensichtlich zu erkennen, dass die Aggregation in Gegenwart von Okadasäure mit allen Agonisten deutlich gehemmt ist. Nach Vorinkubation mit Natriumorthovanadat und anschließender Stimulation mit α-Toxin oder Thrombin ist die Aggregation gesteigert. Auf die Kollagen induzierte Aggregation hat Natriumorthovanadat kaum Einfluss. Der Effekt von Ciclosporin A ist unabhängig vom verwendeten Agonisten nur gering.

Tabelle 7: Effekte verschiedenen Proteinphosphatase-Inhibitoren auf die Aggregation humaner Thrombozyten

Vorinkubation mit	Stimulation mit				
	SP	0,3 µg/ml α-Toxin	3 µg/ml α-Toxin	0,1 U/ml Thrombin	3 µg/ml Kollagen
ohne Inhibitor	2 ± 1 (n=6)	15 ± 6 (n=22)	35 ± 5 (n=20)	86 ± 7 (n=25)	70 ± 11 (n=25)
0,5 µM Okadasäure	2 ± 2 (n=3)	5 ± 1 (n=3)	22 ± 3 (n=4)	59 ± 14 (n=3)	6 ± 3 (n=3)
30 µM Peroxovanadat	1 ± 1 (n=6)	57 ± 12 (n=6)	50 ± 1 (n=5)	94 ± 4 (n=4)	67 ± 1 (n=3)
1 µM CiclosporinA	5 ± 3 (n=5)	10 ± 6 (n=6)	31 ± 5 (n=7)	86 ± 3 (n=4)	69 ± 3 (n=3)

Gewaschene humane Thrombozyten wurden 5min mit den angegebenen Proteinphosphatase-Inhibitoren inkubiert und anschließend mit 0,3µg/ml sowie 3µg/ml α-Toxin, 0,1U/ml Thrombin und 3µg/ml Kollagen bei 37°C unter rühren stimuliert. Die Messung erfolgte 5min nach Zugabe der Agonisten. Die Aggregation nach der Methode von Born ermittelt, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Angegeben ist jeweils der Mittelwert in % ± SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

Anschließend sind die Effekte der Phosphataseinhibitoren auf die Aktivierung der MAPKinasen untersucht worden (Tab.8). Durch Vorinkubation mit Okadasäure oder Natriumorthovanadat und anschließender Stimulation mit α-Toxin wird ein höheres Niveau der maximalen Aktivierung von p38 und JNK1/2 als bei alleiniger Behandlung der Thrombozyten mit α-Toxin erreicht. Gleichzeitig wird die Deaktivierung der Kinasen p38 und JNK1/2 in Gegenwart der beiden Inhibitoren verzögert. Ciclosporin A hemmt die Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2, hat aber auf die Deaktivierung keinen Einfluss (Tab.8).

Auch die Phosphorylierung von p27, einem Protein mit einer relativen Molmasse von 27kDa (Abb.7) ist von der Wirkung der Phosphataseinhibitoren betroffen. Auf die das Maximum der Phosphorylierung und die Dephosphorylierung von p27 haben die Phosphataseinhibitoren einen ähnlichen Effekt wie auf die MAPKinasen p38 und JNK1/2. Auch die Vorinkubation mit Okadasäure sowie Natriumorthovanadat und eine anschließender Stimulation mit α-Toxin bewirken, dass das Niveau der maximalen Phosphorylierung von p27 höher ist als bei alleiniger

Behandlung der Thrombozyten mit α -Toxin (Tab.8). Gleichzeitig wird die Dephosphorylierung von p27 in Gegenwart der beiden Inhibitoren verzögert. Durch Vorinkubation mit Ciclosporin A wird die α -Toxin-bedingte Dephosphorylierung von p27 nicht beeinflusst.

Tabelle 8: Zeitabhängige Änderungen der Phosphorylierung von p38, JNK1/2 und p27 nach Stimulation mit α -Toxin

	Modulator	Inkubation mit									
		Puffer	0,3 μ g/ml α -Toxin								
			120 sec	120 sec	180 sec	300 sec	420 sec	600 sec	720 sec	900 sec	1200 sec
p38	Puffer	2 \pm 3 (12)	8 \pm 7 (9)	100 (12)	62 \pm 8 (12)	15 \pm 11 (8)	4 \pm 5 (9)	1 \pm 1 (6)	1 \pm 1 (6)	1 \pm 1 (6)	
	0,5 μ M Okadasäure	11 \pm 4 (3)	37 (1)	54 \pm 9 (3)	115 \pm 31(4)	116 \pm 8 (3)	36 \pm 21 (3)	12 \pm 9 (3)	13 (2)	6 \pm 8 (3)	
	30 μ M Peroxo-vanadat	5 \pm 4 (3)	86 (2)	134 \pm 34(3)	112 \pm 32(5)	22 \pm 12 (5)	15 \pm 10 (3)	16 \pm 7 (3)	4 \pm 6 (3)	2 \pm 2 (3)	
	1 μ M CiclosporinA	1 \pm 1 (3)	14 \pm 6 (3)	23 \pm 12 (3)	68 (2)	46 \pm 12 (3)	1 \pm 1 (3)	1 \pm 1 (3)	1 \pm 1 (3)	1 \pm 1 (3)	
JNK 1/2	Puffer	9 \pm 5 (8)	7 \pm 4 (8)	36 \pm 10 (8)	90 \pm 7 (8)	52 (2)	16 \pm 8 (3)	10 \pm 7 (3)	10 \pm 6 (3)	10 \pm 8 (3)	
	0,5 μ M Okadasäure	10 \pm 2 (5)	51 (2)	64 \pm 1 (5)	129 \pm 5 (4)	143 \pm 14(3)	126 \pm 20(3)	102 \pm 9 (3)	76 (2)	29 \pm 9 (3)	
	30 μ M Peroxo-vanadat	9 \pm 2 (3)	94 \pm 22 (3)	205 \pm 30(3)	127 \pm 18(3)	71 \pm 20 (3)	44 \pm 8 (3)	24 \pm 2 (3)	27 (2)	20 \pm 8 (3)	
	1 μ M CiclosporinA	1 \pm 1 (3)	32 \pm 13 (3)	55 \pm 20 (4)	67 \pm 10 (3)	25 \pm 20 (3)	2 \pm 2 (3)	3 \pm 4 (3)	2 \pm 3 (3)	4 \pm 5 (3)	
p27	Puffer	5 \pm 4 (9)	25 \pm 5 (9)	35 \pm 7 (9)	95 \pm 5 (9)	55 \pm 24 (3)	17 \pm 6 (7)	7 \pm 8 (6)	4 \pm 7 (4)	2 \pm 3 (6)	
	0,5 μ M Okadasäure	9 \pm 3 (3)	35 (1)	30 (1)	32 \pm 9 (3)	118 \pm 12 (3)	28 \pm 11 (3)	15 \pm 7 (3)	7 (2)	7 \pm 1 (3)	
	30 μ M Peroxo-vanadat	28 \pm 10 (4)	159 (2)	408 (2)	307 \pm 25 (4)	182 \pm 40 (4)	125 \pm 37 (4)	132 \pm 24 (3)	125 \pm 18 (3)	80 (2)	
	1 μ M CiclosporinA	10 \pm 4 (5)	23 \pm 10 (3)	29 \pm 14 (3)	26 \pm 10 (4)	7 \pm 9 (3)	2 \pm 3 (3)	4 \pm 4 (3)	2 \pm 1 (3)	2 \pm 1 (3)	

Isolierte humane Thrombozyten wurden mit 0,5 μ M Okadasäure, 30 μ M Natriumorthovanadat oder 1 μ M Ciclosporin A vorinkubiert und mit 0,3 μ g/ml α -Toxin für die angegebenen Zeiten bei 37°C unter ständigem Rühren stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert und mit Hilfe des Densitometers quantifiziert. Zur Detektion der MAPKinasen wurden Antikörper, die dualphosphoryliertes JNK1/2 oder p38 erkennen, verwendet und der monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 zur Detektion von p27. Dabei wurde die jeweils höchste Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3 μ g/ml α -Toxin allein oder bei 0,3 μ g/ml α -Toxin in Kombination mit den angegebenen Phosphataseinhibitoren als 100% für das jeweilige Protein festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD.

5.16. Abhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von p27 von der Familie der Src-Kinase

Proteinphosphorylierungen sind für eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen der Thrombozyten bedeutend. Wie bereits 2005 von Fälker et al. gezeigt werden konnte, ist die Kollagen-induzierte p27-Proteintyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung in menschlichen Thrombozyten abhängig von Signalen des Thromboxan A₂-Rezeptors. Zur Bestätigung dieser Literaturdaten wurden Thrombozyten vor Stimulation mit Kollagen oder Thrombin mit SQ29548, einem Antagonisten der Thromboxan A₂-Rezeptors, vorinkubiert. In Abbildung 23 ist eindeutig erkennbar, dass nach Vorinkubation mit SQ29548 und Stimulation

mit Kollagen die Phosphorylierung von p27 um 68% gehemmt ist, wohingegen die Phosphorylierung nach Stimulation mit Thrombin nur um 13% gehemmt ist.

Die SFK-Hemmstoffe PP1, PP2 und SU6656 hemmen auch die Phosphorylierung von p27 nach Stimulation mit 3µg/ml Kollagen (Abb.23). Die größte Hemmung auf 20±8% des maximalen Effekts wird durch den Inhibitor PP2 hervorgerufen. Durch Vorinkubation mit dem Src-Inhibitor Dasatinib lässt sich sowohl die mit 3µg/ml Kollagen-induzierte Tyrosinphosphorylierung von p27 als auch die Thrombin-abhängige p27-Phosphorylierung signifikant hemmen (Tab.9). Die Thrombin-induzierte p27-Phosphorylierung wird durch PP2 und SU6656 signifikant gehemmt.

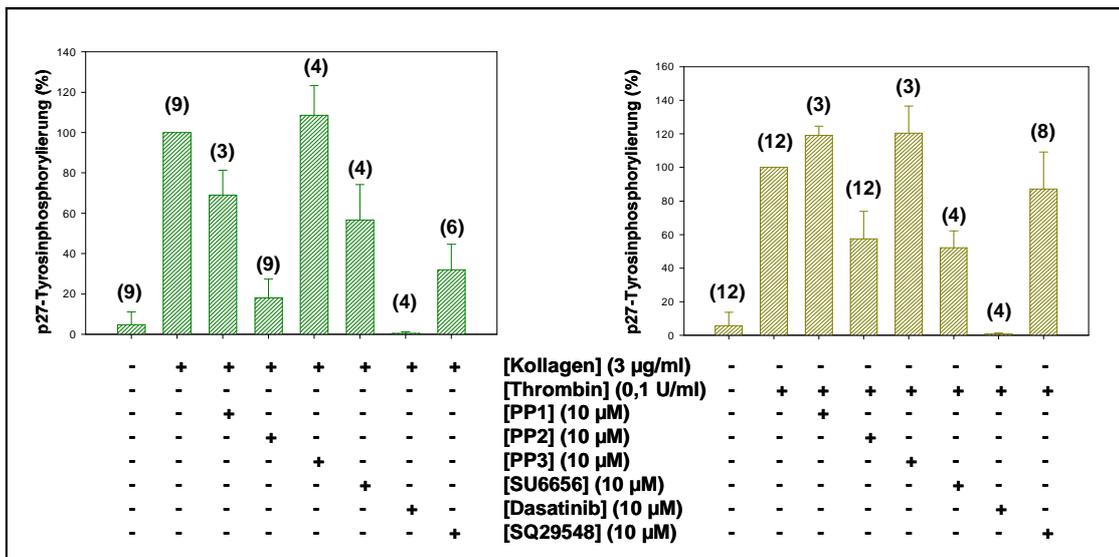


Abbildung 23: Modulation der Thrombin und Kollagen-induzierten Tyrosinphosphorylierung von p27

Gereinigte Thrombozyten wurden mit den angegebenen Inhibitoren bei 37°C unter ständigem Rühren für 5min vorinkubiert und mit 3µg/ml Kollagen oder 0,1U/ml Thrombin für 30s stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden mit Hilfe des Densitometers quantifiziert. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 3µg/ml Kollagen oder 0,1U/ml Thrombin allein als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben (siehe auch Signifikanztabelle 9).

Tabelle 9: Signifikanztabelle zu den Abbildungen 23 und 24

	10 µM PP1	10 µM PP2	10 µM PP3	10 µM SU6656	10 µM Dasatinib	10 µM SQ29548
0,1 U/ml Thrombin	* p=0,03	*** p<0,001	n.s. p=0,34	* p=0,02	*** p<0,001	n.s. p=0,58
3 µg/ml Kollagen	* p=0,05	*** p<0,001	n.s. p=0,33	n.s. p=0,09	*** p<0,001	*** p<0,001
0,3 µg/ml α-Toxin	** p=0,009	*** p<0,001	n.s. p=0,25	*** p=0,003	*** p<0,001	*** p<0,001

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

Nach Vorinkubation mit verschiedenen Hemmstoffen von Src-Kinase Familienmitgliedern wie, PP1, PP2 und SU6656 und anschließender Stimulation mit 0,3µg/ml α -Toxin ist die Phosphorylierung von p27 reduziert (Abb.24). Das inaktive Analoga PP3 hat keinen hemmenden Effekt. Wieder hat den größten hemmenden Effekt Inhibitor PP2 mit ca. 73 %. Der SFK-Inhibitor Dasatinib hemmt die α -Toxin abhängige Phosphorylierung von p27 auf 10 ± 5 % des maximalen Effekts (Tab.9). Mit dem Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten SQ29548 wird die α -Toxin-induzierte Phosphorylierung von p27 signifikant reduziert.

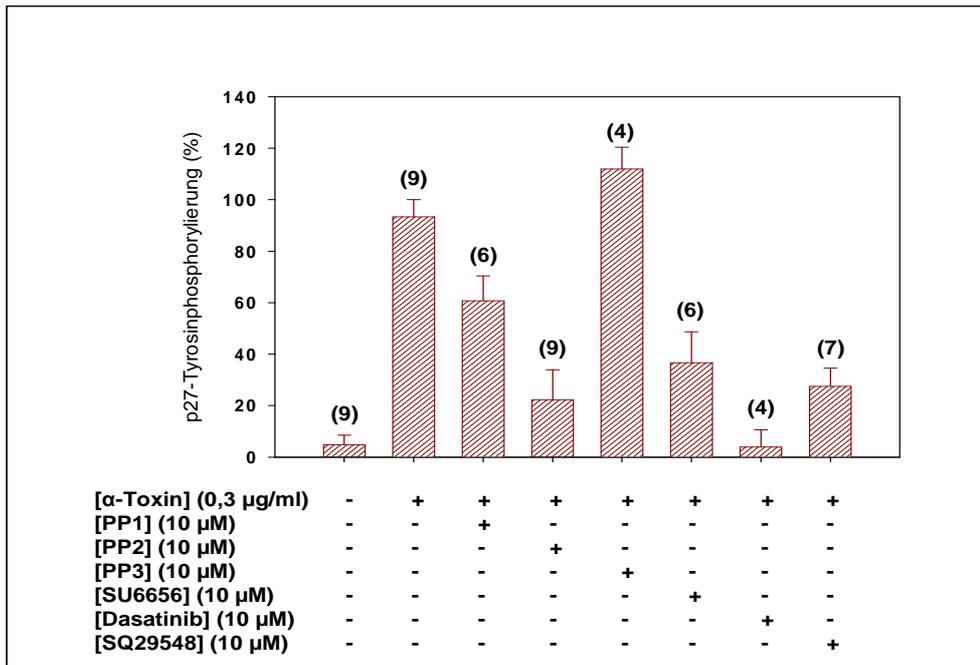


Abbildung 24: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die α -Toxin-induzierte Tyrosinphosphorylierung von p27

Gereinigte Thrombozyten wurden mit den angegebenen Modulatoren bei 37°C unter ständigem Rühren für 5min vorinkubiert und mit 0,3µg/ml α -Toxin für 3min stimuliert. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 wendet. Die Phosphorylierungsintensitäten wurden durch quantitative Densitometrie bestimmt. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3µg/ml α -Toxin allein als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

Weitere Versuche bestätigen, dass der hemmende Effekt von PP2 durch die Costimulation von 3µg/ml Kollagen mit 10µM ADP oder 10µM Adrenalin teilweise aufgehoben werden (Abb.25). In Anwesenheit von PP2 wird eine signifikante Hemmung der p27-Phosphorylierung auf 19 ± 6 % des maximalen Effekts beobachtet (Tab.10). Die zeitgleiche Stimulation der PP2-gehemmten Thrombozyten mit 3µg/ml Kollagen und 10µM Adrenalin führt zu einer nicht signifikanten Zunahme der p27-Phosphorylierung auf 68 ± 31 %, wohingegen die Stimulation mit 3µg/ml Kollagen und 10µM ADP zu einer signifikanten Zunahme der p27-Phosphorylierung auf 54 ± 11 % führt (Tab.10).

