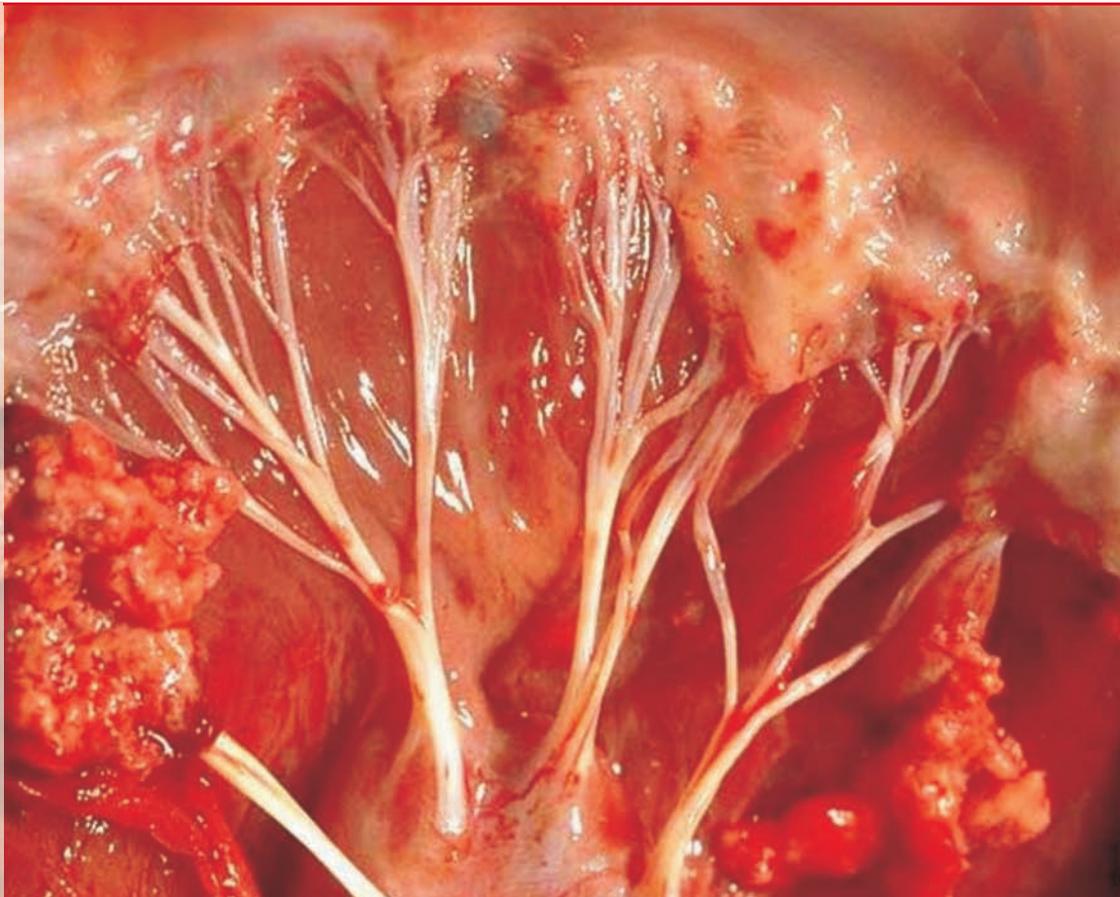


Untersuchungen zum Einfluss des Extrazellulären
Adhäsionsproteins von *Staphylococcus aureus*
auf die Thrombozytenfunktion

SILKE POHL



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth
und
der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und
Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Betreuerin: Prof. Dr. Beate Kehrel

**Untersuchungen zum Einfluss
des Extrazellulären Adhäsionsproteins von
Staphylococcus aureus auf die Thrombozytenfunktion**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

^ingereicht von

Silke Pohl

Tierärztin aus Ostercappeln (Niedersachsen)

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter/in: Prof. Dr. Joachim Roth
Prof. Dr. Beate Kehrel

Tag der Disputation: 07.04.2011

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
I.1 Physiologie und Morphologie der Thrombozyten.....	1
I.2 Thrombozyten in der Hämostase.....	3
I.3 Bedeutung der Thrombozyten in der Inflammation, Infektion und Tumormetastasierung.....	8
I.3.1 Thrombozyten in der Inflammation und Tumormetastasierung.....	9
I.3.2 Thrombozyten in der Infektion.....	11
I.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
I.4.1 Entstehung einer infektiösen Endokarditis durch <i>S. aureus</i>	17
I.4.2 Bakterielle Persistenzmechanismen.....	19
I.5 Extracellular adherence protein (Eap).....	21
I.5.1 Molekulare Struktur von Eap.....	22
I.5.2 Interaktionen von Eap mit den Wirtsstrukturen und mit der Oberfläche von <i>S. aureus</i>	22
I.5.3 Eap als entzündungs- und immunmodulierender Faktor.....	25
I.5.4 Eap interferiert mit Metastasevorgängen und Wundheilungs- mechanismen.....	27
I.6 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....	32
II. Material und Methoden.....	35
II.1 Geräte.....	35
II.2 Chemikalien.....	36
II.2.1 Verwendete Antikörper.....	36
II.3 Präparation der Thrombozyten.....	37
II.3.1 Plättchenisolierung durch Zentrifugation.....	37
II.3.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl/ μ l Blut.....	38
II.3.3 Separation der Thrombozyten von Plasmaproteinen mit Hilfe der Gelfiltration.....	38
II.3.4 Herstellung von plättchenarmem Plasma (platelet poor plasma (PPP))	39
II.4 Aktivierung der Thrombozyten <i>in vitro</i>	39
II.4.1 Eap.....	39
II.4.2 Thrombin.....	40
II.4.3 ADP.....	41
II.4.4 Kollagen.....	42

