

verhindert Blutgerinnung

In den Multi-Pharmaka-Cocktails stecken raffinierte Gerinnungshemmer

von Johannes
A. Eble

Schlängengifte enthalten einen ganzen Arzneischatz voller hochwirksamer Stoffe, die binnen kurzer Zeit zu Schock, Lähmung oder unstillbaren Blutungen führen können. Forscher interessieren sich vor allem für Verbindungen, welche die Blutgerinnung hemmen, denn sie könnten pharmakologisch interessante Leitstrukturen für neue Wirkstoffe sein, die das Risiko eines Herzinfarkts, Gehirnschlags und anderer Thrombosen mindern.

Mehrere Male am Tag treten in unserem Körper kleinste Verletzungen und Blutungen auf, die durch den ausgefeilten Mechanismus der Blutstillung gestoppt werden, ohne dass wir es überhaupt merken. Offensichtlicher ist der Prozess bei Schnitt- und Schürfwunden der Haut. Hier können wir beobachten, wie sich innerhalb weniger Minuten ein weißer Blutpfropf bildet, der als Schorf die Wundheilung einleitet.

Doch manchmal läuft dieser Prozess auch fälschlicherweise ab, denn die Blutgerinnungskaskade wird bisweilen auch durch krankhafte Veränderungen der Gefäße ausgelöst. Es bildet sich ein Blutgerinnsel (Thrombus), das vom Blutstrom mitgerissen wird und ein Blutgefäß des Herzens, Gehirns oder eines anderen lebensnotwendigen Organs verstopfen kann (Em-

bolie). Dadurch wird die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des umliegenden Gewebes vermindert. Der resultierende Herzinfarkt oder Gehirnschlag ist nicht selten tödlich. Deshalb behandelt man Risikopatienten vorbeugend mit Medikamenten, welche die Bildung von Blutgerinnseln hemmen.

Wie werden Blutplättchen aktiviert?

Obwohl Blutplättchen in großen Mengen im Blut vorhanden sind, bilden sie in der Regel nur dann Gerinnsel, wenn sie durch biochemische Prozesse aktiviert werden.^{1/} Verstärkt wird dieser Prozess dadurch, dass aktivierte Plättchen in ihren Vesikeln gespeicherte Substanzen abgeben, die dann weitere Plättchen aktivieren. Auch gefäßverengende Substanzen, die den Blutfluss zur verletzten Stelle vermindern, sind darunter. Nach der Aktivierung haften die Plättchen extrem gut an Fibrin und anderen Gerüstproteinen des gefäßumgebenden Gewebes und bilden so eine erste Barrikade, die das Blut stoppt. Was löst die Aktivierung der Plättchen aus? Werden bei einer Verletzung die Endothelzellen, die das Innere der Blutgefäße auskleiden, abgetragen, kommen sie mit den darunterliegenden Matrixproteinen, zum Beispiel Kollagen und Von-Willebrand-Faktor (vWF), in Kontakt. Diese Proteine werden von Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche wahrgenommen. Eine dadurch ausgelöste biochemische Reaktionskette, bei der die intrazelluläre Kalzium-Ionenkonzentration zunimmt, führt das Plättchenintegrin, den Fibrinrezeptor auf den Blutplättchen, in seine bindungsaktive Form über.^{2/} Es bindet nun fest an das Fibrinnetzwerk. Verstärkt wird die Anhaftung der Plättchen dadurch, dass sie eine Scheibenform mit vielen Fortsätzen annehmen, die ihre Vernetzung untereinander und mit dem Fibrinnetzwerk erleichtert. ☒

Wenn das Blut ins Stocken kommt

Wenn Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin umgesetzt wird, aggregiert es zu Fibrillen, die, ähnlich den Verstrebungen einer Stahlkonstruktion, miteinander vernetzt sind.^{3/} Wie ein Klebstoff wirkt das Fibringerüst, in dem die Blutkörperchen, darunter die Blutplättchen, hängen bleiben. ☒ So bildet sich innerhalb von 5 bis 15 Minuten nach der Verletzung ein stabiler Blutpfropf.