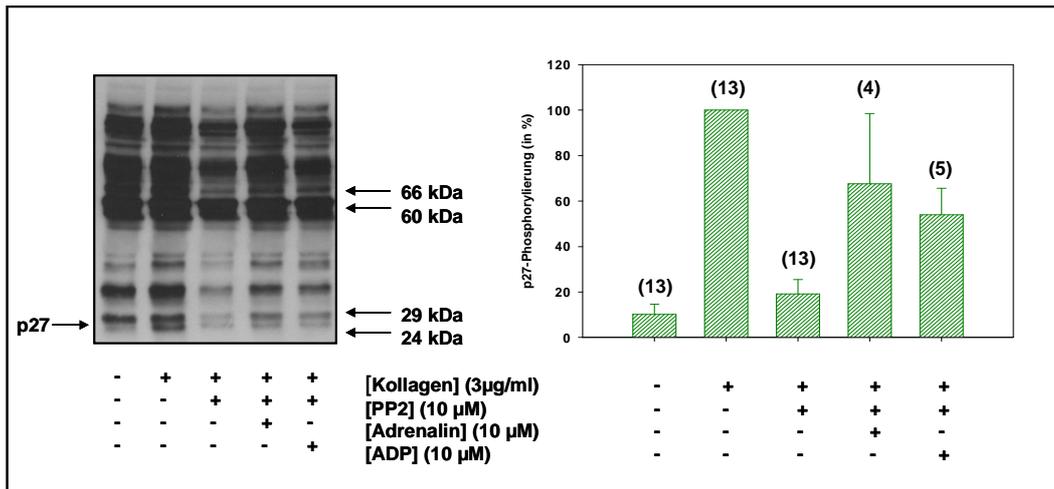


Abbildung 25: Inhibierung der p27-Tyrosinphosphorylierung mit PP2 nach der Stimulation mit Kollagen

Gereinigte Thrombozyten wurden mit 10µM PP2 bei 37°C unter ständigem Rühren für 5min vorinkubiert und wie angegeben stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert.

Links: Stimulation mit Kollagen. Humane Thrombozyten wurden mit 3µg/ml Kollagen und 10µM Adrenalin bzw. 10µM ADP für 30s stimuliert. Zur Detektion der Proteine der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet. Die Kontrollen wurden mit Suspensionspuffer (SP) durchgeführt. Die Pfeile markieren die Molmassen standardisierter Proteine in kDa.

Rechts: Quantifizierung der p27-Phosphorylierung. Die Intensität der Phosphorylierung von p27 wie in der linken Abbildungen dargestellt, wurden mit Hilfe des Densitometers quantifiziert. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 3µg/ml Kollagen als 100% festgelegt. Angegeben ist der Mittelwert ± SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

Tabelle 10: Signifikanztabelle zu Abbildung 25

	Puffer	Kollagen	Kollagen + PP2 + Adrenalin	Kollagen + PP2 + ADP
Kollagen + PP2	n.s. p=0,08	*** p<0,001	n.s. p=0,31	* p=0,02

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

Bei Stimulation mit Thrombin kann die hemmende Wirkung von PP2 auf die p27-Tyrosinphosphorylierung mit Adrenalin und ADP nicht aufgehoben werden (Abb. 26). In Anwesenheit des SFK-Inhibitors PP2 wird eine signifikante Hemmung der p27-Phosphorylierung auf 53±6% beobachtet (Tab.11). Die zeitgleiche Stimulation der PP2-gehemmten Thrombozyten mit 0,1U/ml Thrombin und 10µM Adrenalin oder 10µM ADP führt zu einer nicht signifikanten Zunahme der p27-Tyrosinphosphorylierung.

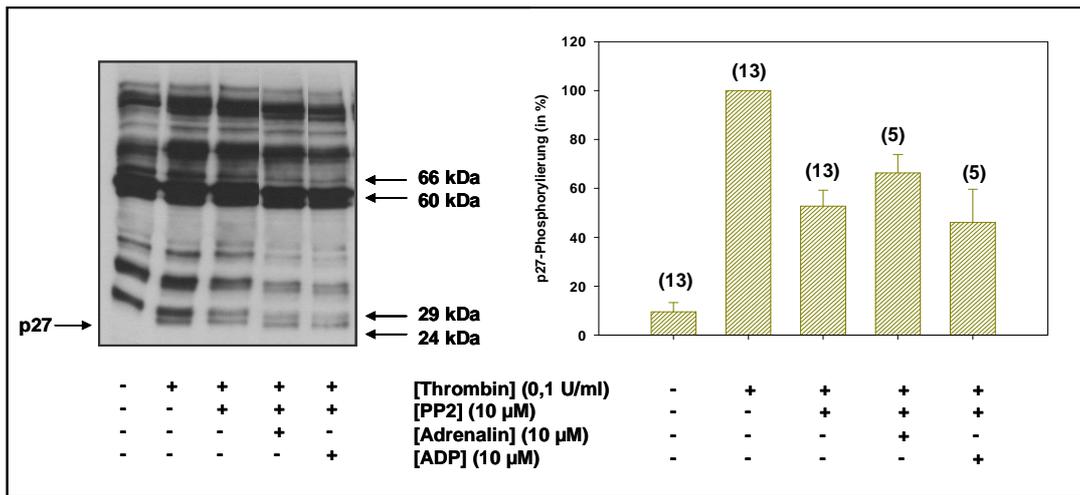


Abbildung 26: Inhibition der p27-Tyrosinphosphorylierung mit PP2 nach der Stimulation mit Thrombin

Gereinigte Thrombozyten wurden mit 10 µM PP2 bei 37°C unter ständigem Rühren für 5 min vorinkubiert und wie angegeben stimuliert. Links: Stimulation mit Thrombin. Humane Thrombozyten wurden mit 0,1U/ml Thrombin und 10µM Adrenalin bzw. 10µM ADP für 30s stimuliert. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet. Die Kontrollen wurden mit Suspensionspuffer (SP) durchgeführt. Die Pfeile markieren die Molmassen standardisierter Proteine in kDa.

Rechts: Quantifizierung der p27-Phosphorylierung. Die Intensität der Phosphorylierung von p27 wie in der linken Abbildungen dargestellt, wurden mit Hilfe des Densitometers quantifiziert. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,1U/ml Thrombin als 100% festgelegt. Angegeben ist der Mittelwert ± SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben.

Tabelle 11: Signifikanztabelle zu Abbildung 26

	Puffer	Thrombin	Thrombin + PP2 + Adrenalin	Thrombin + PP2 + ADP
Thrombin + PP2	*** p<0,001	*** p<0,001	n.s. p=0,48	n.s. p=0,62

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

In Abbildung 27 sind die hemmenden Effekte von PP2 und SQ29548 bei Costimulation von 0,3µg/ml α-Toxin mit Adrenalin oder ADP auf die p27-Tyrosinphosphorylierung gezeigt (Abb.27). Durch die Vorinkubation mit 10µM PP2 wird die p27-Phosphorylierung signifikant auf 16±8% gehemmt (Tab.15). Nach Vorinkubation mit PP2 und zeitgleichen Stimulation mit α-Toxin und 10µM Adrenalin wird eine signifikante Zunahme der p27-Tyrosinphosphorylierung beobachtet. Im Gegensatz dazu ist die Steigerung der p27-Tyrosinphosphorylierung durch die zeitgleiche Stimulation mit α-Toxin und 10µM ADP nicht signifikant (Tab.15).

Durch Inkubation der Thrombozyten mit SQ29548 und α-Toxin wird die p27-Tyrosinphosphorylierung jedoch signifikant auf 28±7% gehemmt. Die Hemmung der α-Toxin-induzierten p27-Tyrosinphosphorylierung mit SQ29548 kann durch zeitgleiche Stimulation mit α-Toxin und 10µM Adrenalin aufgehoben werden, wohingegen die Hemmung von 10µM SQ29548 durch zeitgleiche Stimulation mit α-Toxin und 10µM ADP nicht signifikant zunimmt. Durch die Kombination der beiden Modulatoren PP2 und SQ29548 wird die α-Toxin-induzierte p27-Tyrosinphosphorylierung auf 20±7% gehemmt. Bei zusätzlicher Stimulation mit 10µM

Adrenalin (29±9%) oder 10µM ADP (30±16%) wird keine signifikante Steigerung der p27-Tyrosinphosphorylierung beobachtet. Durch die zeitgleiche Stimulation der Thrombozyten mit 0,3µg/ml α-Toxin und 10µM Adrenalin oder 10µM ADP wird eine nicht signifikante Zunahme der p27-Tyrosinphosphorylierung gegenüber der alleinigen p27-Tyrosinphosphorylierung mit 0,3µg/ml α-Toxin beobachtet.

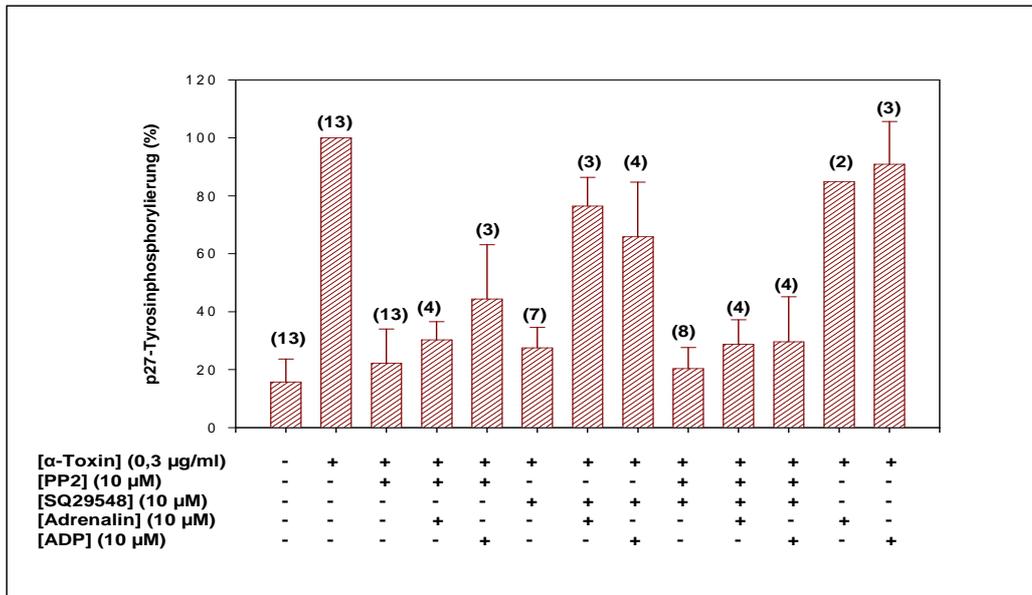


Abbildung 27: Einfluss verschiedener Modulatoren auf die α-Toxin-induzierte p27-Tyrosinphosphorylierung in humanen Thrombozyten

Isolierte humane Thrombozyten wurden jeweils mit 10µM PP2 und 10µM SQ29548 oder beiden Inhibitoren zusammen für 5min bei 37°C unter ständigem Rühren vorinkubiert und mit diversen Agonisten, wie in der Abbildung angegeben, stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und Proteinmodifikationen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotverfahren, wie im Kapitel Methoden beschrieben, analysiert. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet. Mit Hilfe des Densitometers wurden die Ergebnisse quantifiziert. Dabei wurde die Intensität des Phosphoproteinsignals bei 0,3µg/ml α-Toxin allein als 100% festgelegt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± SD. In Klammern ist die Anzahl an gleichen Experimenten angegeben. (siehe auch Tabelle 15 im Tabellenanhang)

6. Diskussion

6.1. Einfluss von α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* auf die Funktion von Thrombozyten

1964 wurde von Siegel und Cohen beschrieben, dass α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* eine Formveränderung (Shape Change) und die Aggregation von humanen Thrombozyten in plättchenreichem Plasma verursacht. Diese Effekte von α -Toxin auf die Thrombozytenaggregation im plättchenreichen Plasma konnten auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Bhakdi und Trantum-Jensen 1991, Schubert et al., 2011). Plättchenreiches Plasma enthält neben den Thrombozyten verschiedene weitere Komponenten wie Proteine, Glucose, Lipide und eine Reihe niedermolekularer Substanzen, deren Zusammensetzung zwischen verschiedenen Spendern stark schwanken kann und deshalb ein wenig definiertes Medium darstellt. Ausserdem enthält plättchenreiches Plasma zahlreiche Gerinnungsfaktoren und wichtige Substanzen für die primäre Hämostase und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen können. Um den Einfluss von plasmatischen Faktoren auf die Funktion und Signaltransduktion der Thrombozyten zu vermeiden, wurden daher für die hier vorgestellten Experimente gewaschene Thrombozyten verwendet, die in einem definierten, in der Thrombozytenforschung gebräuchlichen Puffer resuspendiert wurden. Unter experimentellen Bedingungen mit gewaschenen Thrombozyten ist die durch α -Toxin hervorgerufene Thrombozytenaggregation zeit- und konzentrationsabhängig. Die Konzentrationsabhängigkeit der α -Toxin-induzierte Aggregation von Thrombozyten konnte auch im plättchenreichen Plasma gezeigt werden (Schubert et al., 2011). Das Ausmaß der Aggregation beträgt mit gewaschenen Thrombozyten 7min nach Zugabe von $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin $37\pm 9\%$ ($n=45$). In der Arbeit von Schubert et al. wird bei einer Konzentration von $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin eine Aggregation von ungefähr 45% erreicht. Da in dieser Arbeit keine Angabe über den Zeitpunkt der Messung gemacht wird, ist ein Vergleich hinsichtlich des zeitlichen Auftretens der maximalen Thrombozytenaggregation nicht möglich.