II.5 Durchflusszytometrie.....	42
II.5.1 Optische Technik und Signaldetektion.....	42
II.5.2 Signalverarbeitung und Signalanalyse.....	45
II.6 Detektion der Plättchenaktivierung.....	46
II.6.1 Fibrinogenbindung.....	46
II.6.1.a Markierung von Fibrinogen, FVIIa, FVIII und FXIII mit Fluoresceinisothiocyanat.....	47
II.6.2 Aggregometrie.....	49
II.6.3 Sekretion der α -Granula.....	50
II.6.4 Expression von CD63.....	51
II.6.5 Eap-induzierte Freisetzung von Mepacrin aus den Thrombozyten.....	51
II.6.6 Expression von CD154 (CD40 Ligand, CD40L).....	52
II.6.7 Prokoagulanter Zustand.....	52
II.6.7.a Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von Annexin-V-FITC.....	53
II.6.7.b Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FVIIa-FITC.....	53
II.6.7.c Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FVIII-FITC.....	54
II.6.7.d Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FXIII-FITC.....	54
II.6.8 Mikropartikelbildung.....	54
II.7 Einfluss von Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	55
II.7.1 Komplexbildner.....	55
II.7.2 Hirudin.....	56
II.7.3 Melagatran.....	56
II.7.4 Heparine.....	57
II.8 Einfluss von thiolreaktiven Substanzen auf die Eap-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	58
II.8.1 pCMPS und DTNB.....	58
II.8.2 Glutathion.....	59
II.8.3 Gliotoxin.....	60
II.8.4 Phenylarsinoxid.....	60
II.8.5 Bacitracin.....	61
II.9 Statistische Auswertung aller experimentellen Daten.....	61

III. Ergebnisse	62
III.1 Untersuchungen zum Einfluss von Eap auf Thrombozyten.....	62
III.1.1 Eap-induzierte Fibrinogenbindung an humane Thrombozyten.....	62
III.1.2 Vergleich der Bindung von Fibrinogen an humane Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.....	64
III.1.3 Aggregometrie.....	67
III.1.4 Eap-induzierte Sekretion der α -Granula aus humanen Thrombozyten..	69
III.1.5 Eap induzierte Sekretion der „dense bodies“ aus humanen Thrombozyten.....	69
III.1.6 Eap-induzierte Freisetzung von Mepacrin aus humanen Thrombozyten.....	70
III.1.7 Eap-induzierte Expression von CD40 Ligand auf der Oberfläche humaner Thrombozyten.....	71
III.1.8 Eap-induzierte prokoagulante Aktivität humaner Thrombozyten.....	72
III.1.9 Mikropartikelbildung.....	73
III.2 Einfluss von Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	74
III.3 Einfluss von thiolreaktiven Substanzen auf die Eap-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten.....	77
III.3.1 Einfluss von DTNB und pCMPS auf die Eap-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten.....	77
III.3.1.a Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	77
III.3.1.b Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten.....	78
III.3.1.c Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	79
III.3.1.d Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten.....	80
III.3.2 Einfluss von GSH auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	81
III.3.3 Einfluss von Gliotoxin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	82
III.3.4 Einfluss von PAO auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	83
III.3.5 Einfluss von Bacitracin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	84

III.4 Vergleich der Agonist-induzierten Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger.....	85
III.4.1 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten der Ratte	88
III.4.2 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an equine Thrombozyten.....	89
III.4.3 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an bovine Thrombozyten.....	91
III.4.4 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Hundes	92
IV. Diskussion.....	94
IV.1 Einfluss von Eap auf humane Thrombozyten.....	94
IV.1.1 Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen an humane Thrombozyten.....	94
IV.1.2 Sekretion der α -Granula induziert durch Eap.....	97
IV.1.3 Sekretion der „dense bodies“ induziert durch Eap	99
IV.1.4 Eap-induzierte Expression von CD40L auf der Oberfläche humaner Thrombozyten	101
IV.1.5 Eap induziert eine prokoagulante Oberfläche auf humanen Thrombozyten.....	102
IV.1.6 Einfluss verschiedener Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	105
IV.1.7 Einfluss thiolreaktiver Substanzen auf die Eap-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten.....	108
IV.2 Vergleich der Agonist-induzierten Aktivierung von Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger.....	115
V. Ausblick.....	121
VI. Zusammenfassung.....	123
VII. Summary.....	127
VIII. Abkürzungsverzeichnis.....	131
IX. Literaturverzeichnis.....	136

X. Anhang.....	155
X.1 Publikationen.....	155
X.1.1 Veröffentlichte Abstracts.....	155
X.1.2 Manuskript in Bearbeitung.....	155
X.2 Danksagung.....	156
X.3 Erklärung.....	157

I. Einleitung

Im Falle einer blutigen Verletzung setzt der physiologische und sehr wichtige Mechanismus der Blutgerinnung, auch Hämostase genannt, am Ort der Verletzung ein. Dadurch kommt es innerhalb weniger Minuten zur Blutstillung und somit zur Abdichtung der Wunde, um den Körper so vor zu hohen Blutverlusten zu bewahren und ihn auch vor dem Eindringen von Keimen zu schützen.

Während Thrombozyten einerseits dafür verantwortlich sind, eine Blutung zu stoppen, können sie ebenso Zellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr aktivieren und mit diesen über Adhäsionsmoleküle und spezifische Rezeptoren interagieren. Dies ermöglicht es den Leukozyten, mit in den Thrombus integriert zu werden und direkt am Ort der Verletzung die im Thrombus fixierten Keime im Sinne des Abwehrsystems zu bekämpfen. Auch durch die Interaktion mit Keimen und durch freigesetzte Substanzen der Bakterien werden Thrombozyten aktiviert.

Auf der gesunden Haut kommen zahlreiche Staphylokokkenspezies als Kommensalen vor. Gelangen sie jedoch über eine Wunde in den Blutkreislauf kann das schwerwiegende Folgen haben, wie zum Beispiel Endokarditiden, Dissemination der Keime zu anderen Organen, bis hin zum Schockgeschehen und disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC), häufig auch mit Todesfolge.

Im weiteren Verlauf soll die Einleitung einen Überblick über die Mechanismen der Blutgerinnung und die Funktion der Thrombozyten im innatem und spezifischen Immunsystem geben. Ein besonderes Augenmerk fällt hierbei auf die Bedeutung des „Extracellular Adherence Protein“ (Eap), das von *Staphylococcus aureus* freigesetzt wird.