☐ Um die Komponenten des Schlängengiftes erforschen und auf ihre pharmakologische Wirkung prüfen zu können, muss man die Giftdrüsen »melken«. Frankfurter Forscher kooperieren vor allem mit Kollegen in Südamerika, um möglichst viele unterschiedliche Gifte untersuchen zu können.



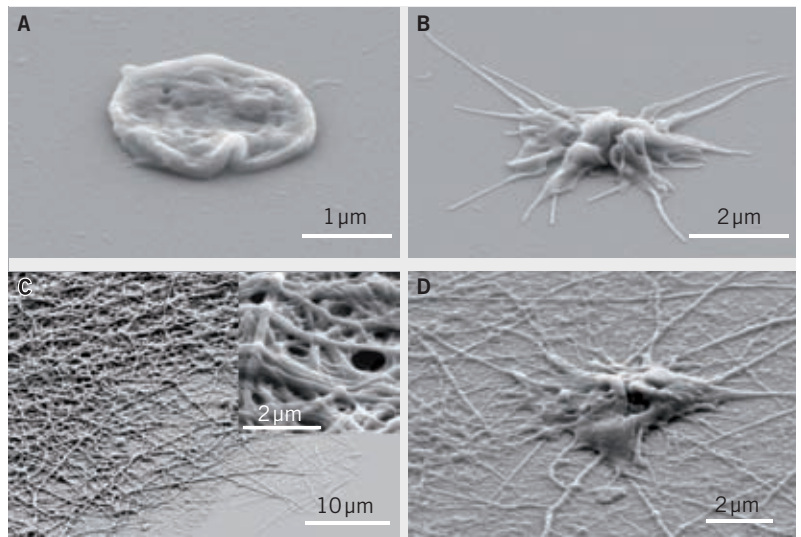
Als Katalysator für die Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin dient Thrombin. Es wird über zwei verschiedene Wege im Körper aktiviert. Thrombin und die meisten Gerinnungsfaktoren sind Proteasen. Gemeinsam wirken sie wie eine fächerförmig aufgestellte Formation umfallender Dominosteine: Das einmal ausgelöste gerinnungsauslösende Signal wird enorm verstärkt. Die lawinenartige Bereitstellung von Fibrin gewährleistet, dass nur im örtlich und zeitlich eng begrenzten Gebiet der Verletzungsstelle ein Fibrinnetzwerk entsteht. Im restlichen Blutkreislauf dagegen unterbleibt die Blutgerinnung.

Um Fehler in der Gerinnungskaskade mit fatalen Konsequenzen zu vermeiden, sind mehrere Kontrollmechanismen eingeschaltet. Zum einen können die Gerinnungsfaktoren durch Hemmstoffe in Schach gehalten oder aber durch andere Proteasen inaktivierend abgebaut werden. Als Proteasehemmstoff liegt im Blut Antithrombin vor, das an Thrombin und die Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa und XIIa bindet und ihre katalytische Aktivität blockiert. Antithrombin wird in seiner inhibierenden Wirkung durch die Bindung von Heparin deutlich verstärkt. Dagegen baut Protein C die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa ab und hemmt so eine überschießende Blutgerinnung.

Schlangengifte – Multi-Pharmaka-Cocktails mit todsicherer Wirkung

Ein Fünftel der etwa 2700 Schlangenarten zählt zu den Giftschlangen. Sie verteilen sich auf 4 der 18 Schlangenfamilien: die Giftnattern (*Elapidae*), die Nattern (*Coleubridae*), die Vipern (*Viperidae*) und die Erdvipern (*Atractaspidae*). Ihre Speicheldrüsen haben sich zu Giftdrüsen entwickelt, deren Sekret durch besonders entwickelte Zähne in die Beute injiziert wird. Auch wenn Menschen nicht zur Beute von Schlangen gehören, so beißen Schlangen auch zur ihrer Verteidigung. Jährlich werden etwa 2,5 Millionen Menschen gebissen, davon sterben über 100 000.