Sowohl in der Arbeit von Schubert et al. als auch in unserer Arbeit wurde α -Toxin von Sigma-Aldrich verwendet. Nach Herstellerangaben enthält die gelieferte Proteinmenge nur 60% α -Toxin. Unter Berücksichtigung dieser Angabe entsprechen $3\mu\text{g/ml}$ α -Toxin in der vorliegenden Doktorarbeit $5\mu\text{g/ml}$ α -Toxin in der Arbeit von Schubert et al. Mit $5\mu\text{g/ml}$ α -Toxin wurden in der Arbeit von Schubert et al. ungefähr 85% Aggregation erreicht. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Faktoren im plättchenreichen Plasma einen verstärkenden Einfluss auf die Aggregation ausüben könnten.

Mittels Massenspektrometrie konnten wir zeigen, dass das käuflich erworbene α -Toxin von Sigma-Aldrich auch Enterotoxin B und Phospholipase C enthält. Enterotoxin B kann die Thrombin-induzierte Aggregation und Adhäsion von humanen Thrombozyten hemmen

(Morganti et al., 2008; Tran et al., 2006). Um den Einfluss dieser Verunreinigung auf die Thrombozyten zu testen, haben wir ein aus Zellkulturüberständen gereinigtes α -Toxin von der Arbeitsgruppe von Prof. Husmann (Mainz) im Vergleich getestet. Nach Stimulation zeigen die Thrombozyten gleiche Ergebnisse hinsichtlich der Aggregation und der Aktivierung bestimmter Kinasen wie p38 und JNK, sodass ein möglicherweise vorliegender hemmender Effekt von Enterotoxin B vernachlässigt werden kann. Ausserdem haben wir Enterotoxin B zwar in der Massenspektrometrie als Protein nachgewiesen, wodurch aber keine Aussage möglich ist, ob das Toxin auch biologisch aktiv ist.

Darüber hinaus bilden eine Vielzahl von *Staphylococcus aureus*-Stämmen neben anderen Toxinen auch α -Toxin, sodass eine gemischte Wirkung von verschiedenen Toxinen gerade in vivo erwartet werden kann. Nur *Staphylococcus aureus*-Stämme, die das „toxic shock syndrom“-Toxin bilden, bilden kein α -Toxin (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1991).

Die Anlagerung von α -Toxin an die Zellmembran soll über 2 verschiedene Mechanismen erfolgen. Aktuelle Daten implizieren, dass die membrangebundene Disintegrin-and-Metalloprotease 10 (ADAM10) für die Wirkung von α -Toxin wichtig ist und wahrscheinlich den hochaffinen Rezeptor für die Bindung der Monomere des α -Toxins an der Zellmembran darstellt (Wilke et al., 2010). An das Monomer lagern sich weitere Monomere an, bis ein hexa- oder heptamerer Komplex entstanden ist, der sich in die Membran einlagert. Zum anderen scheint es auch einen unspezifischen Adsorptionsmechanismus, über den bisher nichts weiter bekannt ist, zu geben (Berube und Bubeck-Wardenburg 2013).

ADAM10 als hochaffine Bindungsstelle für α -Toxin-Monomere wurde für humane Zellen wie Endothelzellen, Monozyten, Neutrophile (Blume et al., Kneidl et al., 2012) und primäre Keratinozyten, eine Form der Epithelzellen (Bin et al., 2012), bereits beschrieben. Auch humane Thrombozyten exprimieren ADAM10 auf der Zelloberfläche (Colciaghi et al., 2002; Fong et al., 2011), was eine Erklärung für die Empfindlichkeit gegenüber α -Toxin sein sollte.

Unsere Untersuchungen von Mäusen mit ADAM10-depletierten Thrombozyten zeigten, dass die Aggregation nach Aktivierung mit α -Toxin (2-20 μ g/ml) vollständig gehemmt ist (Abb.4). Diese Ergebnisse können als Indiz gewertet werden, dass die Bindung von α -Toxin über ADAM10 für die Wirkung entscheidend ist und der Einfluss des unspezifischen Adsorptionsmechanismus eine geringere Bedeutung hat. Zum anderen könnte es auch bedeuten, dass ADAM10 nicht nur als Bindungsstelle wirkt, sondern durch die Bindung von α -Toxin intrazelluläre Signaltransduktionswege über Mitglieder der Src-Familie aktiviert werden. In der Folge führt diese Bindung zur geordneten Aktivierung der Thrombozyten, da die frühe Phase der α -Toxin induzierten Aktivierung mit der Aktivierung durch natürliche Agonisten, wie Thrombin oder Kollagen vergleichbar ist (Abb.7).

Neben der Messung der Aggregation nach Born, stellt die Bestimmung der P-Selectinexpression und der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors mittels Durchflusszytometrie eine weitere Methode zur Untersuchung der Thrombozytenaktivierung dar. Die von α -Toxin-induzierte Aktivierung von humanen Thrombozyten und Thrombozyten von Wildtypmäusen führt zur Freisetzung von Granulainhaltsstoffen. Zu erkennen ist dies am Nachweis von P-Selectin, einem Marker für α -Granulamembranen, auf der Oberfläche der Thrombozyten (Schmitz et al., 1998; Abb.3, Abb.6).

Die Sekretion von Granulainhaltsstoffen geschieht Physiologischerweise, wenn Thrombozyten durch spezifische Liganden, wie vWF, Kollagen, Thromboxan A₂, ADP oder Thrombin, über ihre Rezeptoren aktiviert werden (Brass, 2003). Dabei wird sowohl eine Aktivierung der Proteinkinase C als auch ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet. Diese beiden Effekte interagieren synergistisch und führen zu einer Amplifizierung der Sekretion (Reed, 2007).

Der Zeitverlauf der P-Selectinexpression auf humanen Thrombozyten induziert durch α -Toxin erreicht in Abhängigkeit von der Konzentration ein transientes Maximum, das im weiteren Verlauf wieder abnimmt. Vergleichbare Effekte konnten auch für die GPIIbIIIa-Aktivierung auf humanen Thrombozyten beobachtet werden (Abb.2). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten aus den Aggregationsanalysen, da dort keine Reversibilität beobachtet wird (Abb.1). Möglicherweise liegt dies an der geringeren Thrombozytenzahl bei der durchflusszytometrischen Analyse (FACS-Analyse), die aus methodischen Gründen verwendet werden muss, damit keine Aggregatbildung eintritt.

Im Gegensatz zu humanen Thrombozyten, wird mit Wildtypmäusethrombozyten keine Reversibilität der GPIIbIIIa-Aktivität und der P-Selectinexpression in der FACS-Analyse beobachtet (Abb.5, Abb.6). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum einen an den verschiedenen Spezies liegen. Zum anderen unterscheidet sich aber auch die Präparation der Thrombozyten. So wurden die Messungen an Mäusethrombozyten in Vollblut durchgeführt, das neben Thrombozyten auch Erythrozyten enthält. Wie alle anderen Zellen enthalten Erythrozyten ADP und ATP in etwa millimolaren Konzentrationen (Lüthje, 1990). Erythrozyten könnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen durch α -Toxin lysiert werden und dabei ihren Inhalt freisetzen. ADP allein ist ein sehr schwacher Thrombozytenagonist, aber als wichtiger sekundärer Agonist verstärkt ADP viele Signalwege und trägt so zur Stabilisierung des Thrombus bei (Hechler und Gachet, 2011).

In Thrombozyten ist ADP vor allem in den dichten Granula lokalisiert und wird bei der Aktivierung freigesetzt. Die Sekretion von dichten und α -Granula ist mit Thrombozytenagonisten wie Thrombin, dem PAR-Peptid YLLSR und der Kalziumionophore Calcimycin beobachtet wurden (George et al., 1985; Haslam et al., 1979; Mirlashari et al., 1996). Jedoch können auf Grund der verschiedenen Methoden keine Aussagen über

quantitativen Umfang und zeitlichen Verlauf der Freisetzung gemacht werden. Möglicherweise sind die durch einen Kalziumeinstrom aktivierten Signalwege nicht ausreichend, um eine vollständige Freisetzung von ADP aus dichten Granula und damit eine irreversible Aktivierung der Thrombozyten zu erreichen.

Bereits 1967 wurde von Manohar et al. beschrieben, dass α -Toxin zu einer Schwellung von humanen Thrombozyten, jedoch nicht zur Lyse führt. Eine Folge dieses Effekts könnte sein, dass die Messung der Aggregation gestört wird und sich scheinbar irreversibel darstellt, obwohl die Aggregation reversibel verläuft.

6.2. Einfluss von α -Toxin auf die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen in humanen Thrombozyten

6.2.1. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten

In ruhenden Thrombozyten ist die Anzahl von Proteinen, die an Tyrosinresten phosphoryliert sind (=Tyrosinphosphorylierung), relativ gering. Nach der Stimulation mit verschiedenen Thrombozytenagonisten kommt es bei einer Vielzahl von Proteinen zur Tyrosinphosphorylierung. Auch bei Aktivierung mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin werden zeit- und konzentrationsabhängig Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese Phosphorylierungsmuster sind denen, durch Rezeptor-aktivierte Signalwege entstandenen, sehr ähnlich (Abb.7; Fälker et al., 2004, Nash et al., 2010).

Dabei hängen der Beginn und das Ausmaß der Proteintyrosinphosphorylierung und der Dephosphorylierung von der Toxinkonzentration ab. Je höher die Toxinkonzentration, desto schneller wird das Maximum der Proteintyrosinphosphorylierung erreicht (Abb.7). Bei unseren Untersuchungen standen die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von Proteinen mit relativen Molekularmassen bis 60kDa im Fokus. Nach Stimulation mit α -Toxin zeigen eine Reihe von diesen Proteinen (27, 29, 39kDa) Änderungen im Phosphorylierungsmuster (Tab.1).

Die Untersuchung von p27, einem Protein, das in Folge der Stimulation mit α -Toxin an Tyrosinresten phosphoryliert wird und in unstimulierten Thrombozyten nicht oder nur sehr gering phosphoryliert ist (Tab.1), zeigt den gleichen Verlauf der Tyrosinphosphorylierung wie in Thrombin-induzierten Thrombozyten (Fälker et al., 2005).

Obwohl die Phosphorylierungsmuster in aktivierten Thrombozyten unabhängig vom Stimulus sehr ähnlich aussehen, unterscheidet sich die Dephosphorylierung sehr stark im Zeitverlauf und im Ausmaß. Während nach Stimulation mit Thrombin eine Dephosphorylierung nur allmählich stattfindet, folgt der Tyrosinphosphorylierung in α -Toxin-stimulierten Thrombozyten eine rasche und vollständige Dephosphorylierung. Zur Quantifizierung dieser primären Beobachtungen haben wir die Proteine mit den Molmassen von 27, 29, und 39kDa untersucht, deren Phosphorylierungsstatus sich, wie schon in früheren Untersuchungen gezeigt, nach

Stimulation mit Thrombin ändert (Fälker et al., 2005). Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass α -Toxin konzentrationsabhängig eine Dephosphorylierung der 3 Proteine bewirkt (Tab.1). Innerhalb von 10min werden p27 und p29 nahezu vollständig dephosphoryliert, nicht aber p39. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass α -Toxin in der Lage ist, Thrombozyten zu aktivieren, was mit Proteintyrosinphosphorylierung und Aggregation einhergeht, wohingegen die Dephosphorylierung verglichen mit Thrombin- oder Kollagenstimulation deutlich ausgeprägter ist. Dabei ist der Zeitverlauf dieser Dephosphorylierungen von der Toxinkonzentration abhängig ist. Je höher die Konzentration des Toxins desto schneller erfolgt die Dephosphorylierung.

6.2.2. Einfluss von Calcimycin

Alpha-Toxin entfaltet seine Wirkung über die Bildung von Transmembranporen, die durchlässig für kleine Moleküle, wie Nukleotide, und Ionen, wie Kalziumionen oder Kaliumionen sind (Kloft et al., 2009). Der Kalziumeinstrom wird als der wichtigste Wirkmechanismus von α -Toxin betrachtet (Bhakdi et al., 2006). Das führte uns zu der Hypothese, dass der Kalziumeinstrom primär für die Phosphorylierung und Dephosphorylierung verantwortlich ist. Um diese Vermutung zu untermauern, wurden α -Toxineffekte mit der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) verglichen, die ebenfalls zur Aktivierung von Thrombozyten durch Kalziumeinstrom führt (Rasheed und Saeed, 2004). Analog zu α -Toxin führt die Stimulation mit Calcimycin zur Tyrosinphosphorylierung und zu einer schnellen Dephosphorylierung (Abb.9). Diese Beobachtungen bestärken unsere Annahme, dass dem primären Kalziumeinstrom eine bedeutsame Rolle bei der Thrombozytenaktivierung zukommt.

In der Arbeit von Takayama et al. (1991) wurde gezeigt, dass es in Thrombozyten, die mit der Kalziumionophore A23187 stimuliert werden, zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten an 3 Proteinen mit apparenten Molmassen von 76, 124 und 135kDa kommt. Die Tyrosinphosphorylierung dieser 3 Proteine kann durch den intrazellulär wirksamen Kalziumchelator BAPTA-AM gehemmt werden. Die Kalziumionophore verstärkt ebenfalls die Phosphorylierung von Proteinen mit apparenten Molmassen von 60, 80 und 130kDa an Tyrosinresten (Vostal et al., 1991). Das Protein mit der Molmasse von 130kDa wurde später als Vinculin identifiziert (Vostal et al., 1993).

Auch die Thrombozytenaggregation wird unter unseren experimentellen Bedingungen mit gewaschenen Thrombozyten durch die Kalziumionophore Calcimycin induziert (Abb.14). Die durch A23187-induzierte Aggregation kann durch andere Agonisten wie Serotonin (Connor et al., 2001) oder Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) im plättchenreichen Plasma verstärkt werden (Rasheed und Saeed 2004).

6.2.3. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Serin-Threonin-Kinasen

a) *MAPKinasen*

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wurden in Thrombozyten die mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKinasen) ERK1/2, p38 und JNK1/2 identifiziert, die durch unterschiedliche physiologische Thrombozytenagonisten wie Thrombin, Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF) und ADP aktiviert werden (Adam et al., 2008). Auch α -Toxin führt zur Aktivierung der stressinduzierten MAPKinasen p38 und JNK1/2, wohingegen die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) nicht betroffen sind (Abb.18). Die MAPKinasen p38 kann durch eine Reihe von Toxinen anderer Pathogene ebenfalls aktiviert werden. So wurde die Aktivierung von p38 durch Pneumolysin (Stringaris et al., 2002), Streptolysin O (Stassen et al., 2003), Anthraxtoxin (Popova et al., 2006) und α -Toxin (Husmann et al., 2006) in verschiedenen Kulturzellen gezeigt. Der genaue Weg zur Aktivierung von p38 nach Stimulation mit α -Toxin ist unbekannt. Von Kloft et al. (2009) konnten mit HEK293-Zellen gezeigt werden, dass zur p38-Aktivierung neben dem Kalziumeinstrom über die Pore auch der Ausstrom von Kalium aus den Zellen beiträgt.

Die MAPKinasen p38 und JNK1/2 zeigen nach α -Toxinstimulation einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Aktivierung wie in Thrombin-stimulierten Thrombozyten (Abb.18; Bugaud et al., 1999; Kramer et al., 1995). Während der zeitliche Ablauf der Aktivierung ähnlich aussieht, ist der Verlauf der Inaktivierung sehr verschieden. In α -Toxin-stimulierten Thrombozyten sind p38 und JNK1/2 nach 5min bereits vollständig inaktiviert, während nach Stimulation mit Thrombin die Aktivierung bestehen bleibt (Abb.18; Bugaud et al., 1999; Kramer et al., 1995).

b) *Proteinkinase B*

Neben der Aktivierung der MAPKinasen durch α -Toxin konnten wir erstmals zeigen, dass aus der Gruppe der Serin-Threonin-Kinasen die Proteinkinase B (Akt) aktiviert wird. Die Proteinkinase B kann in humanen Thrombozyten durch Agonisten wie Thrombin, von Willebrand-Faktor, dem TxA₂-Analoga U46619 und Kollagen aktiviert werden (Barry et al., 2002; Cho et al., 2002; Kroner et al., 2000).