I.1 Physiologie und Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten Zellen des Blutes und werden bei Säugern im Knochenmark gebildet. Am Anfang der Zellentwicklungsreihen steht eine pluripotente hämatopoietische Stammzelle, aus der alle Blutzelllinien hervorgehen, und aus der über mehrere Differenzierungsschritte der reife Megakaryozyt entsteht. Dieser bildet lange, zytoplasmatische Ausläufer („Proplatelets“) zwischen den Endothelzellen hindurch ins sinusoidale Lumen des Knochenmarks, wo diese Ausläufer dann zu den kernlosen Blutplättchen fragmentieren und so in die Zirkulation gelangen. Die Lebensdauer der Plättchen variiert speziesabhängig. Bei Menschen, Pferden, Wiederkäuern und Hunden beträgt sie 5-10 Tage, bei Katzen jedoch werden die Plättchen schon nach 31 Stunden

entfernt. Der Abbau der gealterten Thrombozyten erfolgt dann durch Gewebsmakrophagen vor allem in der Leber und der Milz (Jain, 1993; Jacobs et al., 1986).

In der Größe bzw. dem Volumen gibt es speziebedingte Unterschiede. Wiederkäuer, Pferde und Nager haben die kleinsten Plättchen mit einem durchschnittlichen Volumen von 3,2-5,4 fl. Bei Mensch, Hund und Schwein beträgt dieses 7,6-8,3 fl, und die größten Plättchen hat die Katze mit 15,1 fl (Rao, 1999).

In Folge einer Stimulation verändern die Plättchen ihre Form ausgehend von einer diskoiden bis bikonvexen Form im Ruhezustand hin zu einer abgerundeten Form mit Pseudopodien im Aktivierungszustand. Invaginationen der Plasmamembran in das Innere der Plättchen bilden das offene kanalikuläre System (OCS) und münden an der Zelloberfläche. Im Rahmen einer Aktivierung der Plättchen mit deren Formwandel und Zellausbreitung wird das OCS evaginiert und fungiert somit als Membranreservoir für die Oberflächenvergrößerung. Dies ermöglicht einen effektiveren Wundverschluss. Im direkten Anschluss an die Membran liegt das Submembranöse Zytoskelett (SMC), bestehend aus Aktinfilamenten, welche über Linkermoleküle an die Glykoproteine Ia, Ib und IX in der Membran gebunden sind. Zusammen mit den Mikrotubuli bilden sie im marginalen Teil des Plasmas ein viskoelastisches Gel, welches der Formgebung der Zelle und der Stabilisierung gegenüber Scherkräften dient. Zudem fungieren Aktin- und Myosinfilamente als kontraktiles Zytoskelett. Für die Thrombozytenfunktion wichtige Zellorganellen sind die zentral gelegenen α -Granula und „dense bodies“, welche spezifische Speicherorganellen sind. Das „dense tubular system“ (DTS) entspricht dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), außerdem sind Lysosomen, Peroxisomen und Mitochondrien vorhanden (Morgenstern, 1999).

Die α -Granula enthalten Substanzen, die bei einer Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt werden und bei den Interaktionen der Plättchen mit anderen Zellen oder Gewebestrukturen eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören große Adhäsionsproteine, wie Fibrinogen, der von Willebrand Faktor (vWF), Thrombospondin-1 (TSP-1), Fibronektin, Koagulationsfaktoren wie FV, VII, XI und XIII, außerdem PAF, PF-4, β -Thromboglobulin (β -TG), Wachstumsfaktoren, fibrinolytische Substanzen, Faktoren, die an Entzündungen und Immunreaktionen beteiligt sind (z. B. Immunglobuline, Chemokine, antimikrobielle Substanzen, Komplementfaktoren), Protease-Inhibitoren und noch einige mehr, die alle entweder durch Proteinsynthese in den Megakaryozyten entstehen oder durch Endozytose/Pinozytose in die Zelle aufgenommen werden (zusammengefasst von Jurk und Kehrel, 2005; Stenberg et al., 1984). Die Granulamembran enthält außerdem einige Rezeptorproteine, wie GPIIb/IIIa und das P-Selektin (CD62P), die mit der Aktivierung an der Plättchenoberfläche exprimiert werden (Cramer et al., 1990).

Die „dense bodies“ enthalten Substanzen, die Einfluss auf den Gefäßtonus haben und die initiale Aktivierung verstärken (ADP, Serotonin, Calcium- und Magnesiumionen und

anorganisches Phosphat) (Meyers et al., 1982). Die Lysosomen der Plättchen enthalten hydrolytische Enzyme, die eher eine sekretorische Funktion besitzen, verglichen mit denen in anderen Zellen (Bentfeld-Barker und Bainton, 1982). Die Peroxisomen enthalten Katalasen, wohingegen sich die Peroxidase-Aktivität auf das DTS der Plättchen, bzw. auf das ER der Megakaryozyten beschränkt (Breton-Gorius und Guichard, 1972).

Beim Vergleich verschiedener Tierarten gibt es einige Unterschiede, wie zum Beispiel, dass das Rind kein OCS und auch keine Mikrotubuli im marginalen Bereich besitzt. Weiterhin variiert die Reaktivität der Plättchen verschiedener Tierarten, wobei man allgemein sagen kann, dass die Blutplättchen der Wiederkäuer reaktionsträge sind und die der Pferde und Fleischfresser stärker reaktiv (Rao, 1999).

I.2 Thrombozyten in der Hämostase

Bis vor wenigen Jahren wurde in Wissenschaft und Lehre die Auffassung vertreten, dass die Hämostase durch eine kaskadenartige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren gekennzeichnet ist, und dass der Gerinnungsprozess fast ausschließlich durch die Konzentration und die Kinetik der Koagulationsfaktoren kontrolliert wird. Inzwischen wurde jedoch bewiesen, dass die Thrombozyten eine ganz zentrale Position im Prozess der Hämostase einnehmen. Ihre besondere Bedeutung bekommen sie dadurch, dass sie zum einen selbst im Rahmen einer Aktivierung wichtige Substanzen für die Gerinnung freisetzen. Zum anderen bieten sie mit entsprechenden Rezeptoren für die Gerinnungsfaktoren die Reaktionsoberfläche für die Abläufe in der Blutgerinnung. Auf diese Art regulieren und kontrollieren sie die Blutgerinnung und sorgen dafür, dass keine DIC entsteht. Daher beschreibt man den Hämostaseprozess heute mit Hilfe eines zellbasierten Modells, das in 3 Stufen eingeteilt ist: die Initiation, die Amplifikation und die Propagation (Hoffman und Monroe, 2001).