Schlangengifte wirken meistens auf mehrere Organsysteme. Nerven- und Muskelgifte führen zur Lähmung. Andere Giftkomponenten lösen einen schlagartigen Kreislaufkollaps des Beutetiers aus. Seine Flucht wird dadurch in Sekundenschnelle vereitelt. Weiterhin können Schlangengifte die Wände der Blutgefäße zerstören. Zusammen mit der Beeinträchtigung der Blutstillung führt dies zum Verbluten des Schlangenbissopfers. Eng verbunden damit ist auch das Versagen der Niere. Diese verschiedenen Wirkungen werden von



Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ruhenden (A) und durch Kollagen aktivierten (B) Thrombozyten, des Fibrinnetzwerkes (C) sowie eines aktivierten Thrombozyten im Fibrinnetzwerk (D).

unterschiedlichen Komponenten der Schlangengifte ausgelöst, die alle zusammen den Ausfall lebensnotwendiger Organsysteme und somit den Tod des Beutetiers bewirken.

Pharmakologisch betrachtet sind Schlangengifte Cocktails aus pharmazeutisch hochwirksamen Naturstoffen, die bereits in tropfenkleinen Volumina injiziert sehr drastische Effekte besitzen. Pharmazeutisch geht es darum, diese Einzelkomponenten zu identifizieren, zu isolieren sowie ihre Wirkungen und Nebenwirkungen zu analysieren. Danach wird die molekulare Struktur der Einzelkomponenten und der für ihre Wirkung verantwortliche Molekülteil bestimmt. Um eventuelle Nebenwirkungen, zum Beispiel immunologische Reaktionen, auszuschalten und die Pharmakokinetik und -dynamik beeinflussen zu können, versuchen wir, diese Wirkstruktur durch chemisch oder biochemisch synthetisierte Verbindungen zu imitieren.

Schlangengiftkomponenten – Blutstillungshemmer der Zukunft?

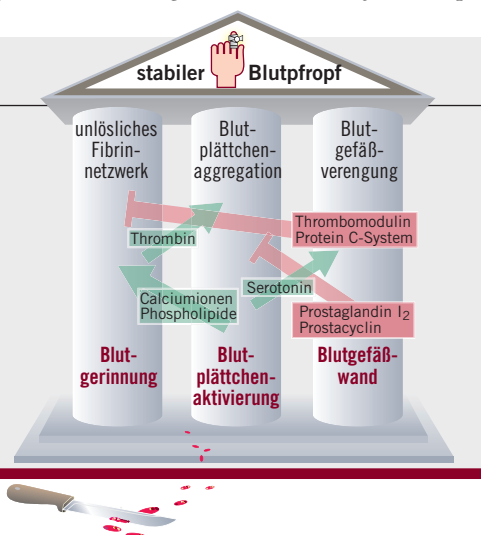
Für die Entwicklung gerinnungshemmender Pharmaka sind Schlangengifte von großem Interesse. In faszinierender Weise enthalten die Schlangengifte sehr effektive Hemmstoffe, die in einer Jahrmillionen langen Evolution »gereift« sind und jeweils spe-

Die drei Säulen der Blutgerinnung

Nach einer Verletzung laufen in zeitlicher Abfolge drei Prozesse ab:

1. Verengung der betroffenen Blutgefäße (Vasokonstriktion),
2. Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen (Thrombozyten) und
3. Gerinnung der im Blutplasma löslichen Blutgerinnungsfaktoren, die zum unlöslichen Fibrinnetzwerk führen.

Diese drei Wege sind nicht unabhängig voneinander, sondern greifen regulierend ineinander über.