Für eine vollständige Aktivierung der Proteinkinase B ist die Phosphorylierung an den beiden Aminosäuren Thr-308 und Ser-473 notwendig. Während nachgewiesen wurde, dass die Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PKC β) für die Phosphorylierung von Thr-308 verantwortlich ist, ist die Kinase, welche Ser-473 phosphoryliert, bisher unbekannt. In einer Reihe von verschiedenen Zelltypen erfolgt diese Phosphorylierung mTOR-vermittelt (mammalian target of rapamycin). Für Mastzellen wurde berichtet, dass die Phosphorylierung durch PKC β erfolgt und in Herzmuskelzellen wird die Phosphorylierung durch PAK1 reguliert. Alle diese Proteinkinase sind auch in humanen Thrombozyten vorhanden, doch es ist unklar, welches dieser Proteine für die Aktivierung von Akt in Thrombozyten verantwortlich ist.

(Woulfe 2010). Unsere Untersuchungen der Aktivierung von Akt erfolgten indirekt über die Aktivierung verschiedener Substrate. Dabei richteten wir den Fokus auf das Prolin-reiche Akt Substrat mit 40kDa (PRAS40). Für eine Phosphorylierung dieses Substrates ist die duale Phosphorylierung von Akt an Thr-308 und Ser-473 Voraussetzung (Moore et al., 2011). Da nach Stimulation mit α -Toxin nach 5min eine Phosphorylierung von PRAS40 beobachtet wird, ist α -Toxin in der Lage Signalwege zu induzieren, welche die duale Phosphorylierung und damit verbunden die vollständige Aktivierung der Proteinkinase B bewirken.

Humane Thrombozyten enthalten 3 Akt-Isoformen, Akt1, Akt 2 und Akt 3 (O'Brien et al., 2011). Die Bedeutung der Proteinkinase B für die Funktion von Thrombozyten wurde in Mausmodellen untersucht. Mit Thrombozyten von Akt1- oder Akt2-deletierten Mäusen erfolgt eine reduzierte Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin, Thromboxan A2 und von Willebrand-Faktor, aber nur bei Mäusethrombozyten mit einer Akt1-Deletion zeigt sich eine Hemmung von Kollagen-stimulierten Thrombozyten. Mäusethrombozyten mit Akt3-Deletion weisen eine verminderte Aggregation und Sekretion bei Stimulation mit einer niedrigen Thrombinkonzentrationen von 0,018U/ml auf, aber nicht bei Stimulation mit Kollagen oder vWF (Dangelmaier et al., 2013).

Unsere Untersuchungen auf pharmakologischer Ebene ergaben, dass bei Vorinkubation mit dem unspezifischen Akt-Inhibitor XVIII die Thrombin-induzierte Aggregation fast vollständig gehemmt wird, die Kollagen-induzierte Aggregation hingegen ist nur wenig gehemmt. (Tab.2). Da für die Kollagen-induzierten Signalwege eine starke Abhängigkeit von Akt1 beschrieben wurde, lassen diese Ergebnisse die Annahme zu, dass der Akt-Inhibitor XVIII die Akt1-Isoform kaum beeinflusst, wohingegen die Hemmung der Thrombin-induzierten Signalwege auf eine Hemmung der Akt2-Isoform zurückzuführen sein könnte.

Auch die α -Toxin-induzierte Aggregation wird durch den Akt-Inhibitor XVIII beeinflusst. Die Aggregation mit 3 und 0,3 μ g/ml α -Toxin ist jeweils um ungefähr ein Drittel gehemmt. Dies könnte bedeuten, dass an der α -Toxin-induzierten Aggregation mindestens 2 der 3 Akt-Isoformen in Thrombozyten beteiligt sind (Tab.2).

6.2.4. Wirkung von Phosphataseinhibitoren

Die verschiedenen Nettoniveaus der Proteintyrosinphosphorylierung sind ein Ergebnis der Balance zwischen den Wirkungen von Proteintyrosinkinase und Proteintyrosinphosphatasen. Die Regulation der Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle für die Thrombozytenfunktionen.

Um die Aktivität unterschiedlicher Phosphatasen unter dem Einfluss von α -Toxin zu untersuchen, wurden die Phosphataseinhibitoren Natriumorthovanadat, Okadasäure und Ciclosporin A eingesetzt, die sich in ihrer Spezifität für verschiedene Phosphatasen unterscheiden.

a) ***Natriumorthovanadat***

Ein unspezifischer Inhibitor der Proteintyrosinphosphatasen ist Natriumorthovanadat. Natriumorthovanadat besitzt eine ähnliche Struktur wie Phosphat und kann deshalb an das katalytische Zentrum der Proteintyrosinphosphatasen binden und diese blockieren. Der Mechanismus ist jedoch nicht spezifisch für Proteintyrosinphosphatasen und wurde ebenfalls bei anderen Enzymen wie ATPasen und Nukleasen beobachtet. (Burke et al., 1998).

Natriumorthovanadat (30 μ M) verstärkt die Aggregation von Thrombozyten mit 3 μ g/ml und 0,3 μ g/ml α -Toxin. Thrombozyten, die 20min nur mit Natriumorthovanadat behandelt wurden, zeigten den von uns gewählten Bedingungen keine Aggregation (Tab.7). Diese Daten widersprechen einer Arbeit von Inazu et al. (1990), die gezeigt hat, dass eine Behandlung mit Natriumorthovanadat allein zur Aggregation von Thrombozyten führt. Solche Diskrepanzen könnten sich mit Unterschieden bei den verschiedenen Isolierungsmethoden von Thrombozyten erklären lassen. Thrombozyten können bereits während der Aufarbeitung teilweise aktiviert werden. Inazu et al. (1990) arbeiteten während der gesamten Präparation mit einem pH-Wert von 7,4 und mit Magnesiumchlorid im Puffer. Diese Bedingungen geben zwar die Verhältnisse im Blut besser wider als der von uns gewählte Waschpuffer mit einem pH-Wert von 6,4 und ohne Magnesiumchlorid, erhöhen aber bei der Zentrifugation das Risiko der Präaktivierung der Thrombozyten.

Neben der Aggregation konnten wir ebenfalls zeigen, dass Natriumorthovanadat die Proteintyrosinphosphorylierung von p27 sowie die duale Phosphorylierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 in α -Toxin-stimulierten Thrombozyten verstärkt (Tab.8). Dabei wird die Proteintyrosinphosphorylierung von p27 auch durch Natriumorthovanadat alleine erhöht. Diese Daten passen zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Inazu et al., 1990, Pumiglia et al., 1992). Von Inazu et al. (1990) konnten ausserdem gezeigt werden, dass Natriumorthovanadat zur Proteintyrosinphosphorylierung einer Reihe von Proteinen mit apparenten Molmassen von 80, 76, 53 und 38kDa führt. Da der zeitlich Verlauf der Phosphorylierung und der Dephosphorylierung dem unserer Ergebnisse entspricht, könnte es sich bei dem Protein mit 38kDa um die MAPKinase p38 handeln.

b) ***Okadasäure***

Okadasäure ist ein potenter, spezifischer und zellpermeabler Inhibitor von Phosphoserin/Threonin-Protein-Phosphatasen (PSTPs). Die von uns verwendete Okadasäurekonzentration von 1 μ M blockiert die quantitativ wichtigen Proteinphosphatasen 1 und 2A. Calcineurin (PP2B) wird erst durch deutlich höhere Okadasäurekonzentrationen von 5 μ M gehemmt, während PP2C nicht durch Okadasäure blockierbar ist (Biolan et al., 1988; Walter und Mumby, 1993). Die Inkubation von humanen Thrombozyten mit Okadasäure führt

zu einem deutlichen Shape Change, aber es kommt weder zur Freisetzung von Granulainhaltsstoffen noch zu einem Kalziumeinstrom. Dabei ist der Okadasäure-induzierte Shape Change morphologisch einzigartig und anders als der durch Thrombin-induzierte Shape Change (Kawakami et al., 1994).

Okadasäure inhibiert die Aggregation von Thrombozyten induziert durch ADP, Adrenalin, Kollagen und Thrombin (Higashihara et al., 1992). Auch unsere Ergebnisse bestätigen diese Befunde (Tab.7). Bereits 1993 zeigten Murata et al. dass die Thrombin-induzierte Aggregation durch Okadasäure nur in Gegenwart von Kalzium inhibiert wird, in einem kalziumfreien Puffer (mit 1mM EGTA) wird dieser inhibitorische Effekt nicht beobachtet. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass der inhibitorische Effekt von Okadasäure auf eine Hemmung des Kalziumeintroms zurückzuführen ist und dass die Phosphoserin/Threonin-Protein-Phosphatasen eine wichtige Rolle bei der Regulation der kalziumabhängigen Aktivierung in Thrombozyten spielen.

Auch Chiang (1993) untersuchte die Phosphorylierungen an Tyrosinresten nach Stimulation der Thrombozyten mit Kollagen in Gegenwart von Okadasäure. Dabei konnte demonstriert werden, dass Okadasäure die Phosphorylierung von 7 Proteinen mit apparenten Molmassen von 14, 25, 32, 36, 50, 60 und 80kDa deutlich verstärkt. Des Weiteren zeigten Experimente mit Thrombin-stimulierten Thrombozyten, dass Okadasäure die Dephosphorylierung von verschiedenen Proteinen im Bereich von 50-230kDa konzentrationsabhängig hemmt (Artcanuthurry et al., 1996).

Bei unseren Untersuchungen waren die Änderungen der Phosphorylierung von p27 an Tyrosinresten ebenso wie die Phosphorylierung der MAPKinasen von besonderem Interesse. Hier konnten wir zeigen, dass nach Stimulation der Thrombozyten mit α -Toxin in Gegenwart von Okadasäure die Phosphorylierung von p27 an Tyrosinresten ebenso wie die Aktivierung der MAPKinasen verstärkt ist und die Dephosphorylierung der Proteine verzögert wird. Die beschriebene Verzögerung der Dephosphorylierung der MAPKinase p38 wird ebenso bei Stimulation mit Kollagen in Gegenwart von Okadasäure beobachtet (Sundaresan et al., 2002).

c) *Ciclosporin A*

Ciclosporin A (CsA) ist ein zyklisches Oligopeptid und ein potentes Immunsuppressivum (Kapturczak et al., 2004). Es ist ein Inhibitor der Proteinphosphatase Calcineurin (PP2B). Calcineurin ist eine kalziumabhängige Phosphatase, die in humanen Thrombozyten die Sekretion von Granula und die Aktivität der PI3-Kinase reguliert.

Darüber hinaus steigert Ciclosporin A das Ausmaß der Aggregation von humanen Thrombozyten. Eine gesteigerte Aggregation wurde bei der Kombination von CsA mit ADP, Kollagen, Adrenalin und Thrombin beobachtet (Grace et al., 1987; Haller et al., 1994). Im

Gegensatz zu den Literaturdaten konnten wir keine gesteigerte Aggregation bei der Kombination von CsA mit Kollagen oder Thrombin beobachten (Tab.7). Möglicherweise sind diese Unterschiede darauf zurückzuführen, dass die zitierten Ergebnisse mit plättchenreichem Plasma gewonnen wurden und in der vorliegenden Arbeit gewaschene Thrombozyten verwendet wurden.

CsA beeinflusst neben der Aggregation auch die Phosphorylierung verschiedener Proteine. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass in Anwesenheit von CsA nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP oder Thrombin die Aktivität der Proteinkinase C, gemessen über die Phosphorylierung des PKC-Substrats Pleckstrin, erhöht ist (Haller et al., 1994; Naik et al., 1993). Nach Inkubation der Thrombozyten mit CsA ist die mit α -Toxin-induzierte Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 und die Tyrosinphosphorylierung von p27 gehemmt (Tab.8). Im Rahmen dieser Arbeit wurde von uns auch das p27 identifiziert. Nach 3 chromatographischen Säulenreinigungsschritten und Massenspektrometrie konnte p27 als Apolipoprotein A1 identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Mit Blick auf die verschiedenen Proteinphosphataseinhibitoren mit unterschiedlicher Spezifität ist die Wirkung auf humane Thrombozyten heterogen. So führt die Hemmung der Proteintyrosinphosphatasen durch Natriumorthovanadat zu einer Zunahme an Tyrosinphosphorylierung und gleichzeitig zu einer gesteigerten Aggregation, wohingegen die Abhäufung von phosphoryliertem p27 und vermehrte Aktivierung der MAPKinasen durch Okadasäure zur Inhibition der Aggregation führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Zusammenhang zwischen bestimmten intrazellulären Signalwegen und der Aggregation noch weiterer Klärung bedarf.

6.3. Bedeutung von Src für die Wirkung von α -Toxin

6.3.1. Proteolytische Spaltung von Src und dessen Hemmung

Ruhende Thrombozyten zeigen ein charakteristisches Muster an Proteinen, die an Tyrosinresten phosphoryliert sind (Abb.7). Dabei ist eine Hauptbande bei 60kDa zu erkennen, die die Proteintyrosinkinase Src darstellt (Abb.8).

Die zelluläre Tyrosinkinase Src wird bei Stimulation der Thrombozyten mit α -Toxin proteolytisch gespalten. Innerhalb von 5min nach Stimulationsbeginn sind ungefähr 50% der in Thrombozyten enthaltenen Proteinmenge an Src gespalten (Abb.11), während in Thrombin-stimulierten Thrombozyten innerhalb von 10min weniger als 10% der enthaltenen Proteinmenge an Src gespalten werden (Ariyoshi et al., 1995). Von Oda et al. konnte bereits 1993 gezeigt werden, dass Src auch in Calcimycin-stimulierten Thrombozyten innerhalb von 5min

proteolytisch degradiert wird. Die dabei erhaltenen Degradationsprodukte sind typische für die Aktivität der Protease Calpain.

In Thrombozyten gibt es 2 Isoformen von Calpain, μ -Calpain und m-Calpain. Calpaine sind an einer Reihe von Signalwegen beteiligt, die für einen Anstieg an intrazellulärem Kalzium verantwortlich sind. Nach der Aktivierung spaltet Calpain neben der Tyrosinkinase Src eine Reihe von weiteren Proteinen, wie FAK (focal adhesion kinase), β 3-Integrin, Tallin, Adducin, Vinculin, die schwere Kette des Myosins, Aktinbindungsprotein und Spektrin (Schönwalder et al., 2000).

Die proteolytische Spaltung von Src in α -Toxin stimulierten Thrombozyten kann durch den Calpaininhibitor Calpeptin gehemmt werden (Abb.12). Diese Degradationshemmung von Src durch Calpain in humanen Thrombozyten konnte auch nach Stimulation Thrombin, der Kalziumionophore A23187 oder 1mM Dibucain, einem Calpainaktivator, gezeigt werden (Ariyoshi et al., 1995; Oda et al., 1993).