Bei der Initiation kommt das Blut, ausgehend von einer blutigen Verletzung, mit den subendothelialen und charakteristischerweise TF-tragenden Fibroblasten in Kontakt (TF = Gewebefaktor, tissue factor); unter physiologischen Bedingungen gibt es keine TF-tragenden Zellen in der Blutbahn, sondern nur im extravaskulären Gewebe, so dass eine spontane Gerinnung verhindert wird. Anders im Falle einer Entzündung, hier können auch Endothelzellen und Monozyten den TF auf ihrer Oberfläche exprimieren (Bogdanov et al., 2003; Celi et al., 1994). Der TF ist dafür verantwortlich, dass eine blitzschnelle Aktivierungskaskade der Gerinnungsfaktoren in Gang gesetzt wird. Er bildet mit dem im Plasma gelösten Faktor VII einen Komplex, der die Faktoren IX und X aktiviert. FXa setzt dann schließlich den im Plasma gelösten FV zu FVa um (Monkovic und Tracy, 1990) und bildet mit diesem an der Fibroblastenoberfläche den Prothrombinase-Komplex, durch den

Prothrombin zu Thrombin umgewandelt wird. Diese kleinen Mengen an Thrombin, die auf den TF-tragenden Zellen gebildet wurden, reichen lediglich dazu aus, weitere Plättchen und Faktoren (V, VIII und XI) (s. u.) zu aktivieren.

Diese leiten die folgende Gerinnungsstufe, die Amplifikation, ein, in der das initiale, prokoagulante Signal verstärkt wird (Monroe, Hoffman, Roberts, 1996). Das Thrombin, der im Plasma gelöste FXI und vWF binden an das GPIIb α der Plättchen; dabei binden vWF und FXI kompetitiv an die „leucin-rich-repeats“ (LRRs), während Thrombin an die anionischen Regionen des GPIIb α bindet. So sind beide nebeneinander an GPIIb α auf der Plättchenoberfläche fixiert und FXI kann effektiv durch Thrombin aktiviert werden (Baglia et al., 2004). FXIa aktiviert wiederum FIX (Oliver et al., 1999). Der im Plasma vorhandene vWF/FVIII-Komplex, in dem vWF als Trägermolekül für FVIII fungiert, lokalisiert FVIII durch die Bindung an GPIIb α ebenfalls in die direkte Nähe des Thrombins. So kann Thrombin den Komplex spalten und FVIII aktivieren, so dass dieser für die Bildung des Tenase-Komplexes (FVIIIa/ FIXa) zur Verfügung steht (Ahmad et al., 2000). FIX wird also während der Initiation auf TF-tragenden Zellen aktiviert, von wo aus er zu den Plättchen diffundieren kann, da ihn ATIII im Plasma nicht so schnell inaktiviert; außerdem wird er auf den Plättchen selbst durch FXI aktiviert, wo er dann für die Bildung des Tenase-Komplexes zur Verfügung steht (Begbie et al., 2005; Hoffmann und Monroe, 2001). Der Tenase-Komplex aktiviert FX, der seinerseits an den „effector-protease-receptor-1“(EPR-1) bindet, FV aktiviert und mit FVa den Prothrombinase-Komplex bildet, um in dieser Form Prothrombin zu Thrombin umzuwandeln (Bouchard et al., 1997).

Diese strukturierte Ansammlung von prokoagulanten Komplexen auf der Plättchenmembran macht die Produktion großer Mengen Thrombin möglich und wird auch als Propagationsstufe der Hämostase bezeichnet (Hoffmann und Monroe, 2001). Dieser „Thrombin-Burst“ reicht nun aus, um einerseits Fibrinogen zu Fibrin umzuwandeln und andererseits FXIII zu aktivieren, der als solches dann die Fibrinmonomere polymerisiert; auch in diesem neuen Hämostasemodell wird zwischen primärer und sekundärer Hämostase differenziert (Chakroun et al., 2006).

Durch die zusätzliche Bindung des Thrombins an PAR1 und PAR4 (s. u.) wird die Plättchenaktivierung noch verstärkt. Mit der Stimulation der Plättchen kommt es zur Sekretion des α -Granulainhaltes (Mechanismus s. u.), und mit diesem auch FV, der dann für die Bildung des Prothrombinase-Komplexes zur Verfügung steht (Monroe et al., 1996).

Befinden sich die Thrombozyten im ruhenden Zustand, sind in die äußere Lipidschicht der Membran hauptsächlich Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) eingelagert und in der inneren Lipidschicht Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE). Diese asymmetrische Phospholipidverteilung wird durch ATP- und Ca²⁺-abhängige Enzyme

aufrechterhalten. Im Rahmen der Plättchenaktivierung wird diese Verteilung durch einen „Flip-Flop“-Effekt mit Hilfe der „Scramblase“ umgekehrt, so dass das PS vermehrt in der äußeren Lipidschicht vorhanden ist. Das PS verleiht dem äußeren Blatt eine stärkere negative Gesamtladung, die für die Bindung der Gerinnungsfaktoren, speziell für die Tenase- und Prothrombinasekomplexe, und somit für eine ausreichende Thrombinentstehung essenziell ist (Shapira et al., 2000). Trotzdem müssen die Gerinnungsfaktoren für eine effektive Hämostase zusätzlich an spezifische Rezeptoren binden (Baglia et al., 2004).

Durch die Thrombinaktivität, die Einlagerung von PS in die äußere Phospholipidschicht und durch die Bindung von Gerinnungsfaktoren an ihre Rezeptoren entsteht eine koordinierte Ansammlung von prokoagulanten Komplexen auf der Thrombozytenoberfläche. Solange die Faktoren/ Komplexe an der Plättchenoberfläche gebunden sind, finden sie Schutz vor den im Plasma gelösten Proteaseinhibitoren. Entfernen sie sich jedoch von der Membranoberfläche, werden sie durch diese inaktiviert (TFPI inhibiert z. B. FXa, ATIII inhibiert FIXa, FXa und Thrombin). Somit verhindern die Proteaseinhibitoren eine übermäßige Thrombinproduktion mit möglicherweise einer disseminierten Koagulation als Folge. Auch die räumlich getrennte Lokalisation der einzelnen Phasen an verschiedenen Zelloberflächen über spezifische Rezeptoren für die Koagulationsfaktoren ist wichtig, um den Gerinnungsprozess zu kontrollieren (De Jonge et al., 2000; Dickneite und Leithauser, 1999).

Der Blick soll nun von dem Geschehen auf der Thrombozytenoberfläche und ihrem direkten Umfeld auf die internen Abläufe der Plättchen gelenkt werden. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Arten der Plättchenaktivierung.