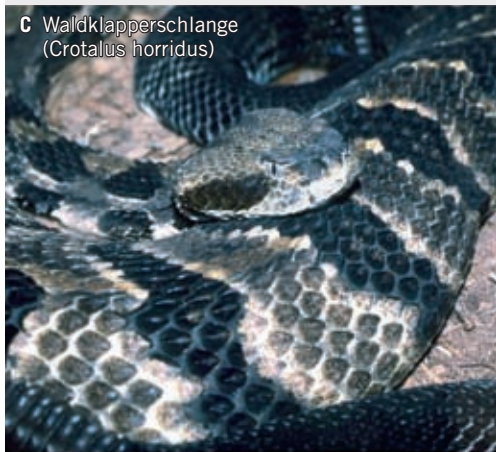




A Jararaca
(*Bothrops jararaga*)



B Gewöhnliche Lanzenetter
(*Bothrops atrox*)



C Waldklapperschlange
(*Crotalus horridus*)



D Texas-Klapperschlange
(*Crotalus atrox*)



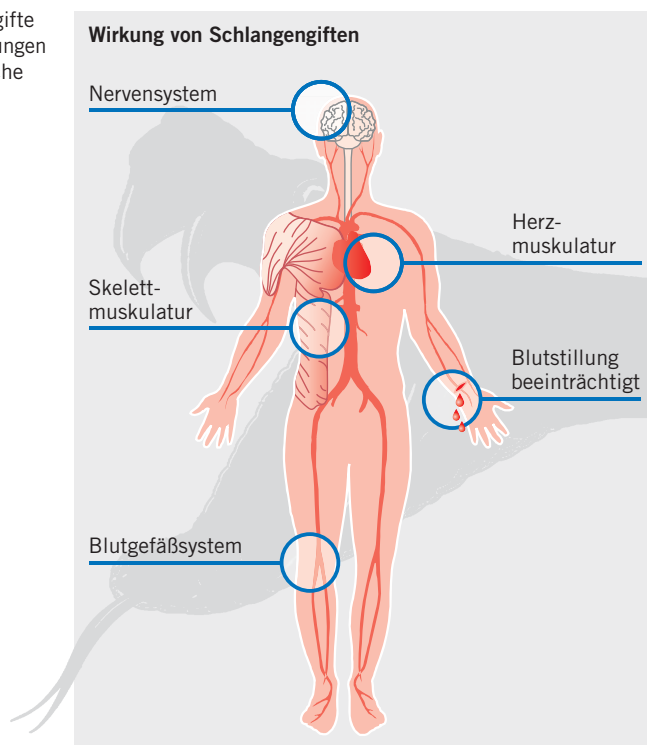
E Gewöhnliche Puffotter
(*Bitis arietans*)



F Kupferkopf (*Agkistrodon contortrix contortrix*)