Ausserdem kann die Spaltung von Src in α -Toxin stimulierten Thrombozyten durch Reduktion von extrazellulärem Kalzium gehemmt werden (Abb.12). Unsere Daten passen zu den Ergebnissen von Oda et al. (1993) die zeigen, dass die Src-Spaltung in Gegenwart von EGTA nach Stimulation mit der Kalziumionophore A23187 oder 1mM Dibucain gehemmt ist. Wir haben für unsere Untersuchungen zur Reduktion von extrazellulärem Kalzium 1mM Citrat verwendet, da EGTA zur Dissoziation des Integrins α IIB β 3 (GPIIb/IIIa) führt und dadurch die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen stimuliert (Negrescu et al., 1996).

6.3.2. Einfluss von Src auf die Aggregation

Ausgehend von Veröffentlichungen über Mäusethrombozyten mit einer μ -Calpain-Depletion, die eine Hemmung der Aggregation, hervorgerufen durch Agonisten wie Thrombin, Kollagen, ADP und Calcimycin, zeigen (Kuchay und Chishti, 2007), konnten wir nachweisen, dass die α -Toxin-induzierte Aggregation durch 1 μ M Calpeptin signifikant gehemmt wird (Abb.14). Eine Hemmung der Aggregation konnte auch mit einem anderen zellpermeablen Calpaininhibitor, Leupeptin, bei Calcimycinstimulation beobachtet werden (Elce et al., 1989).

Die Thrombin-induzierte Aggregation hingegen scheint nicht betroffen zu sein (Abb.14). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde von Croce et al. (1999) veröffentlicht, dass die mit 0,05U/ml Thrombin induzierte Aggregation durch 150 μ M Calpeptin oder 50 μ M Calpastat, einem anderen Calpaininhibitor, gehemmt werden kann. Da für das von uns verwendete Calpeptin der Firma Calbiochem (Merck) für μ -Calpain eine IC₅₀ von 52nM bzw. für m-Calpain eine IC₅₀ von 34nM angegeben wurde, haben wir uns für die Verwendung einer Calpainkonzentration von 1 μ M entschieden, um beide Isoformen zu hemmen. Unabhängig davon, dass die intrazelluläre Konzentration von Calpeptin am Wirkort nicht bekannt ist, kann

davon ausgegangen werden, dass mit Verwendung einer höheren Inhibitorkonzentration auch unspezifische Wirkungen zunehmen.

Calpaine werden mit der Modulation der Integrin-Signalwege in Verbindung gebracht. Vermutlich beeinflussen die Calpaine die Integrin-abhängigen Signalwege durch Kontrolle des Phosphorylierungsstatus einer Vielzahl von Proteinen über die Regulation der Tyrosinkinase und Phosphatasen. Mehr als 20 Proteine, wie Tallin, Filamin, Myosin, C-terminal Src Kinase (CSK) und die Tyrosinkinase Src, scheinen davon betroffen (Kuchay und Chishti, 2007).

Da wir bei den vorangegangenen Aggregationsversuchen sahen, dass Calpain-abhängige Prozesse bei der α -Toxin-induzierten Aggregation wichtig sind, haben wir unseren Fokus auf die Familie der Src-Kinasen gelegt, die eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung spielen und gleichzeitig auch durch Calpain modifiziert werden. Für diese Fragestellung behandelten wir die Thrombozyten mit verschiedenen Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen.

Die Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen PP1 und PP2, sowie das inaktive Strukturanaloga PP3 gehören zu den Pyrozolopyrimidinen. Seit fast einer Dekade sind PP1 und PP2 Standardsubstanzen zur Untersuchung der Inhibition der Src-Kinasen (Summy et al., 2005).

Frühere Untersuchungen an Thrombozyten zeigen, dass der SFK-Inhibitor PP2 die Aggregation induziert durch CRP (collagen-related peptide) hemmt, während die Aggregation hervorgerufen durch 1U/ml und 0,1U/ml Thrombin nicht betroffen ist (Hughan et al., 2007). Diese Beobachtung konnten wir mit unseren Untersuchungen bestätigen. Auch die Aggregation hervorgerufen durch das Toxin der Viper *Proatheris superciliaris*, welches als PAR1-Agonist wirkt, kann nicht durch PP1 gehemmt werden (Laing et al., 2005). Ebenso kann die Kollagen-induzierte Aggregation mit einem weiteren SFK-Inhibitor SU6656, ein Sulfonamidderivat, gehemmt werden. Auch in diesem Fall ist die Aggregation nach Stimulation mit Thrombin nicht betroffen. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass in Kollagen-stimulierten Thrombozyten die Aggregation über Src-abhängige Signalwege erfolgt, während die Thrombin-induzierte Aggregation weniger von diesen Signalwegen abhängig scheint.

Auch die mit 0,3 μ g/ml α -Toxin-induzierte Aggregation kann durch die Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen PP1, PP2 und SU6656 signifikant gehemmt werden (Abb.15).

Mit unseren Versuchen konnten wir ausserdem zeigen, dass eine Vorinkubation mit dem SFK-Inhibitor Dasatinib, der als Pharmakon zur Behandlung von malignen Erkrankungen verwendet wird, zur Hemmung der mit 0,3 μ g/ml α -Toxin-induzierten Aggregation führt (Abb.15). Neben der α -Toxin induzierten Aggregation ist auch die Kollagen-induzierte Aggregation betroffen, während die Aggregation nach Thrombinstimulation wiederum nicht beeinflusst wird (Abb.15; Gratacap et al., 2009). Diese Ergebnisse unterstreichen die funktionelle Bedeutung von Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen für die α -Toxinwirkung.

6.3.3. Autophosphorylierung von Src an Tyr-416

Die Familie der Src-Kinasen gehört zur Gruppe der primär nicht Rezeptor-gekoppelten („nonreceptor PTKs“) Proteintyrosinkinasen, die mit einem Anteil von 0,2-0,4% an der Gesamtproteinmenge den größten Anteil bilden (Golden et al., 1986).

Von Ferrell und Martin wurde gezeigt, dass eine Vielzahl von Proteinen in zeitlichen Wellen phosphoryliert wird. Auch die PTK werden in zeitlicher Abfolge phosphoryliert. Aus der Gruppe der primär nicht Rezeptor-gekoppelten PTK wird nach Stimulation mit Thrombin oder Kollagen zuerst Syk, dann die Mitglieder der Familie der Src Kinasen Src, Fyn und Yes und erst nach 30-60s FAK phosphoryliert (Presek und Martinson 1997).

Für die Tyrosinkinase Src konnten verschiedene Tyrosinreste identifiziert werden, die an der Regulation der enzymatischen Aktivität durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen beteiligt sind (Bjorge et al., 2000; Tatosyn und Mizenina 2000). Die Phosphorylierung von Src an Tyr-527 wird durch regulatorische Proteine wie die C-terminale Src Kinase (CSK) oder die CSK-homologen Kinasen (CHK) gesteuert (Eichhorn et al., 2007). Die Phosphorylierung an Tyr-527 bewirkt die Bildung der geschlossenen Konformation von Src durch eine hochaffine Bindung zwischen der SH2-Domäne und der C-terminalen Region, wodurch Src enzymatisch inaktiv ist. Die Dephosphorylierung von Tyr-527 führt zu einer Konformationsänderung, wodurch Src in der katalytischen Domäne an Tyr-416 autophosphoryliert werden kann und damit eine Erhöhung der Kinaseaktivität bewirkt (Tatosyan und Mizenina, 2000). Von Irtegun et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass Src auch in der geschlossenen Konformation an Tyr-416 phosphoryliert vorliegt. Eine basale Tyr-416 Autophosphorylierung von Src von ungefähr 60% wird auch in humanen Thrombozyten beobachtet (Abb.13). Da die Tyr-416 Autophosphorylierung mit Zunahme der Kinaseaktivität korreliert (Reuter et al., 1990), wird der Phosphorylierungsgrad von Tyr-416 benutzt, um die katalytische Aktivierung zu erkennen (Irtegun et al., 2013). So konnten wir durch Nachweis der Tyr-416-Phosphorylierung zeigen, dass α -Toxin auch die katalytische Aktivität von Src erhöht, da nach Stimulation mit α -Toxin die Autophosphorylierung von Src zeit- und konzentrationsabhängig induziert wird (Abb.13). Die Autophosphorylierung von Src durch einen Kalziumeinstrom konnte ebenfalls am Beispiel der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) gezeigt werden (Abb.13). Liebenhoff et al. haben 1993 durch direkte Messung der Kinaseaktivität von Src demonstriert, dass nach Aktivierung der Thrombozyten mit Calcimycin die katalytische Aktivität von Src zunimmt. Der α -Toxin-induzierten Autophosphorylierung an Tyr-416 folgt eine schnelle und nahezu komplette Dephosphorylierung innerhalb von 5min, die in Gegenwart des Calpaininhibitors Calpeptin um circa 2min verzögert ist (Daten nicht gezeigt). In A23187-stimulierten Thrombozyten führt Calpeptin zu einer minimalen Verstärkung der Phosphorylierung von Src innerhalb von 15s und innerhalb von 120s zu einer vollständigen Dephosphorylierung (Pain et al., 1999).

Die Src-Autophosphorylierung an Tyr-416 wird sowohl bei Stimulation mit α -Toxin als auch mit Kollagen durch die Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib gehemmt (Abb.17). Dabei kommt es durch 10 μ M Dasatinib zu einer nahezu vollständigen Hemmung. Die Daten stimmen mit den Beobachtungen von Gratacap et al. (2009) überein, dass Dasatinib die Kollagen induzierte Phosphorylierung von Src an Tyr-416 konzentrationsabhängig hemmt.

6.4. Einfluss von Src auf die Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Proteine

6.4.1 Tyrosinphosphorylierung von p27

Aus früheren in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass der SFK-Inhibitor PP1 die Thrombin-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen mit apparenten Molmassen von 27, 29, 31 und 33kDa hemmt (Edmead et al., 1999). Unter unseren experimentellen Bedingungen ist bei Stimulation mit Thrombin die Tyrosinphosphorylierung von p27 durch die SFK-Inhibitoren PP2, SU6656 und Dasatinib betroffen, aber nicht durch PP1 (Abb.23). Durch Vorinkubation mit PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib konnte beobachtet werden, dass die α -Toxin- und die Kollagen-induzierte Tyrosinphosphorylierung von p27 gehemmt wird (Abb.23, Abb.24). 20 μ M des SFK-Inhibitors Dasatinib hemmen die Kollagen induzierte Proteintyrosinphosphorylierung in einem Bereich der apparenten Molmassen von 50-200kDa vollständig, wohingegen bei Stimulation mit Thrombin die Hemmung nur schwach ausgeprägt ist. Erst bei einer Dasatinibkonzentration von 100 μ M ist die Hemmung nahezu vollständig (Gratacap et al., 2009). Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Signale der Tyrosinkinase Src oder anderen Mitgliedern der SKF für die globale Tyrosinphosphorylierung nötig sind.

6.4.2. Aktivierung der MAPKinasen

Die MAPKinasen p38 und JNK1/2 werden durch α -Toxin zeit- und konzentrationsabhängig aktiviert (Abb.18). In Gegenwart von 1 μ M Calpeptin ist die Aktivierung von p38 und JNK1/2 durch α -Toxin verzögert (Abb.22). Über den Zusammenhang von Calpain und die MAPKinasen ist eine Reihe von Ergebnissen aus der Literatur bekannt. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass vergleichbar zu unseren Arbeiten die Hemmung von Calpain die Aktivierung von p38 hemmt. So hemmen 50 μ M Calpeptin die Aktivierung von p38 in Myoblasten (C2C12) (Kook et al., 2008). Auch mit den Calpaininhibitoren 1 und 2 konnte die Aktivierung von p38 in männlichen Rattenkeimzellen gehemmt werden (Lizama et al., 2009).

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Hemmung der MAPKinase p38 mit dem Inhibitor SD203580 die Aktivität von Calpain in CRP-stimulierten Thrombozyten hemmt (Siljander et al., 2001). Auch die Hemmung von JNK1/2 mit 20 μ M SP600125 führt in HEK-293 Zellen zur Hemmung der m-Calpainaktivierung (Su et al., 2010).

Da die Hemmung von Calpain einen Einfluss auf die Aktivierung der MAPKinasen ausübt und die Kinase Src ein Substrat von Calpain ist, wurde auch der Einfluss von SFK auf die Aktivierung der MAPKinasen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib die Aktivierung der MAPK p38 und JNK nach Stimulation mit α -Toxin hemmen (Abb.20). Die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 durch Kollagen ist sensitiv gegenüber PP1, PP2 und SU6656, der Einfluss auf die Thrombin-induzierte Aktivierung der MAPKinasen ist deutlich geringer (Tab.6).

Diese Daten zeigen, dass die MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 „downstream“ der Familie der Src Kinasen geregelt werden. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die ADP-induzierte ERK1/2-Aktivierung durch PP2 hemmbar ist (Garcia et al., 2005). Auch die PDGF-induziert Aktivierung eines Proteins mit apparenten Molmasse von 36kDa, das möglicherweise p38 oder JNK1/2 sein könnte, wird durch den Inhibitor SU6656 gehemmt. Die ERK1/2-Aktivierung dagegen ist nicht betroffen (Blake et al., 2000). Darüber hinaus konnten Eichhorn et al. (2007) nachweisen, dass eine Untereinheit von PP2A die Aktivierung von JNK1/2 hemmt, indem es die Aktivität der Tyrosinkinase Src hemmt. Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass die Überexpression von v-Src auch zu einer verstärkten Aktivierung von JNK1/2 führt (Xie et al., 1995).

6.5. Bedeutung der sekundären Amplifizierungsmechanismen

Für unsere Untersuchungen betrachteten wir anfangs α -Toxin als alleinigen primären Stimulus. Diese Annahme muss aber nicht unbedingt mit den Bedingungen in vivo übereinstimmen. So führt α -Toxin durch Lyse von Erythrozyten zur Freisetzung von ADP und es könnte zu einem synergistischen Effekt der beiden Substanzen auf Thrombozyten kommen, da dieser auch für andere Agonisten beobachtet wurde. Auch durch eine Endothelverletzung und Freilegung der subendothelialen Matrix könnten die Thrombozyten synergistisch durch Kollagen und α -Toxin aktiviert werden. Unter unseren experimentellen Bedingungen konnten wir beobachten, dass die zeitgleiche Stimulation mit niedrigen Konzentrationen Kollagen (1 μ g/ml) oder Thrombin (0,05U/ml) und 0,1 μ g/ml α -Toxin zur Verstärkung der Aggregation führt (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von diesen Beobachtungen werden die sekundären Amplifizierungsmechanismen genauer untersucht.

6.5.1. Einfluss von TxA₂

Thromboxan A₂ wird von aktivierten Thrombozyten freigesetzt. Dabei unterstützt und verstärkt TxA₂ die Antwort der Thrombozyten auf den initialen Stimulus. Das TxA₂-Analogon U46619 führt zur Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen inklusive der Tyrosinkinase FAK, Src und Syk (Minuz et al., 2006). So sind auch die α -Toxin induzierte Aggregation, Phosphorylierung von p27 und die Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 von der TxA₂-Wirkung abhängig (Abb.15, Abb.20, Abb.24). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass α -Toxin die Synthese von TxA₂ in Herzmuskelzellen stimuliert (Sibelius et al., 2000). Ausserdem führt die Stimulation von Thrombozyten mit der Kalziumionophore Calcimycin zur TxA₂-Synthese (Buschbeck et al., 1999; Rasheed und Saeed, 2004).