Eine Möglichkeit ist die Aktivierung durch Plättchenagonisten wie ADP, Thrombin, Thromboxan A₂ (TxA₂) und Serotonin (s. u.). Zunächst wird Thrombin auf den TF-tragenden Zellen und später auch auf den Plättchen gebildet. Es aktiviert die Plättchen dann durch Bindung an die „protease-activated-receptors“ (PAR1, PAR4) mit der Sekretion sekundärer Agonisten aus den Granula als Folge. Diese binden, so wie Thrombin, an spezifische Transmembranrezeptoren, die an GTP-bindende heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind, und lösen so über diese eine Signaltransduktion aus (Kahn et al., 1998).

Die Thrombin- und TxA₂-Rezeptoren sind an die Untereinheiten G α_q , G α_{12} und G α_{13} (= G $_q$, G $_{12}$, G $_{13}$) gekoppelt; über G $_{12}$ und G $_{13}$ wird eine Rho/Rho-Kinase-abhängige Phosphorylierung der „myosin-light-chain“ (MLC) vermittelt, mit Reorganisation des Zytoskeletts und Kontraktion der Filamente, welches in dem Formwandel und der Pseudopodienbildung der Plättchen resultiert. Der Formwandel ist einerseits wichtig, damit die Plättchen durch ihre Oberflächenvergrößerung eine Wunde effektiv abschließen, und andererseits werden dadurch die Granula für die Sekretion im Plasma zentralisiert. Im Gegensatz zum Formwandel, welcher der Sekretion vorausgeht, ist diese und auch die Aggregation abhängig vom intrazellulären Ca²⁺-Anstieg. Der Anstieg ist für eine effiziente

Plättchenaktivierung zwar essenziell, aber alleine nicht ausreichend. Er wird über die Aktivierung der G_q -Untereinheit der Thrombin- und TxA_2 -Rezeptoren vermittelt, genauer durch die Aktivierung des PLC β -Signalweges und der daraus folgenden Ca^{2+} -Freisetzung aus dem DTS. Durch die Kontraktion der Filamente werden außerdem die α -Granula und „dense bodies“ an die Plasmamembran herangeschoben, mit nachfolgender Fusion der Membranen und Exozytose der Granulainhaltsstoffe (Klages et al., 1999; Offermanns, 2006). Von diesen sind für die Blutgerinnung primär essenziell: die Adhäsionsproteine, die Gerinnungsfaktoren, fibrinolytische Substanzen für ein kontrolliertes Geschehen und aus den dichten Granula das ADP, Serotonin, TxA_2 , Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Inhaltsstoffe gehen in die oben beschriebene Amplifikations- und Propagationsstufen der Hämostase ein (siehe Anfang I.2 ff.).

Die ADP-Wirkung auf Plättchen wird teilweise über $P2Y_1$ vermittelt, welcher an ein G_q -Protein gekoppelt ist, und der analog zum Thrombin- und TxA_2 -Rezeptor die Ca^{2+} -Mobilisation induziert, wodurch die oben beschriebenen Effekte verstärkt werden. Zunächst wird über $P2Y_1$ nur eine flüchtige Aggregation vermittelt, die aber später über den $P2Y_{12}$ -Rezeptor verstärkt wird. Durch Bindung von ADP an $P2Y_{12}$ wird das daran gekoppelte G_i -Protein aktiviert, welches die Adenylylcyclase (AC) hemmt (Leon et al., 2004). Die AC setzt allgemein in Zellen das ATP zu cAMP um, welches durch Bindung an eine cAK (cAMP-abhängige Kinase) eine Phosphorylierung des IP_3 (Inositoltriphosphat)-Rezeptors induzieren und damit den Ca^{2+} -Spiegel senken würde. Das cAMP ist also ein aktivierungshemmender Botenstoff, so dass sich die AC-Hemmung wiederum aktivierungsverstärkend auswirkt (Aszodi et al., 1999).

Serotonin, ein schwacher Plättchenagonist, bindet an 5HT $2A$ -Rezeptoren, die an G_q -Proteine gekoppelt sind, und aktiviert die Plättchen über den PLC β -Signalweg (Jin und Kunapuli, 1998). Mit dem zytoplasmatischen Ca^{2+} -Anstieg - induziert durch die Aktivierung verschiedener Rezeptoren - wird die Phospholipase A_2 aktiviert, welche die Freisetzung von Arachidonsäure ins Zytosol aus den Membranphospholipiden des DTS katalysiert. Die Arachidonsäure wird dann mit Hilfe von Cyclooxygenase-1 und Thromboxansynthase in TxA_2 umgesetzt, welches durch Sekretion an die Plättchenoberfläche gelangt und dort an die TP α /TP β -Rezeptoren bindet. Diese sind wie oben erwähnt ebenfalls an G_q -, G_{12} - und G_{13} -Proteine gekoppelt (Kroll et al., 1991; Offermanns, 2006).

Die Thrombozyten der verschiedenen Tierarten zeigen eine sehr unterschiedliche Reaktivität im Hinblick auf verschiedene Agonisten, wobei allerdings von ähnlichen Aktivierungs- und metabolischen Signalwegen auszugehen ist. Der Arachidonsäuremetabolismus ist zum Beispiel in Thrombozyten von Menschen und Hunden sehr stark ausgeprägt, in Pferdeplättchen dagegen eher mittelmäßig, während die Thrombozyten von Rindern und Schweinen nur geringe Mengen an TxA_2 synthetisieren (Meyers et al., 1980). Dennoch sind

die Thrombozyten von Pferden hochreaktiv, was sich auch häufig in thrombo-embolischen Komplikationen im Rahmen einer Endotoxämie äußert (z. B. bei einer Hufrehe oder einer Kolik). Allerdings scheint PAF hier der ausschlaggebende Mediator zu sein. Im Vergleich zu anderen Spezies sind weit geringere Konzentrationen von PAF notwendig, um equine Plättchen zu aktivieren (Jarvis und Evans, 1996). Dagegen reagieren Pferdeplättchen nur schwach auf Serotonin. Thrombozyten von Wiederkäuern reagieren ebenfalls stärker auf PAF als auf Thrombin und ADP; Serotonin, Epinephrin und Arachidonsäure haben dagegen gar keine stimulierende Wirkung auf die Plättchen der Wiederkäuer. Die Thrombozyten von Katzen sind ebenfalls hochreaktiv, so dass sie in Citrat-antikoaguliertem Blut sogar zu Spontanaggregationen neigen. Durch alle Agonisten wird eine sehr starke Aggregation der Katzenthrombozyten ausgelöst (ADP, Thrombin, Kollagen, Serotonin und Arachidonsäure) (Rao, 1999).