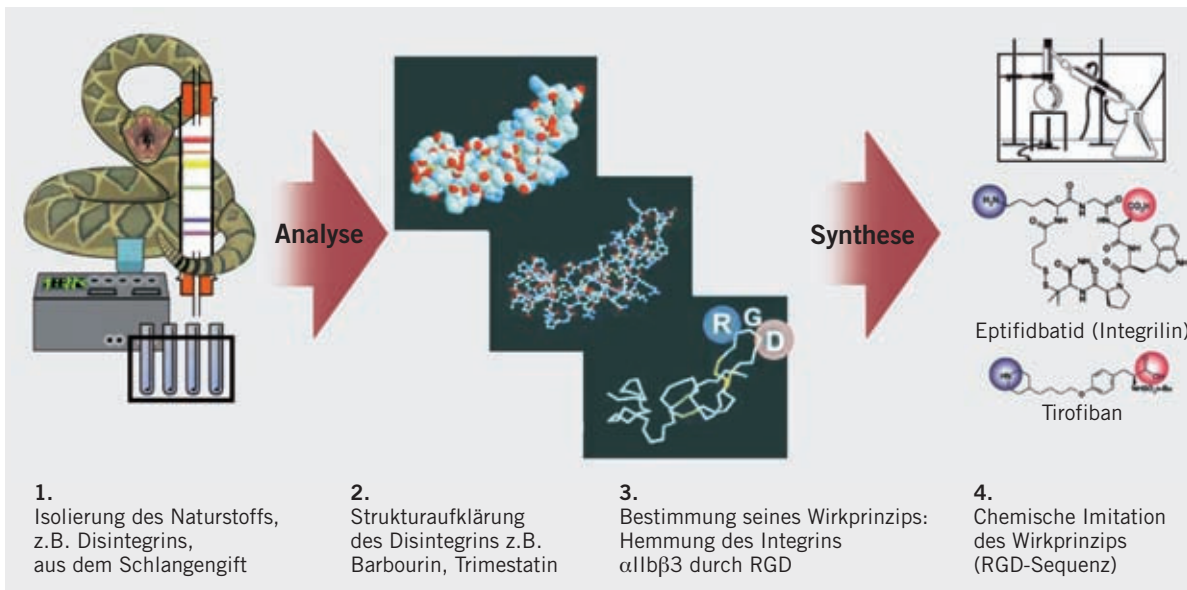
4 Verschiedene Giftschlangen: Jararaca (*Bothrops jararaga*) (A) und Gewöhnliche Lanzenetter (*Bothrops atrox*) (B) aus Südamerika, Waldklapperschlange (*Crotalus horridus*) (C) und Texas-Klapperschlange (*Crotalus atrox*) (D) aus Nordamerika, Gewöhnliche Puffotter (*Bitis arietans*) (E) aus Afrika und Kupferkopf (*Agkistrodon contortrix contortrix*) (F) aus Nordamerika.

4 Schlangengifte und ihre Wirkungen auf menschliche Organe.



zifisch gegen fast jeden Blutgerinnungsfaktor, gegen fast jeden Rezeptor der Blutplättchen und auf die essenziellen Bestandteile der Blutgefäßwand wirken.^{14/} Unter den Schlangengiftkomponenten, die auf die Blutgerinnungsfaktoren wirken, gibt es sowohl gerinnungsfördernde als auch gerinnungshemmende Wirkstoffe.^{15/} Zu den Ersteren gehören Proteasen, die die Gerinnungsfaktoren V, X und Thrombin aktivieren können oder in Thrombin-ähnlicher Weise Fibrinogen zum unlöslichen Fibrin spalten.^{16/} Dies führt zur pathologischen Bildung von Thromben und Embolien mit tödlichem Verlauf. Andererseits werden durch diese gerinnungsfördernden Komponenten auch die Blutgerinnungsfaktoren derart stark verbraucht, dass selbst im Falle eines Überlebens die Blutgerinnung über längere Zeit verhindert ist. Dieser Effekt wird als Verbrauchskoagulopathie oder als disseminierte intravasale Gerinnung bezeichnet.

Dagegen sind Antikoagulantien aus Schlangengiften für die Entwicklung pharmazeutischer Präparate von weitaus größerer Bedeutung. Dazu zählen Protein-C-aktivierende Substanzen, Blutgerinnungsfaktor-IX- und X-bindende Proteine sowie Inhibitoren von Thrombin und anderen Gerinnungsfaktoren. Protein-C-aktivierende Komponenten wurden aus den Giften der



Der Weg vom Naturprodukt über die Leitstruktur zum Pharmakon. Eine blutstillungshemmende Komponente aus dem Schlangengift, zum Beispiel ein Disintegrin, wird biochemisch isoliert und analysiert. Mithilfe des gereinigten Proteins kann die Struktur aufgeklärt werden. Durch Bestimmung der Bindungsstelle für die Zielstruktur, zum Beispiel das $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin, kann das Wirkprinzip der Schlangengiftkomponente bestimmt werden, so zum Beispiel die Proteinschleife mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD). Dieses Wirkprinzip dient als Leitstruktur, die durch chemisch synthetisierte Pharmaka imitiert wird.