Nach Blockade des Thromboxan A₂-Rezeptors mit dem spezifischen Antagonisten SQ29548 sind die Kollagen-induzierte Aggregation, Phosphorylierung von p27 und die Aktivierung der MAPKinasen gehemmt (Abb.15, Abb.23, Tab.6). Die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 in Kollagen-stimulierten Thrombozyten ist auch durch den Inhibitor der Cyclooxygenase Indometacin hemmbar (Roger et al., 2004). Im Gegensatz dazu ist bei Aktivierung mit Thrombin trotz Ausschaltung der Thromboxan A₂-Signale die Aggregation und die p27-Tyrosinphosphorylierung nicht betroffen (Abb.15, Abb.23, Tab.6). Für die Thrombin-abhängige Aktivierung von p38 ist Thromboxan A₂ ein wichtiger Mediator (Tab.6; Begonja et al., 2007). Des Weiteren konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass SQ29548 die Kollagen-induzierte Aggregation von humanen Thrombozyten hemmt (Ogletree et al., 1985), während durch Vorbehandlung mit einem anderen TxA₂-Rezeptor-Antagonist BM13505 die Aggregation von Thrombin-stimulierten humanen Thrombozyten nicht gehemmt wird (Klimm et al., 1993). Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass α -Toxin auch in humanen Thrombozyten zur TxA₂-Synthese führt und diese eine der Voraussetzungen für die α -Toxin-induzierte Aggregation darstellt.

6.5.2. Einfluss von ADP

Neben Thromboxan A₂ wird auch ADP aus den dichten Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzt. Das freigesetzte ADP bewirkt über Bindung und Aktivierung des Gi-gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors gemeinsam mit primären Stimuli wie Thrombin oder Kollagen die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 und die Aggregation von Thrombozyten (Fälker et al., 2004; Roger et al., 2004). Außerdem ist ADP ein wichtiger Mediator der Aktivierung der MAPKinasen p38 durch Thrombin (Begonja et al., 2007). Die Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors mit dem Rezeptorantagonisten Cangrelor hat keinen Einfluss auf die Aggregation und das Proteintyrosinphosphorylierungsmuster hervorgerufen durch α -Toxin (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis führte uns zu der Frage, ob die Zugabe von externem ADP zu einer Verstärkung der Thrombozytenantwort auf α -Toxin führt. Die Kombination von α -Toxin mit zusätzlichem ADP führt weder zu einer Steigerung der Aggregation noch zu einer Verstärkung der p27-Tyrosinphosphorylierung (Abb.16, Abb.27), während die Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 fast vollständig unterbleibt (Abb.21).

6.5.3. Einfluss von Adrenalin

Über den Gz-gekoppelten α 2A-Adrenozeptor wirkt auch Adrenalin auf Thrombozyten, wobei Adrenalin alleine keine Aggregation oder Aktivierung bewirkt (Lanza et al., 1988). Ebenso wie für ADP konnte in der vorliegenden Arbeit kein Synergismus von Adrenalin und α -Toxin für die Tyrosinphosphorylierung von p27 und die Aggregation gezeigt werden (Abb.16, Abb.27). Obwohl eine synergistische Wirkung von Adrenalin mit der Kalziumionophore Calcimycin, mit Thrombin, mit ADP und mit Kollagen für die Aggregation beschrieben wurde (Butt et al., 2005; Lanza et al., 1988; Steen et al., 1988). Darüber hinaus konnten Shah et al. (1997) nachweisen, dass Dopamin die Calcimycin-induzierte Aggregation verstärkt.

Durch Kombination von Adrenalin mit Thrombin wird die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 verstärkt (Fälker et al., 2004). Eine verstärkte Aktivierung der stressaktivierten Kinasen p38 und JNK1/2 nach Stimulation von α -Toxin und Adrenalin konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb.21).

Obwohl ADP und Adrenalin unter den von uns gewählten Bedingungen keine synergistische Wirkung mit α -Toxin zeigen, kann ein Synergismus, ähnlich wie in der Literatur beschrieben, in vivo dennoch auftreten, da unsere Messungen nur eine Momentaufnahme (maximale Messdauer 10min) darstellen und es mit einer längeren Einwirkzeit der Agonisten im Blut doch zu einer synergistischen Wirkung kommen kann.

6.5.4. Beeinflussung der Wirkung von PP2 und SQ29548 durch ADP und Adrenalin

TxA₂- und Src-abhängige Signalwege sind an der α -Toxin-induzierten Tyrosinphosphorylierung, Aktivierung der MAPKinasen und Aggregation beteiligt. Um die Bedeutung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für die α -Toxin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten besser zu verstehen, wurde der Einfluss von ADP und Adrenalin auf die Hemmung der TxA₂- und Src-abhängige Signalwege untersucht.

Die hemmenden Effekte des Antagonisten SQ29548 auf Phosphorylierung von p27 können bei gleichzeitiger Stimulation mit α -Toxin und Adrenalin bzw. α -Toxin und ADP aufgehoben werden (Abb.27). Im Gegensatz dazu kann die Hemmung der Aggregation und der MAPKinasen nicht überwunden werden (Abb.16, Abb.21).

Bei gleichzeitiger Hemmung der TxA₂- und Src-abhängigen Signalwege wird durch die Costimulation mit α -Toxin und Adrenalin bzw. α -Toxin und ADP keine Änderung der p27-Tyrosinphosphorylierung, der Aggregation und der Aktivierung der MAPKinasen beobachtet (Abb. 16, Abb.21, Abb.27).

Mit Blick auf den inhibitorischen Effekt von PP2 können die α -Toxin-induzierte p27-Tyrosinphosphorylierung durch die gleichzeitige Stimulation mit Adrenalin und ADP nicht wiederhergestellt werden (Abb.27). Diese Beobachtungen wurden auch mit Thrombin gemacht (Abb.26), während die Kollagen-induzierte p27-Tyrosinphosphorylierung durch die gleichzeitige Stimulation mit Adrenalin oder ADP überwunden werden kann (Abb.25).

Der Einfluss von PP2 auf die α -Toxin-induzierte Aggregation kann durch zeitgleiche Stimulation mit Adrenalin und ADP aufgehoben werden (Abb.16), während der Einfluss auf die MAPKinasen nur teilweise widerherstellbar ist (Abb.21).

Nash et al. (2010) beobachteten, dass Dasatinib oder PD0173952, ein anderer Inhibitor von Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen, im plättchenreichen Plasma die Adrenalin-induzierte Aggregation hemmt. Darüber hinaus sind bisher keine weiteren bekannten Studien zu costimulatorischen Effekten von ADP bzw. Adrenalin mit Agonisten bezüglich den Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen oder zum TxA₂-Rezeptor durchgeführt wurden, so dass ein Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich war.

6.6. Zusammenfassung, Schlussfolgerung, Ausblick

Mit der vorliegenden Studie konnten wir Einblicke in die Mechanismen der α -Toxin-induzierten Aktivierung, Aggregation und Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen, sowie wichtiger beteiligter Signalmoleküle der Thrombozyten gewinnen.

Staphylococcus aureus α -Toxin induziert in einem Konzentrationsbereich von 0,18-3 μ g/ml die Aggregation von humanen Thrombozyten und die von Mäusethrombozyten in einem Konzentrationsbereich von 2-20 μ g/ml.

Durch Untersuchung von ADAM10-depletierten Mäusethrombozyten konnte erstmalig für Thrombozyten gezeigt werden, dass für die Bindung von α -Toxin und die resultierende Porenbildung ADAM10 (membrangebundene Disintegrin-and-Metalloprotease 10) Voraussetzung ist (Abb.28).

Die Untersuchung von intrazellulären Ereignissen ergab, dass α -Toxin die Phosphorylierung an Tyrosinresten einer Reihe von Proteinen stimuliert. Dazu gehören die stressinduzierten MAPKinasen p38 und JNK1/2, die Tyrosinkinase Src und ein Protein mit einer apparenten Molmasse von 27kDa, das als Apolipoprotein A1 identifiziert werden konnte.

Die Untersuchung von SFK-abhängigen Signalwegen nach Stimulation mit α -Toxin anhand verschiedener SFK-Inhibitoren (PP1, PP2, SU6656, Dasatinib) zeigte, dass die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen die α -Toxin-induzierte Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2

upstream modifizieren (Abb.28). Mitglieder der Familie der Src-Kinasen sind auch an der Regulation der Aggregation beteiligt.

Der Tyrosinphosphorylierung folgt eine rasche und nahezu vollständige Dephosphorylierung fast aller Proteine. Die Dephosphorylierung kann durch Phosphataseinhibitoren wie Okadasäure und Natriumorthovanadat, die verschiedene Proteintyrosin- und Serin/Threoninphosphatasen hemmen, verzögert werden. Interessanterweise hemmt der Calcineurin-Inhibitor Ciclosporin A die Tyrosinphosphorylierung. Die Wirkungen der Phosphataseinhibitoren auf Phosphorylierung und Dephosphorylierung korrelieren unterschiedlich mit dem Aggregationsverlauf.

Untersuchungen mit dem TxA_2 -Rezeptorantagonisten belegen, dass der Thromboxan A_2 -Rezeptor bei der α -Toxin-induzierten Aggregation und Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 bedeutenden Einfluss hat.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass α -Toxin humane Thrombozyten aktiviert und durch den primären Kalziumeinstrom Signalwege aktiviert werden, die den durch physiologische Agonisten aktivierten Signalwegen ähnlich sind, und durch Inhibitoren und Antagonisten modifizierbar sind. Dem SFK-Inhibitor Dasatinib kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da er als Zytostatikum bereits zur Therapie am Menschen zugelassen ist.

Da die membrangebundene Disintegrin-and-Metalloprotease 10 (ADAM10) in ihrer Funktion als Sheddase durch Inhibitoren gehemmt werden kann, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden, ob dadurch auch die Wirkung von α -Toxin beeinflusst werden kann.

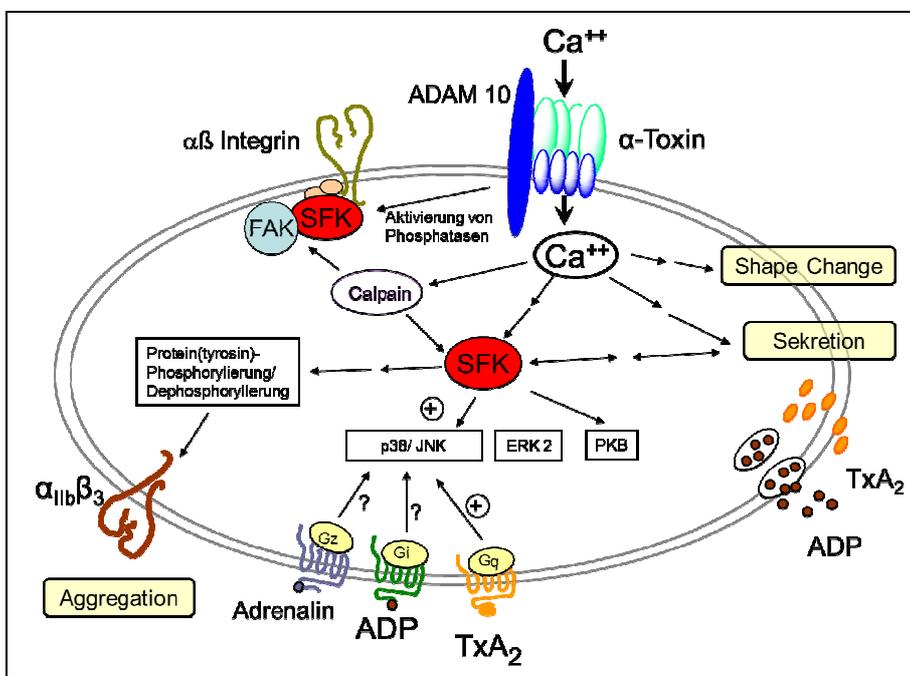


Abbildung 28: Schema zur α -Toxin-abhängigen Aktivierung von humanen Thrombozyten

Die Aktivierung von Thrombozyten mit α -Toxin führt zum Kalziumeinstrom und über weitere Signale zur Sekretion von beispielsweise ADP aus dichten Granula. Über die Aktivierung von Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen (SFK) wird die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten induziert und Serin/Threoninkinasen werden aktiviert, was letztendlich zur Aggregation führt.

7... Literaturverzeichnis

Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, Rosa JP, Bryckaert M (2010) Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood* 115:4083-4092.

Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M (2008) Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 6:2007-2016.

Arita H, Nakano T, Hanasaki K (1989) Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res* 28:273-301.

Ariyoshi H, Oda A, Salzman EW (1995) Participation of calpain in protein-tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in human blood platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15:511-514.

Artcanuthurry V, Grelac F, Maclouf J, Martin-Cramer E, Levy-Toledano S (1996) Serine/threonine dephosphorylation may be involved in tyrosine phosphorylation: a new mode of signal transduction in platelets. *Semin Thromb Hemost* 22:317-326.

Barry FA, Gibbins JM (2002) Protein kinase b is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* 277:12874-12878.

Begonja AJ, Geiger J, Rukoyatkina N, Rauchfuss S, Gannaryan S, Walter U (2007) Thrombin stimulation of p38MAPkinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxanen A₂ and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Blood* 109:616-618.

Berube BJ, Bubeck Wardenburg J (2013) Staphylococcus aureus α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins* 5:1140-1166.

Bhakdi S, Muhly M, Korom S, Hugo F (1989) Release of interleukin-1 β associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect Immun* 57:3512-3519.

Bhakdi S, Trantum-Jensen J (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 55:733-751.

Bhakdi S, Walev I, Husmann M and Valeva A: Staphylococcal alpha-toxin. In: Schmitt MJ, Schaffrath R (ed): *Microbial Protein Toxins*. Springer, Berlin - Heidelberg, 2005, pp. 91-110.

Bin L, Kim BE, Brauweiler A, Goleva E, Streib J, Ji Y, Schlievert PM, Leung DY (2012) Staphylococcus aureus α -toxin modulates skin host response to viral infection. *J Allergy Clin Immunol* 130:683-691.

Biolan C, Takai A (1988) Inhibitory effects of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem J* 256:283-290.

Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ (2000) Selected glimpses into activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19:5620-5636.

Blake RA, Broome MA, Liu X, Wu J, Gishizky M, Sun L, Courtneidge SA (2000) SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 20:9018-9027.

Blume KE, Soeroes S, Keppeler H, Stevanovic S, Kretschmer D, Rautenberg M, Wesselborg S, Lauber K (2012) Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal. *J Immunol* 188:135-145.