Bisher wurde der Aktivierungsmechanismus beschrieben, der durch die Bindung der Agonisten an ihre Rezeptoren vermittelt wird. Eine andere Möglichkeit der Plättchenstimulation erfolgt durch Adhäsion der Plättchen an das subendotheliale Kollagen des verletzten Endothels. Allerdings laufen diese Aktivierungsprozesse im Falle einer Verletzung simultan ab, da sowohl der TF als auch freiliegendes Kollagen mit dem Plasma in Kontakt kommen. Bei hohem Scherstress, wie zum Beispiel in Arteriolen oder atherosklerotisch verengten Gefäßen, ist die direkte Adhäsion der Plättchen an Kollagen nicht möglich und wird durch die Bindung von vWF an GPIb/V/IX auf den nicht-aktivierten Plättchen vermittelt. Mit Hilfe des vWF wird zunächst nur die Agglutination der Plättchen untereinander und eine lockere, reversible Adhäsion der Plättchen am subendothelialen Kollagen vermittelt, die es ihnen erlaubt, an der geschädigten Endothelstelle entlang zu rollen (Walther et al., 2003). Diese erste reversible Bindung kann nur durch die multimeren Form des vWF vermittelt werden. Im Gegensatz zur dimeren Form sind in dieser die A1-Bindungsdomänen in einer hohen Dichte angeordnet, so dass zahlreiche Bindungsmöglichkeiten für die GPIb α -Rezeptoren auf den Plättchen vorhanden sind. Die Plättchen werden auf diese Weise reversibel und für kurze Zeit lokal fixiert, so dass die Agonisten und Gerinnungsfaktoren bei den hohen Flussgeschwindigkeiten überhaupt die Möglichkeit haben die Blutgerinnung zu induzieren (Ruggeri et al., 2006).

Alternativ zu vWF kann auch TSP-1 die Adhäsion über GPIb α der Plättchen an Kollagen vermitteln (Jurk et al., 2003).

Weitere Kollagenrezeptoren auf Thrombozyten stellen GPIa/IIa und GPVI dar. GPIa/IIa vermittelt die Adhäsion unter nicht-statischen Bedingungen (Kehrel et al., 1998). Die Bindung von Kollagen an GPVI auf den Plättchen führt zur Quervernetzung dieser GPs und zur Phosphorylierung der Fc γ -Kette im „immuno-receptor-tyrosine based activation motif“ (ITAM)

mit Bindung und Aktivierung der Tyrosinkinase Syk, die ihrerseits den Transmembranadaptor LAT aktiviert. An diesem sammeln sich die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und andere Signalproteine an, die zur Aktivierung der PLC γ 2 führen. Diese spaltet dann PIP $_2$ zu IP $_3$ und DAG (Diacylglycerin). IP $_3$ vermittelt die Ca $^{2+}$ -Mobilisation aus den intrazellulären Speichern und DAG die Aktivierung der Proteinkinase C. Darauf folgt die Sekretion des Granulainhaltes und eine vermehrte Expression des GPIIb/IIIa-Rezeptors an der Thrombozytenoberfläche, der die Plättchen über Fibrinogenbrücken miteinander verbindet. Gleichzeitig erfährt der GPIIb/IIIa-Rezeptor infolge der Plättchenaktivierung eine Konformationsveränderung (inside-out-signaling) und erlangt dadurch eine höhere Affinität für die Plasmaproteine; die aktivierte Proteinkinase C und der intrazellulär erhöhte Ca $^{2+}$ -Spiegel scheinen dafür relevant zu sein, der genaue Signalweg ist jedoch nicht bekannt. Durch die Plättcheninteraktion über Fibrinogen und dessen Polymerisierung zu einem Fibrinnetz entsteht ein stabiler Thrombus (Bodin et al., 2003; Gibbins, 2004).

I.3 Bedeutung der Thrombozyten in der Inflammation, Infektion und Tumormetastasierung

Neben ihrer wichtigen Funktion in der Hämostase, sind die Blutplättchen auch an allen anderen Prozessen beteiligt, die auf eine Verletzung der Gefäßwand folgen, wie Entzündungsprozesse, antimikrobielle Abwehr und die Wundheilung. Thrombozyten setzen Serotonin und Histamin frei, die die Gefäßpermeabilität erhöhen, und ihre Chemokine locken Leukozyten an und aktivieren sie. Außerdem wirken die aus Plättchen freigesetzten Wachstumsfaktoren chemoattraktiv und stimulierend auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Keratinozyten (Klinger und Ulbricht, 2003).

Die phylogenetische Herkunft der Plättchen untermauert die Tatsache ihrer Funktion in der Immunabwehr. Ihre evolutionären Vorläuferzellen sind die kernhaltigen Hämocyten in der Hämolymphe der Invertebraten, z. B. im Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*). Diese können sowohl einfache Aggregate formen, als auch wie die Leukozyten antimikrobielle Substanzen freisetzen und Pathogene aufnehmen. Mit ihrer Differenzierung zu Thrombozyten bei den Vertebraten werden diese zwar spezialisierter in ihren hämostatischen Fähigkeiten, besitzen aber immer noch Funktionen dieser Vorläuferzellen (Muta und Iwanaga 1996).

I.3.1 Thrombozyten in der Inflammation und Tumormetastasierung

Bei einer Entzündung werden im Körper initial Neutrophile, Monozyten und Makrophagen rekrutiert und aktiviert. Sie setzen Zytokine, Chemokine und vasoaktive Substanzen frei und/oder stimulieren Endothel- und Epithelzellen, ebensolche freizusetzen, wodurch die Transmigration der Leukozyten ins Gewebe verstärkt wird (Elzey et al., 2003). Die aktivierten Monozyten exprimieren TF, welcher wiederum zur Aktivierung der Plättchen und zur Sekretion der α -Granula führt (Celi et al. 1994). Aus letzteren werden ebenfalls Chemokine freigesetzt, die den Entzündungsprozess durch eine chemotaktische Wirkung auf die Leukozyten verstärken (Gear und Camerini, 2003).