Gattungen Dreieckskopftottern (*Agkistrodon*), Amerikanische Lanzenottern (*Bothrops*), Bambusottern (*Trimerus*) und Afrikanische Hornvipern (*Cerastes*) isoliert. Es handelt sich um Serinproteinasen, die Protein-C-unabhängig vom Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktivieren. Aktiviertes Protein C hemmt die Blutgerinnungskaskade durch Abbau der Gerinnungsfaktoren V und VIII. Der Protein-C-Aktivator des Kupferkopfes (*Agkistrodon contortrix contortrix*) wird als Protac® bereits in der medizinischen Diagnostik eingesetzt.¹⁷¹

Ebenfalls sehr effektive Blutgerinnungshemmer sind Bindeproteine (BP), die inhibierend mit den Gerinnungsfaktoren IX und / oder X interagieren. Solche Faktor-IX / X-Bindeproteine (FIX / X-BP) werden aus den Giften verschiedener Schlangen isoliert. Sie bestehen aus zwei fest miteinander assoziierten Untereinheiten, die eine Bindungstasche für die Gerinnungsfaktoren bilden. Der pharmazeutische Einsatz dieser Schlangengiftkomponenten beziehungsweise ihrer Mimetika gegen diese Blutgerinnungsfaktoren müsste selektiv und ohne größere Nebenwirkungen möglich sein. Thrombin ist die Zielstruktur inaktivierender Thrombin-Bindeproteine verschiedener Schlangen, zum Beispiel des Bothrojaracins aus Jararaca (*Bothrops jararaca*) und des Bothroaltermis der Halbmond-Lanzenotter (*Bothrops alternatus*).

Hilfe bei Herzinfarkt und Schlaganfall

Von sehr großer medizinischer Bedeutung für die Entwicklung von Fibrinolytika sind dagegen Fibrin(ogen)-abbauende Proteasen aus Schlangengiften.¹⁶¹ Viele der bislang isolierten Fibrinogenasen bauen das Fibrinogen beziehungsweise Fibrin zu Fragmenten ab, die kein Fibrinnetzwerk aufbauen können und sogar die Ausbildung des Maschenwerks aus thrombingespalteten Fibrinmolekülen stören. Wegen dieser Eigenschaft und ihrer Fähigkeit, fibrinhaltige Blutgerinnsel aufzulösen, dienen sie der Entwicklung von Fibrinolytika zum Einsatz bei Herzinfarkt oder Schlaganfall. So wird die

Fibrolase aus dem Kupferkopf (*Agkistrodon contortrix contortrix*) in einer leicht modifizierten Form gentechnologisch als Alfineprase hergestellt. Ihre klinische Anwendung wird derzeit erprobt. Ancrod aus dem Gift der Malaien-Mokassinotter (*Calloselasma rhodostoma*) ist in klinischer Prüfung.

Eine große Zahl von Schlangengiftkomponenten sind antagonistisch gegen Oberflächenrezeptoren von Blutplättchen gerichtet.^{111 181} Insbesondere Disintegrine, die gegen den Fibrin(ogen)-Rezeptor gerichtet sind, sind in fast jedem hämorrhagischen Schlangengift enthalten und sind sehr gut erforscht.¹⁹¹ Sie enthalten als integrinhemmendes Motiv die Peptidsequenz Arginin-

Literaturverzeichnis:

- ¹¹¹ Andrews, Robert K. & Berndt, Michael C. (2000) *Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands* Toxicon, 38, 775–791.
- ¹²¹ Casserly, I. P. & Topol, E. J. (2002) *Glyco-protein IIb/IIIa antagonists – from bench to practice* Cell. Mol. Life Sci., 59, 478–500.
- ¹³¹ Mosesson, M. W. (2005) *Fibrinogen and fibrin structure and functions* J. Thromb. Haemost., 3, 1894–1904.
- ¹⁴¹ Eble, Johannes A. (2010) *Matrix Biology meets Toxicology* Matrix Biol., in press
- ¹⁵¹ Lu, Q., Clementson, M. & Clementson, J. (2005) *Snake venoms and hemostasis* J. Thromb. Haemost., 3, 1791–1799.
- ¹⁶¹ Swenson, S. & Markland, F. S. Jr (2005) *Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes* Toxicon, 45, 1021–1039.
- ¹⁷¹ Marsh, Neville A. (2001) *Diagnostic uses of snake venom Haemostasis*, 31, 211–217.
- ¹⁸¹ Wijeyewickrema, Lakshmi C., Berndt, Michael C. & Andrews, Robert K. (2005) *Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands* Toxicon, 45, 1051–1061.
- ¹⁹¹ Calvete, Juan Jose, Juárez, Paula & Sanz, Lilia (2009) *Snake venomomics and disintegrins, Portrait and evolution of a family of snake venom antagonists*. In: Mackessy, S. P. (ed.) *Handbook of venoms and toxins of reptiles* CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. S. 333–353.
- ¹¹⁰¹ Eble, Johannes A., Niland, Stephan, Bracht, Thilo, Mormann, Michael, Peter-Katalinic, Jasna, Pohlentz, Gottfried & Stetefeld, J. (2009) *The α2b1 integrin-specific antagonist rhodocetin is a cruciform, heterotetrameric molecule* FASEB J., 23, 2917–2927.

Glycin-Aspartat (im Einbuchstabencode der Aminosäuren: RGD) in einer Proteinschleife. Sie wurden zur Ausgangsverbindung bei der Entwicklung einer neuen Generation von Antithrombotika, zum Beispiel Aggrastat® (Tirofiban) und Integrilin® (Eptifibatid).^{12/}

Während die meisten RGD-haltigen Disintegrine am Fibrinrezeptor angreifen, der nur in aktivierten Plättchen an Fibrin bindet, sind andere Giftkomponenten gegen Rezeptoren gerichtet, die an früheren Schritten der Plättchenaktivierung oder gar an deren Auslösung beteiligt sind. Beispiele für solche »frühen« Zielstruk-

turen der Plättchenaktivierung sind die Rezeptoren für vWF oder Kollagen. Bei der Suche nach Hemmstoffen gegen das kollagenbindende Integrin $\alpha 2\beta 1$ ist man mittlerweile in drei Schlangengiften fündig geworden und hat die drei Inhibitoren, EMS16, Rhodocetin und VP12, isoliert. Sie gehören alle zur Familie der C-Typ-Lektin-ähnlichen Proteine.^{10/} Von den beiden erstgenannten liegen bereits Kristallstrukturen vor. Dies lässt hoffen, ihre Hemmeigenschaft durch synthetische Inhibitoren imitieren zu können und so die kollagen-induzierte Plättchenaktivierung zu unterbinden.

Der Autor:



Prof. Dr. Johannes A. Eble, 45, studierte Biochemie in Tübingen und Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Harvard Medical School in Boston (1995 bis 1998) begann er eigene Arbeiten an der Universität Münster, wo er sich 2004 habilitierte.

Anschließend war er Gruppenleiter am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie am Universitätsklinikum Münster. Seit Januar 2009 ist er Leiter des Schwerpunkts Vasculäre Matrixbiologie am Exzellenzcluster Cardiopulmonary Systems an der Goethe-Universität. Er erforscht die Interaktion von kollagen- und lamininbindenden Integrinen mit ihren extrazellulären Matrixproteinliganden und ihre Hemmung durch Integrinantagonisten aus Schlangengiften auf molekularer und zellulärer Ebene.