Born GV, Cross MJ (1963) The Aggregation of Blood Platelets. *J. Physiol* 168:178-195

- Brass LF** (2003) Thrombin and platelet activation. *Chest* 124:15S-18S.
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Levy-Teledano S, Rosa JP, Bryckaert M** (1999) Regulation of c-Jun NH₂-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 94:3800-3805.
- Burke TR, Zhang ZY** (1998) Proteine-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers (Peptide Science)* 47:225-241.
- Buschbeck M, Ghomashchi F, Gelb MH, Watson SP, Börsch-Haubold AG** (1999) Stress stimuli increase calcium-induced arachidonic acid release through phosphorylation of cytosolic phospholipaseA₂. *Biochem J* 334:359-366.
- Butt IF, Saeed SA, Wagar SN, Aslam M** (2005) Synergistic interaction of epinephrine and calcium ionophore in platelet aggregation. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 17:1-5.
- Canobbio I, Reineri S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M** (2004) A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 91:102-110.
- Chen YR, Wang W, Kong AN, Tan TH** (1998) Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. *J Biol Chem* 273:1769-1775.
- Chiang TM** (1993) The role of protein phosphatase 1 and 2A in collagen-platelet interaction. *Arch Biochem Biophys* 303:56-63.
- Cho MJ, Pestina TI, Steward SA, Lowell CA, Jackson CW, Gartner TK** (2002) Role of the Src family kinase Lyn in TxA₂ production, adenosine diphosphate secretion, Akt phosphorylation, and irreversible aggregation in platelets stimulated with gamma-thrombin. *Blood* 99:2442-2447.
- Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, DiLuca M** (2002) [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med* 8:67-74.
- Connor JD, Rasheed H, Gilani AH, Cheema M, Rizvi Z, Saeed SA** (2001) Second messengers in platelet aggregation evoked by serotonin and A23187, a calcium ionophore. *Life Sciences* 69:2759-2764
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T** (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science*. 231:1431-1434.
- Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie B, Furie BC, Herman IM, Potter DA** (1999) Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J Biol Chem* 1999 274:36321-36327.
- Dangelmaier C, Manne BK, Liverani E, Bray P, Kunapuli SP** (2013) PDK1 selectively phosphorylates Thr(308) on Akt and contributes to human platelet functional responses. *Thromb Haemost* 111:4.
- Edmead CE, Crosby DA, Southcott M, Poole AW** (1999) Thrombin-induced association of SHP-2 with multiple tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets. *FEBS Lett* 459:27-32.
- Eichhorn PJA; Creighton MP, Wilhelsen K, van Dam H, Bernardis R** (2007) A RNA interference screen identifies the protein phosphatase 2A subunit PR55 γ as a stress-sensitive inhibitor of c-Src. *PLoS Genetics* 3:e218.
- Elce JS, Sigmund L, Fox MJ** (1989) Calpain I activation is not correlated with aggregation in human platelets. *Biochem J* 261:1039-1042.

- 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. *Thromb Haemost* 92:114-123.
- Fälker K, Lange D, Presek P** (2005) P2Y₁₂ ADP receptor-dependent tyrosine phosphorylation of proteins of 27 and 31kDa in thrombin-stimulated human platelets. *Thromb Haemost* 93:880-888.
- Ferrell JE, Jr., Martin GS** (1988) Platelet tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by thrombin. *Mol Cell Biol* 8:3603-3610.
- Ferrell JE, Jr., Martin GS** (1989) Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2234-2238.
- Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D** (2006) The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature* 4:445-457.
- Fong KP, Barry C, Tran AN, Traxler EA, Wannemacher KM, Tang HY, Speicher KD, Blair IA, Speicher DW, Grosser T, Brass LF** (2011) Deciphering the human platelet sheddome. *Blood* 117:15-26.
- Garcia A, Quinton TM, Dorsam RT, Kunspuli SP** (2005) Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A₂ generation are essential for VWF/GPIIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood* 106:3410-3414.
- Gaterman S: Staphylokokken. In Suerbaum S, Hahn H, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie und Infektologie. Springer, Berlin - Heidelberg, 2012, S. 187-197.**
- Geest CR, Coffey PJ** (2009) MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 86:237-250.
- George JN, Saucerman S, Levine SP, Knieriem LK, Bainton DF** (1985) Immunoglobulin G is a platelet alpha granule-secreted protein. *J Clin Invest* 76:2020-5.
- Golden A, Nemeth SP, Brugge JS** (1986) Blood platelets express high levels of the pp60^{c-Src}-specific tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:852-856.
- Gouaux E** (1998) Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol* 121:110-122.
- Grace AA, Barradas MA, Mikhailidis DP, Jeremy JY, Moorhead JF, Sweny P, Dandona P** (1987) Cyclosporine A enhances platelet aggregation. *Kidney Int* 32:889-895.
- Gratacap MP, Martin V, Valera MC, Allart S, Garcia C, Sie P, Recher C, Payrastre B** (2009) The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelets activation in vitro and in vivo. *Blood* 114:1884-1892.
- Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C** (1991) A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 66:734-736.
- Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Pötzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W** (1997) Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins escherichia coli hemolysin and staphylococcal α -toxin. *J Immunol* 159:1909-16.
- Guo YL, Baysal K, Kang B, Yang LJ, Williamson JR** (1998) Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem*. 273:4027-4034.

- Habib A, FitzGerald G A, Maclouf J** (1999) Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem* 274:2645-2651.
- Haller H, Spies K, Lindschau C, Quass P, Distler A** (1994) The effect of cyclosporine on calcium, protein kinase C, and sodium-proton exchange in platelets. *Transplantation* 57:1516-1520.
- Harrison P, Savidge GF, Cramer EM** (1990) The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br J Haematol* 74:125-130.
- Haslam RJ, Lynham JA, Fox JE** (1979) Effects of collagen, ionophore A23187 and prostaglandin E1 on the phosphorylation of specific proteins in blood platelets. *Biochem J* 178:397-406.
- Hechler B; Gachet C** (2011) P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal* 7:293-303.
- Higashihara M, Takahata K, Kurokawa K, Ikebe M** (1992) The inhibitory effects of okadaic acid on platelet function. *FEBS Lett* 307:206-210.
- Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S** (1996) Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 97:949-956.
- Hofmann S, Vögtle T, Bender M, Rose-John S, Nieswandt B** (2012) The SLAM family member CD84 is regulated by ADAM10 and calpain in platelets. *J Thromb Haemost.* 10:2581-2592.
- Horvath AR, Muszbek L, Kellie S** (1992) Translocation of pp60^{c-src} to the cytoskeleton during platelet aggregation. *EMBO J* 11:855-861.
- Hughan SC, Hughes CE, McCarty OJ, Schweighoffer E, Soultanova I, Ware J, Tybulewicz VL, Watson SP** (2007) GPVI potentiation of platelet activation by thrombin and adhesion molecules independent of Src kinases and Syk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:422-429.
- Husmann M, Dersch K, Bobkiewicz W, Beckmann E, Veerachato G, Bhakdi S** (2006) Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S.aureus* or streptolysin O. *Biochem Biophys Res Commun* 344:1128-1134.
- Inazu T, Taniguchi T, Yanagi S, Yamamura H** (1990) Protein-tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun* 170:259-263.
- Irtegun S, Wood RJ, Ormsby AR, Mulhern TD, Hatters DM** (2013) Tyrosine 416 is phosphorylated in the closed, repressed conformation of c-Src. *PLoS One* 8:e71035.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P** (1996) Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost* 76:640-650.
- John JF**: Staphylococcal Infection: Emerging Clinical Syndromes. In: Ala'Aldeen D, Hiramatsu K (ed): *Staphylococcus aureus. Molecular and Clinical Aspects*. Horwood Publishing, Chichester, 2009, pp. 1-18.
- Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B** (2004) Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 36:25S-32S.
- Kawakami H, Higashihara M, Song XH, Kurokawa K, Ikebe M, Hirano H** (1994) Okadaic acid induces marked shape change of human platelets. *J Smooth Muscle Res* 30:57-64.
- Klimm JL, Kloczewiak MA, Lindon J** (1993) Effects of free and macromolecular-bound TxA₂ receptor antagonist BM13505 on U46619-induced platelet aggregation. *Prostaglandins* 46:27-36.

- Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S, Husmann M** (2009) Pore-forming toxins activate MAPK p38 causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Commun* 385:503-506.
- Kneidl J, Löffler B, Erat MC, Kalinka J, Peters G, Roth J, Barczyk K** (2012) Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cell Microbiol* 14:914-936.
- Kook SH, Choi KC, Son YO, Lee KY, Hwang IH, Lee HJ, Chung WT, Lee CB, Park JS, Lee JC** (2008) Involvement of p38 MAPK-mediated signaling in the calpeptin-mediated suppression of myogenic differentiation and fusion in C2C12 cells. *Mol Cell Biochem* 310:85-92.
- Kramer RM, Roberts EF, Hyslop PA, Utterback BG, Hui KY, Jakubowski JA** (1995) Differential activation of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in human platelets. Evidence for activation of cPLA2 independent of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *J Biol Chem* 270:14816-14823.
- Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JWN** (2000) Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem* 275:27790-27798.
- Kuchay SM, Chishti AH** (2007) Calpain-mediated regulation of platelet signaling pathways. *Curr Opin Hematol* 14:249-254.
- Kuskot A, Adam F, Mazharian A, Ajzenberg N, Berrou E, Bonnefoy A, Rosa JP, Hoylaerts MF, Bryckaert M** (2007) Involvement of the Mitogen-activated protein kinase c-Jun NH₂-terminal kinase 1 in thrombus formation. *J Biol Chem*. 282:31990-31999.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laing GD, Compton SJ, Ramachandran R, Fuller GL, Wilkinson MC, Wagstaff SC, Watson SP, Kamiguti AS, Theakston RD, Senis YA** (2005) Characterization of a novel protein from *Proaetheris superciliaris* venom: proatherocytin, a 34-kDa platelet receptor PAR1 agonist. *Toxicon* 46:490-499.
- Lanza F, Beretz A, Stierle A, Hanau D, Kubina K, Cazenave JP** (1988) Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol* 255: H1276-H1288.
- Liebenhoff U, Brockmeier D, Presek P** (1993) Substrate affinity of the protein tyrosine kinases pp60^{c-src} is increased on thrombin stimulation of human platelets. *Biochem J* 295:41-48.
- Lizama C, Lagos CF, Lagos-Cabr e R, Cantuarias L, Rivera F, Huenchunir P, P rez-Acle T, Carrion F, Moreno RD** (2009) Calpain inhibitors prevent p38 MAPK activation and germ cell apoptosis after heat stress in pubertal rat testes. *J Cell Physiol* 221:296-305.
- Lowy FD** (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532.
- L thje J** (1990) Extrazellul re Adenin-Nukleotide im Blut. *Dt  rztebl* 87:A-927-A-932.
- Manohar M, Maheswaran SK, Frommes SP, Lindorfer RK** (1967) Platelet damaging factor, a fifth activity of staphylococcal alpha-toxin. *J Bacteriol* 94:224-231.
- 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. *J Biol Chem* 282:5478-5487.
- Minuz P, Fumagalli L, Gaino S, Tommasoli RM, Degan M, Cavallini C, Lecchi A, Cattaneo M, Lechi Santonastaso C, Berton G** (2006) Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation signals

downstream of G-protein-coupled receptors for thromboxane A₂ in human platelets. *Biochem J* 400:127-134.

Mirlashari MR, Rynningen A, Mikkelsen HM, Fukami MH (1996) Differential secretion of blood platelet storage granules. *Platelets* 7:313-320.

Moore SF, Hunter RW, Hers I (2011) mTORC2 örotein-mediated protein kinase B (Akt) serine 473 phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets. *J Biol Chem* 286:24553-24560.

Morganti RP, Marcondes S, Baldasso PA, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E (2008) Inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin type B on human platelet adhesion in vitro. *Platelets* 19:432-439.

Murata K, Sakon M, Kambayashi J, Yukawa M, Yano Y, Fujitani K, Kawasaki T, Shiba E, Mori T (1993) The possible involvement of protein phosphatase 1 in thrombin-induced Ca²⁺ influx of human platelets. *J Cell Biochem* 51:442-445.

Nadal-Wollbold F, Pawlowski M, Lévy-Toledano S, Berrou E, Rosa JP, Bryckaert M (2002) Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Lett* 531:475-482.

Naik UP, Markell M, Ehrlich YH, Kornecki E (1993) Cyclosporine A enhances agonist-induced aggregation of human platelets by stimulating protein phosphorylation. *Cell Mol Biol Res* 39:257-264.

Nakahashi TK, Kambayashi J, Nakamura T, Le SN, Yoshitake M, Tandon NN, Sun B (2001) Platelets in nonresponders to epinephrine stimulation showed reduced response to ADP. *Thromb Res* 104:127-135.

Nash CA, Severin S, Dawood BB, Makris M, Mumford A, Wilde J, Senis YA, Watson SP (2010) Src family kinases are essential for primary aggregation by G(i)-coupled receptors. *J Thromb Haemost* 8:2273-2282.

Negrescu EV, Siess W (1996) Dissociation of the α IIb β 3-interin by EGTA stimulates the tyrosine kinase pp72(syk) without inducing activation. *J Biol Chem* 271:26547-26553.

O'Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Du X (2011) An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood* 118:4215-4223.

Oda A, Drucker BJ, Ariyoshi H, Smith M, Salzman EW (1993) pp60c-src is an endogenous substrat for calpain in human blood platelets. *J Biol Chem* 268:12603-12608.

Offermanns S, Laugwitz K L, Spicher K, Schultz G (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A₂ and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:504-508.

Ogletree ML, Harris DN, Greenberg R, Haslanger MF, Nakane M (1985) Pharmacological actions of SQ29548, a novel selctive thromboxanen antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 234:435-441.

Østerud B (2003) The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Dis Mon* 49:7-13.

Pain S, Monstero-Lastres A, Falet H, Brohard-Bohn B, Fraiz N, Bachelot-Loza C, Cano E, Rendu F (1999) Calpain controls the balance between protein tyrosine phosohatase activities during platelet activation. *FEBS Lett* 453:119-123.

Papkoff J, Chen R, Blenis J, Forsman J. (1994) p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol* 14:463-472.

- Patel AH, Nowlan P, Weavers ED, Foster T** (1987) Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect Immun* 55:3103-3110.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW** (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42 mitogen-activated protein kinase (MAPkinase). *EMBO J* 10:885-892.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22:153-183.
- Popova TG, Millis B, Bradburne C, Nazarenko S, Bailey C, Chandhoke V, Popov SG** (2006) Acceleration of epithelial cell syndecan-I shedding by anthrax hemolytic virulence factors. *BMC Microbiol* 6:8.
- Presek P, Martinson EA**: Platelet Protein Tyrosine Kinases. In: v. Bruchhausen F, Walter U (ed): *Platelets and Their Factors. Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer, Berlin-Heidelberg, 1997, pp. 263-296.
- Pumiglia KM, Lau LF, Huang CK, Burroughs S, Feinstein MB** (1992) Activation of signal transduction in platelets by the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hydroperoxide). *Biochem J* 286:441-449.
- Rasheed H, Saeed SA** (2004) Involvement of thromboxane A₂ and tyrosine kinase in the synergistic interaction of platelet activating factor and calcium ionophore A23187 in human platelet aggregation. *Exp Mol Med* 36:220-225.
- Reed GL**: Platelet Secretion. In: Michelson AD (ed): *Platelets.* Elsevier, Amsterdam-Boston-Heidelberg, 2007, pp. 309-318.
- Reuter C, Findik D, Presek P** (1990) Characterization of purified pp60^{c-src} protein tyrosine kinase from human platelets. *Eur J Biochem* 190:343-350.
- Roger S, Pawlowski M, Habib A, Jandrot-Perrus M, Rosa JP, Bryckaert M** (2004) Costimulation of the Gi-coupled ADP receptor and the Gq-coupled TxA₂ receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation. *FEBS Lett* 556:227-235.
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW** (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6940-6943.
- Ruf A, Patscheke H.**: Thrombozytenfunktion. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie.* Karger, Basel, 2007, S. 446-456.
- Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, Sarsfield S, Lee JC, Morton LF, Barnes MJ, Farndale RW** (1996) Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem.* 271:6586-6589.
- Samuelsson B** (1978) Prostaglandins and thromboxanes. *Recent Prog Horm Res.* 34:239-258.
- Schmitz G, Rothe G; Ruf A, Barlage S, Tscope D, Clementson KJ, Goodall AH, Michelson AD; Nurden AT, Shankey TV** (1998) European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 79:885-896.
- Schönwalder SM, Yuan Y, Jackson SP** (2000) Calpain regulation of integrin α IIb β 3 signaling in human platelets. *Platelets* 11:189-198.