Außerdem wird das auf der α -Granulamembran vorhandene Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P) und der CD40 Ligand (CD40L) mit der Sekretion an der Membranoberfläche der Plättchen exprimiert (Celi et al., 1994; Henn et al., 1998). Die Thrombozyten sind mit der aktivierungsabhängigen Präsentation des CD40L fähig, sowohl das innate als auch das adaptive Abwehrsystem zu aktivieren. So induzieren sie einerseits über die CD40L-CD40-Ligation die Reifung von dendritischen Zellen, den Isotypswitch von B- zu Plasmazellen und verstärken die T-Zellfunktionen. Andererseits werden die Thrombozyten auch durch die ebenfalls CD40L-exprimierenden Leukozyten aktiviert, wiederum mit Verstärkung des Entzündungsprozesses (Elzey et al., 2003). Angesichts der hohen Anzahl von Plättchen und ihrer großflächigen Verteilung im Körper über die Blutbahn befinden sie sich direkt vor Ort und können - verglichen mit Leukozyten - schon in einem sehr viel früheren Stadium einer Entzündung/Infektion durch eine massive Chemokinproduktion die T-Zell-Rekrutierung vermitteln (Danese et al., 2004).

Über P-Selektin wird ebenfalls eine Verbindung zur innaten Immunabwehr und auch zur Tumormetastasierung vermittelt; den entsprechenden Liganden (PSGL-1, P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) tragen Monozyten und PMNs (Polymorphonukleare Neutrophile). Außer mit der α -Granula-Sekretion wird P-Selektin auch aus aktivierten Endothelzellen mit der Freisetzung der Weibel-Palade-Körperchen an deren Zelloberfläche transloziert (Chen und Geng, 2006). Aus aktivierten Plättchen und Leukozyten entstehen über die P-Selektin-PSGL-1-Verbindung heterotypische Aggregate; ebenso aus Tumorzellen und Blutplättchen, wobei der entsprechende Ligand auf den Tumorzellen für das P-Selektin noch nicht bekannt ist. Diese Thromben, in denen die Tumorzellen vor dem Immunsystem geschützt sind, bleiben aufgrund ihres Durchmessers in den Kapillaren hängen, so dass die Tumorzellen leichter mit dem lokalen Endothel in Kontakt treten können, um darauffolgend ins umgebende Gewebe zu migrieren. Die aktivierten Thrombozyten und Leukozyten setzen in den Thromben Zytokine und Wachstumsfaktoren frei und fördern somit das Wachstum und

die Zellteilung der Tumorzellen (Kim et al., 1998). Obwohl sie kernlos sind, können Thrombozyten aktivierungsabhängig mit Hilfe der mRNA aus den Megakaryozyten auch selbst immunmodulatorische Proteine synthetisieren und damit den Entzündungsprozess verstärken, wie z. B. IL-1 β , welches das Endothel aktiviert (Lindemann et al., 2001).

Die Rekrutierung von Leukozyten, das heißt Monozyten und PMNs, aus dem Blutstrom in einen Thrombus über die Ligation des thrombozytären P-Selektins mit dem leukozytären PSGL-1 resultiert in der Aktivierung und TF-Expression der Monozyten. Diese prokoagulante Membranoberfläche führt wiederum zur Aktivierungsverstärkung der Plättchen. Neben dem thrombozytären P-Selektin können auch Endotoxine, Immunkomplexe und bestimmte Zytokine die TF-Expression auf Monozyten induzieren. An Endothelzellen induzieren bestimmte Zytokine (Celi et al., 1994), Thrombin (Ostrovsky et al., 1998) und die Invasion von Bakterien die TF-Expression (Veltrop et al., 1999). Mit der Rekrutierung der Leukozyten in ein Plättchenaggregat wird gleichzeitig eine Entzündung initiiert, da die aktivierten Leukozyten verschiedene Zytokine für Entzündungs- und Wundheilungsprozesse freisetzen (Celi et al., 1994). Pitchford et al. haben 2005 nachgewiesen, dass bei chronischen Entzündungsprozessen und Tumormetastasierungen das thrombozytäre P-Selektin für die Rekrutierung der PSGL-1-tragenden Zellen essenziell ist, während das endotheliale P-Selektin eine sekundäre Rolle spielt (Pitchford et al., 2005). Thrombozyten und Leukozyten sammeln sich im physiologischen laminaren Blutfluss als marginaler Pool an der Gefäßwand an und können im Falle einer Verletzung oder Entzündung sofort am Ort des Geschehens agieren. Eine Kollision der Leukozyten mit dem thrombozytären P-Selektin ist somit viel wahrscheinlicher als eine mit dem endothelialen.

Ähnlich den Leukozyten, ist es den Thrombozyten durch Bindung des PSGL-1 an endotheliales P-Selektin möglich, am Endothel entlang zu rollen. Aktivierungsabhängig wird PSGL-1 in vermehrter Zahl an der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Außerdem kann auch das GPIIb α der Plättchen mit dem endothelialen P-Selektin interagieren (Frenette et al., 2000). Das Rollen der Thrombozyten und die Bindung der Leukozyten über PSGL-1 an das thrombozytäre P-Selektin vermittelt ihnen eine lockere Adhäsion am Gefäßendothel. Eine feste Adhäsion der Leukozyten kommt dagegen über β_1 - und β_2 -Integrine (s. u.) zustande. Daraus schließen Pitchford et al., dass diese plättchenvermittelte Bindung an das Endothel in Abhängigkeit von P-Selektin für die Transmigration der Leukozyten ins entzündete Gewebe essenziell ist, besonders dann, wenn ein hoher Scherstress in dem Gefäß herrscht (Pitchford et al., 2005). Die Plättchen, die an die Leukozyten gebunden sind, werden mit ins entzündete Gewebe getragen und modulieren dort die Funktion der Abwehrzellen durch die Freisetzung ihrer Zytokine (Jurk et al., 2005).