Eble@med.uni-frankfurt.de
www.eccps.de

Die Natur inspiriert neue Leitstrukturen

Die faszinierende Vielfalt von Stoffen, die im Schlangengift synergistisch die Blutstillung hemmen, basiert auf einem Kanon bestimmter Proteinfaltungsmodule, die in vielfältiger Variation gegen verschiedene Gerinnungsfaktoren und Thrombozytenrezeptoren gerichtet sind.^{14/} Die molekularen Strukturen dieser Module zu kennen, ist notwendig, um ihre pharmakologischen Wirkprinzipien zu entschlüsseln. Daraus abgeleitete Leitstrukturen erlauben Chemikern und Pharmazeuten, neue Antikoagulantien, Antithrombotika und Fibrinolytika zu entwickeln. Durch Modifikation und Variation der Leitstruktur wird die Pharmakokinetik und -dynamik synthetischer Mimetika gegenüber den Naturstoffen verbessert. ■ Dass dies praktisch möglich ist, zeigt das Beispiel der neuartigen Antithrombotika, die auf den RGD-haltigen Disintegrinen basierend gegen den Fibrin(ogen)-Rezeptor der Blutplättchen zielen. Auf diese Weise können die über Jahrtausende evolutionär gereiften Schlangengifte mit ihrer hohen Spezifität und Effektivität zum medizinischen Nutzen verwendet werden. Die Natur macht es uns vor – wir müssen nur von ihr lernen. ◆

Glossar

Antikoagulanzen: Pharmazeutikum, das die Blutgerinnungskaskade hemmt, zum Beispiel Heparine, Phenprocoumon (Marcumar®) oder Warfarin

Antithrombotikum: Pharmazeutikum, das die Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen (Thrombozyten) und so die Ausbildung des Blutpfropfes hemmt, zum Beispiel Acetylsalicylsäure (Aspirin®)

Arteriosklerose: Arterienverkalkung. Durch Schädigung der Endothelzellen kommt es zum entzündlichen Prozess in der Gefäßwand, der mit der Ablagerung von Lipiden und der fibrotischen Produktion von Kollagen zur Schädigung des Blutgefäßes führt. Am geschädigten Endothel kommt es zur Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung

Basalmembran: Eine spezielle zweidimensionale Schicht der extrazellulären Matrix, die das Bindegewebe von anderen Geweben trennt. Sie ist aus Glykoproteinen (Typ-IV-Kollagen,

Laminine, Nidogen) und Proteoglykanen (Perlecan) aufgebaut. Sie ist für Zellen impermeabel

Domäne: Faltungseinheit eines Proteins

Embolie: Blutgefäßverschluss durch einen Thrombus, der durch den Blutstrom von seinem Bildungsort losgerissen wurde

Extrazelluläre Matrix: Gerüstwerk aus Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, die im Zwischenzellraum des Bindegewebes vorhanden sind. Eine besondere Zugfestigkeit des Bindegewebes wird durch kollagenhaltige Fibrillen (Typ-I- bzw. II-Kollagen) bewerkstelligt

Fibrinolytika: Pharmazeutika, die den fibrinreichen Blutpfropf auflösen

Hämostase: Blutstillung, Beendigung des Blutaustritts aus einem verletzten Blutgefäß

Protease: Enzym, das Peptidbindungen eines Proteins spalten kann. Dabei nimmt die Protease das Proteinsubstrat in seiner Bindungstasche auf. Das darin

enthaltene aktive Zentrum spaltet dann das Proteinsubstrat unter Einbau eines Wassermoleküls (hydrolytisch) in zwei Peptidfragmente. Nach dem Bestandteil des aktiven Zentrums, der für die katalytische Aktivität der Protease essenziell ist, unterscheidet man Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen

Thrombose: Ausbildung eines Blutgerinnsels innerhalb eines Blutgefäßes, zum Beispiel durch entzündliche Prozesse, durch Arteriosklerose oder durch die stets stattfindende Abschilferung von Endothelzellen

Thrombus: Blutgerinnsel, das als Endprodukt der Blutstillung ein verletztes Blutgefäß verschließt

Thrombozyten: Blutplättchen, mit einem Durchmesser von 1,2 bis 4 Mikrometer und einer Lebensdauer von 8 bis 11 Tagen. Normale Anzahl im Blut: 250 000 bis 400 000 pro Mikroliter. Bei niedrigeren Werten droht eine Gerinnungsstörung. Operationen sind nicht ratsam