Schubert S, Schwertz H, Weyrich AS, Franks ZG, Lindemann S, Otto M, Behr H, Loppnow H, Schlitt A, Russ M, Presek P, Werdan K, Buerke M (2011) Staphylococcus aureus α -toxin triggers the synthesis of B-cell lymphoma 3 by human platelets. *Toxins* 3:120-133.

Shah BH, Saeed SA, Rashid F, Gilani AH (1997) Dopamine potentiation of calcium ionophore A-23187-induced platelet aggregation. *Adv Exp Med Biol* 407:537-540.

Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F (2000) Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 101:78-85.

Siegel I, Cohen, S (1964) Action of Staphylococcal toxin on human platelets. *J Infect Dis* 114:488-502.

Siljander P, Farndale RW, Feijge MA, Comfurius P, Kos S, Bevers EM, Heemskerk JW (2001) Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response: Involvement of p38 MAP kinase and calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:618-627.

Song S, Freedman J, Mody M, Lazarus AH (2000) Porcine von Willebrand factor and thrombin induced the activation of c-Jun amino-terminal kinase (JNK/SAPK) whereas only thrombin induces the activation of extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) in human platelets. *Br J Haematol* 109:851-856.

Stassen M, Müller C, Richter C, Neudörfl C, Hültner L, Bhakdi S, Walev I, Schmitt E (2003) The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect Immun* 71:6171-6177.

Steen VM, Tysnes OB, Holmsen H (1988) Synergism between thrombin and adrenaline (epinephrine) in human platelets. *Biochem J* 253:581-586.

Stenberg PE, Pestina TI, Barrie RJ, Jackson CW (1997) The Src family kinases Frg, Fyn, Lck and Lyn, colocalize with coated membranes in platelets. *Blood* 89:2384-2393.

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshüsemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bähr M, Michel U, Nau R (2002) Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11:355-368.

Su LT, Chen HC, González-Pagán O, Overton JD, Xie J, Yue L, Runnels LW (2010) TRPM7 activates m-calpain by stress-dependent stimulation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase. *J Mol Biol* 396:858-869.

Summy JM, Trevino JG, Baker CH, Gallick GE (2005) c-Src regulates constitutive and EGF-mediated VEGF expression in pancreatic tumor cells through activation of phosphatidylinositol-3 kinase and p38 MAPK. *Pancreas* 31:263-274.

Sundaresan P, Farndale RW (2002) p38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett* 528:139-144.

Takayama H, Nakamura T, Yanagi S, Taniguchi T, Nakamura S, Yamamura H (1991) Ionophore A23187-induced protein-tyrosine phosphorylation of human platelets: possible synergism between Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 174:922-927.

- Tatosyan AG, Mizenina OA** (2000) Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry* 65:49-58.
- Thomas D W, Mannon R B, Mannon P J, Latour A, Oliver J A, Hoffman M, Smithies O, Koller B H, Coffman T M** (1998) Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin Invest* 102:1994-2001.
- Tokiwa G, Dikic I, Lev S, Schlessinger J** (1996) Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science* 5276:792-794.
- Tran U, Boyle T, Shupp JW, Hammamieh R, Jett M** (2006) Staphylococcal enterotoxin B initiates protein kinase C translocation and eicosanoid metabolism while inhibiting thrombin-induced aggregation in human platelets. *Mol Cell Biochem* 288:171-178.
- Vandenbergh M F, Verbrugh H A** (1999) Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. *J Lab Clin Med* 133:525-534.
- Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN** (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380:75-79.
- Vostal JG, Jachson WL, Shulman NR** (1991) Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of specific platelet proteins. *J Biol Chem* 226:16911-16916.
- Vostal JG, Shulman NR** (1993) Vinculin is a major platelet protein that undergoes Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation. *Biochem J* 294:675-680.
- Walev I, Martin E, Jonas D, Mohamadzadeh M, Müller-Klieser W, Kunz L, Bhakdi S** (1993) Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect Immun* 61:4972-4979.
- Walther G, Mumby M** (1993) Protein serine/threonine phosphatases and cell transformation. *Biochim Biophys Acta* 1155:207-226.
- Wilke GA, Bubeck Wardenburg J** (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13473-13478.
- Woulfe DS** (2010) Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol* 3:81-91.
- Xie W, Herschman HR** (1995) v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* 270:27622-27628.
- Yang J, Wu J, Kowalska MA, Dalvi A, Prevost N, O'Brien PJ, Manning DR, Poncz M, Lucki I, Blendsy JA, Brass LF** (2000) Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9984-9989.

8. Tabellenanhang

Tabelle 12: Signifikanztabelle zu Abbildung 16

		0,3 µg/ml α-Toxin									
		Puffer	PP2	PP2 + Adrenalin	PP2 + ADP	SQ29548	SQ29548 + Adrenalin	SQ29548 + ADP	PP2 + SQ29548	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	PP2 + SQ29548 + ADP
0,3 µg/ml α-Toxin	Puffer										
	PP2	*** p<0,001									
	PP2 + Adrenalin	n.s. p=0,55	* p=0,04								
	PP2 + ADP	n.s. p=0,35	*** p=0,005								
	SQ29548	*** p<0,001									
	SQ29548 + Adrenalin	n.s. p=0,06				*** p=0,002					
	SQ29548 + ADP	*** p=0,004				n.s. p=0,64					
	PP2 + SQ29548	*** p<0,001	n.s. p=0,23			n.s. p=0,6					
	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	* p=0,02							n.s. p=0,11		
	PP2 + SQ29548 + ADP	*** p<0,001							n.s. p=0,35		
	Adrenalin	n.s. p=0,9		n.s. p=0,4				* p=0,02		** p=0,01	
ADP	n.s. p=0,18				n.s. p=0,12			* p=0,02		n.s. p=0,11	

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

Tabelle 13: Signifikanztabelle für p38 MAPKinase zu Abbildung 21

		Puffer	0,3 µg/ml α-Toxin									
		Puffer	Puffer	PP2	PP2 + Adrenalin	PP2 + ADP	SQ29548	SQ29548 + Adrenalin	SQ29548 + ADP	PP2 + SQ29548	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	PP2 + SQ29548 + ADP
0,3 µg/ml α-Toxin	Puffer	*** p<0,001										
	PP2	* p=0,03	*** p<0,001									
	PP2 + Adrenalin	* p=0,02	* p=0,05	* p=0,04								
	PP2 + ADP	* p=0,05	n.s. p=0,23	n.s. p=0,17								
	SQ29548	n.s. p=0,13	*** p<0,001									
	SQ29548 + Adrenalin	n.s. p=0,25	* p=0,03				n.s. p=0,28					
	SQ29548 + ADP	n.s. p=0,29	*** p<0,001				n.s. p=0,31					
	PP2 + SQ29548	n.s. p=0,17	*** p<0,001	* p=0,03			n.s. p=0,26					
	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	n.s. p=0,81	*** p<0,001							n.s. p=0,64		
	PP2 + SQ29548 + ADP	n.s. p=0,19	** p=0,007							n.s. p=0,13		
	Adrenalin	** p=0,006	n.s. p=0,15		n.s. p=0,08			n.s. p=0,62			* p=0,05	
ADP	n.s. p=0,06	*** p<0,001				n.s. p=0,07			n.s. p=0,79		n.s. p=0,14	

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

Tabelle 14: Signifikanztabelle für JNK1/2 MAPKinase zu Abbildung 21

		Puffer		0,3 µg/ml α-Toxin								
		Puffer	Puffer	PP2	PP2 + Adrenalin	PP2 + ADP	SQ29548	SQ29548 + Adrenalin	SQ29548 + ADP	PP2 + SQ29548	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	PP2 + SQ29548 + ADP
0,3 µg/ml α-Toxin	Puffer	*** p<0,001										
	PP2	** p=0,009	*** p<0,001									
	PP2 + Adrenalin	** p=0,01	* p=0,03	n.s. p=0,19								
	PP2 + ADP	* p=0,05	* p=0,05	n.s. p=0,56								
	SQ29548	n.s. p=0,08	*** p<0,001									
	SQ29548 + Adrenalin	* p=0,03	*** p<0,001				n.s. p=0,39					
	SQ29548 + ADP	n.s. p=0,09	*** p=0,001				n.s. p=0,14					
	PP2 + SQ29548	n.s. p=0,06	*** p<0,001	* p=0,04			n.s. p=0,38					
	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	n.s. p=0,19	*** p<0,001							n.s. p=0,54		
	PP2 + SQ29548 + ADP	n.s. p=0,07	* p=0,05							n.s. p=0,09		
	Adrenalin	** p=0,007	n.s. p=0,14		n.s. p=0,27			n.s. p=0,07			*** p=0,0005	
	ADP	* p=0,05	*** p<0,001			n.s. p=0,06			n.s. p=0,11			n.s. p=0,11

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

Tabelle 15: Signifikanztabelle zu Abbildung 27

		Puffer		0,3 µg/ml α-Toxin								
		Puffer	Puffer	PP2	PP2 + Adrenalin	PP2 + ADP	SQ29548	SQ29548 + Adrenalin	SQ29548 + ADP	PP2 + SQ29548	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	PP2 + SQ29548 + ADP
0,3 µg/ml α-Toxin	Puffer	*** p<0,001										
	PP2	n.s. p=0,25	*** p<0,001									
	PP2 + Adrenalin	* p=0,04	*** p<0,001	* p=0,02								
	PP2 + ADP	n.s. p=0,18	n.s. p=0,09	n.s. p=0,24								
	SQ29548	n.s. p=0,19	*** p<0,001									
	SQ29548 + Adrenalin	** p=0,01	n.s. p=0,14				* p=0,03					
	SQ29548 + ADP	n.s. p=0,11	n.s. p=0,17				n.s. p=0,09					
	PP2 + SQ29548	n.s. p=0,59	*** p<0,001	n.s. p=0,07			n.s. p=0,69					
	PP2 + SQ29548 + Adrenalin	n.s. p=0,38	*** p=0,004							n.s. p=0,65		
	PP2 + SQ29548 + ADP	n.s. p=0,39	*** p=0,003							n.s. p=0,38		
	Adrenalin											
	ADP	** p=0,02	n.s. p=0,4				n.s. p=0,23		n.s. p=0,58			*** p=0,001

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

9. Thesen

- 1.) Durch Aktivierung mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin werden in humanen Thrombozyten zeit- und konzentrationsabhängig Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert, wobei die Phosphorylierungsmuster mit denen durch Membranrezeptor-generierten vergleichbar sind. Durch Verwendung der Kalziumionophore Calcimycin (A23187) können Effekte von α -Toxin auf humane Thrombozyten imitiert werden.
- 2.) Für die Aktivierung von Thrombozyten ist die Expression der membrangebundenen Disintegrin-and-Metalloprotease 10 (ADAM10) Voraussetzung, da sie als Anker für die Bindung des Monomers an die Thrombozytenoberfläche und die resultierende Porenbildung dient.
- 3.) Alpha-Toxin induziert die Aggregation von Thrombozyten zeit- und konzentrationsabhängig. Die Aggregation kann durch unterschiedliche Inhibitoren, wie Calpeptin oder die Inhibitoren der Familie der Src-Tyrosinkinase wie PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib, gehemmt werden, was die Vermutung nahe legt, dass die Tyrosinkinase Src eine bedeutende Rolle dabei spielt.
- 4.) Die häufigste zelluläre Tyrosinkinase Src wird durch α -Toxinwirkung proteolytisch gespalten. Diese Degradation wird durch Reduktion von extrazellulärem Kalzium oder den Calpaininhibitor Calpeptin gehemmt.
- 5.) Alpha-Toxin induziert zeit- und konzentrationsabhängig die Aktivierung von Src, bestimmt über das Ausmaß der Autophosphorylierung an Tyr-416. Der α -Toxin-induzierten Autophosphorylierung folgt eine nahezu komplette Dephosphorylierung von Tyr-416 innerhalb von 10min.
- 6.) Serin/Threoninkinasen werden durch α -Toxin zeit- und konzentrationsabhängig aktiviert. Dies betrifft Proteinkinase B (Akt) als auch aus der Familie der MAPKinasen die stressinduzierten Kinasen p38 und JNK1/2, wohingegen die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) nicht aktiviert werden.
- 7.) Die zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 wird durch Hemmung der Kalzium-abhängigen Protease Calpain verzögert.

- 8.) Die Aktivierung der MAPKinasen JNK1/2 und p38 durch α -Toxin ist sensitiv gegenüber den Inhibitoren der Familie der Src-Kinasen wie PP1, PP2, SU6656 und Dasatinib. Vermutlich wird die Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 downstream der Familie der Src Kinasen reguliert.
- 9.) Die Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Natriumorthovanadat verstärken die α -Toxin-induzierte Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2, während Ciclosporin A deren Aktivierung inhibiert. Die beobachteten Effekte lassen sich nicht zwingend mit der Aggregation in Verbindung bringen.
- 10.) Unsere Daten zeigen, dass Mitglieder der Familie der Src-Kinasen an Signalwegen beteiligt sind, die für die α -Toxin-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation von zentraler Bedeutung sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Vogel
Adresse	Mölbitzer Weg 11 06188 Landsberg/ OT Hohenthurm
Geburtsdatum	geboren am 25.07.1981
Geburtsort	Halle

Schulbildung

September 1988 - Juli 1992	Grundschule in Halle
September 1992 – Juli 2000	Gymnasium in Halle Abschluss: Abitur

Freiwilliges ökologisches Jahr

September 2000 – August 2001	Unabhängiges Institut für Umweltfragen Halle
------------------------------	--

Hochschulstudium

Oktober 2001 – Oktober 2007	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 2007	Abschluss: Diplom-Biochemikerin

Berufliche Tätigkeit

März 2008 – Februar 2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
--------------------------	--

Promotion

28.04.15	Einfluss von <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin auf die Funktion und Signaltransduktion humaner Thrombozyten
----------	--

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Halle, den 02.07.2014

Katrin Vogel

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, das ich die vorliegende Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum medicarum (Dr. rer. Medic.) erstmalig einreiche. Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle, den 02.07.2014

Katrin Vogel

Danksagung

Zum Schluss möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Promotionsarbeit beigetragen haben:

Allen voran Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Presek, Leiter der Sektion klinische Pharmakologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dem ich für die fachliche Unterstützung und die konstruktive Diskussion im Verlauf der Erarbeitung der Promotionsarbeit danken möchte. Erst durch diese enge Zusammenarbeit auch innerhalb der Arbeitsgruppe war es mir möglich, dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Christine Föhrkolb, Frau Dr. med. Ursula Wolf, Frau Nadine Wäldchen, Herrn Steffen Vangerow und Herrn Daniel Ebert für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den freundschaftlichen zwischenmenschlichen Umgang. Den Mitarbeiterinnen Frau Cornelia Just und Frau Annika Jordan danke ich herzlichst für die hervorragende technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Nieswandt und Herrn Michael Popp danke ich an dieser Stelle für die Kooperation und die Unterstützung bei den Experimenten mit den knock-out-Mäusen.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die liebevolle und gleichermaßen moralische wie tatkräftige Unterstützung bedanken.