Vor allem Monozyten und Neutrophile sind es, die an das Endothel rekrutiert werden, um aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe zu transmigrieren und dort sowohl Gewebetrümmer

als auch Pathogene zu phagozytieren, bzw. zu bekämpfen. Während P-Selektin nur eine lockere Adhäsion der Neutrophilen und Monozyten an die Endothelzellen vermittelt, sind für die Aktivierung dieser Zellen PAF oder PAF-ähnliche Lipide notwendig, z. B. Eicosanoide wie TxA_2 . Diese werden von PAF-Rezeptoren erkannt, die auf Thrombozyten, Monozyten und Neutrophilen vorhanden sind (Zimmermann et al., 2002). Bei einer Entzündung im Gewebe setzen Gewebezellen Entzündungsmediatoren frei, z. B. Mastzellen das Histamin, welches die Aktivierung der Endothelzellen mit der Freisetzung des PAF in diesem Gebiet hervorruft. Dieser wird genauso wie P-Selektin nur aus aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen mit der Sekretion der α -Granula, bzw. der Weibel-Palade-Körperchen freigesetzt. Die Thrombozyten lokalisieren die Leukozyten über die P-Selektin-Ligation in der direkten Nähe des freigesetzten PAF am Endothel, der durch Bindung an die PAF-Rezeptoren auf den Leukozyten die Expression von β_1 - und β_2 -Integrinen für eine feste Bindung am Endothel induziert. Ebenso kann ein am Endothel adhärentes Monolayer aus aktivierten Plättchen, mit dem exprimierten P-Selektin und dem freigesetzten PAF, als Adhäsionssubstrat für Leukozyten dienen. Die β_2 -Integrine der Leukozyten binden an GPIIb/IIIa der Plättchen und an ICAM-1 der Endothelzellen; die β_1 -Integrine der Leukozyten vermitteln eine feste Bindung an VCAM-1 der Endothelzellen. Zusätzlich verstärkt TxA_2 über TP-Rezeptoren die Aktivierung von Endothelzellen und Thrombozyten mit deren Expression von ICAM-1, bzw. GPIIb/IIIa (Ostrovsky et al., 1998; Zarbock et al., 2006). Eine zusätzliche Bindung der Plättchen an Endothelzellen findet über thrombozytäres GPIIb/IIIa statt, welches über vWF-, TSP-1- oder Fibronectin-Brücken mit endothelialen Rezeptoren verbunden ist (GPIIb und $\alpha_V\beta_3$ -Integrine) (Bombeli et al., 1998). Zu der reversiblen Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten über P-Selektin und PSGL-1 entsteht zusätzlich eine feste Bindung über ICAM-2 auf den Thrombozyten und β_2 -Integrinen auf den Leukozyten (Diacovo, T.G. et al., 1994).

I.3.2 Thrombozyten in der Infektion

Thrombozyten haben zahlreiche funktionale Eigenschaften, die für eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr sprechen. Unter anderem gehört dazu die Expression von "toll-like-receptors" (TLRs), Fc- und Komplement-Rezeptoren, die Synthese und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen infolge eines Pathogenkontakts und die Freisetzung von „platelet derived microbicidal proteins“ (PMPs) (s. u.).

Mit Hilfe der TLRs haben die Thrombozyten, genauso wie Makrophagen und Neutrophile, die Fähigkeit, direkt mit Pathogenen zu interagieren (Cognasse et al., 2005). Die TLRs gehören mit dem CD14-Rezeptor oder der Familie der „peptidoglykan recognition proteins (PGRPs)“ zu den „pattern recognition receptors“ (PRRs); mit deren Hilfe kann die angeborene

Immunabwehr zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ differenzieren. Sie binden ein großes Repertoire an natürlich vorkommenden repetitiven molekularen Strukturen, sogenannten „pathogen associated molecular patterns (PAMPs)“, wie das Peptidoglykan der Gram-positiven Bakterien oder das Lipopolysaccharid der Gram-negativen. Das angeborene Immunsystem basiert auf der Erkennung dieser PAMPs, im Gegensatz zum spezifischen Immunsystem, welches auf die spezifische Antikörperbildung angewiesen ist. Parallel zu den PRRs erkennt auch TSP-1 - das wichtigste endogene Lektin der Blutplättchen - das Peptidoglykan der Gram-positiven Bakterien, wenn TSP-1 an Wirtszellen gebunden ist. Es vermittelt sowohl die Assoziation zwischen Gram-positiven Bakterien (z. B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) und Blutplättchen, als auch die Adhäsion und Invasion solcher an bzw. in Endothel- und Epithelzellen. Somit bekommt TSP-1 eine essenzielle Bedeutung für die Kolonisierung des Wirtsgewebes (Rennemeier et al., 2007).

Die PMPs - auch als Thrombicidine bezeichnet - gehören zur großen Gruppe der „Cationic Antimicrobial Peptides“ (CAMPs), die außerdem noch durch die α - und β -Defensine (in verschiedenen Geweben und Neutrophilen) und durch die Cathlecidine (auf Epithelien und in Neutrophilen) ergänzt wird. Sie entstehen durch proteolytische Spaltung aus Chemokinen, und viele von ihnen besitzen auch noch eine chemoattraktive Wirkung auf Leukozyten. Zu den PMPs gehören unter anderem FP-A, FP-B, T β -4 und PF-4. Sie werden nach einer Aktivierung der Plättchen aus den α -Granula freigesetzt, z. B. nach Pathogenkontakt oder Thrombinstimulation (Kehrel und Jurk, 2004; Peschel, 2002).

Das notwendige Thrombin wird dann gebildet, wenn TF auf aktivierten Monozyten oder auf aktivierten Endothelzellen infolge einer Entzündung (Celi et al., 1994) oder infolge einer mikrobiellen Kolonisierung des Endothels exprimiert wird (Veltrop et al., 1999). Bei einer Gefäßwandschädigung wird der auf subendothelial gelegenen Fibroblasten vorhandene TF freigelegt (Hoffman und Monroe, 2001).

Zu den antibakteriellen Mechanismen der PMPs wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, zu denen unter anderem die Depolarisation der normalerweise negativ geladenen Außenseite der Bakterienmembran gehört, die Aktivierung von Hydrolasen, welche die Bakterienzellwand angreifen, die Störung der Membranfunktion durch Veränderung der Lipidanordnung in dieser und die Porenbildung, welche zur Zellyse führt (Zasloff, 2002).

Neben den TLRs und den Fc-Rezeptoren für die Interaktion mit Pathogenen bzw. Immunkomplexen und neben der Freisetzung von PMPs, besitzen Thrombozyten auch zytotoxische Fähigkeiten, die von der direkten Bindung der Bakterien an Plättchen abhängig sind, jedoch unabhängig von der Granulasekretion. Das Vorkommen von gewellter Plättchenmembran an der Stelle des Bakterienkontaktes liefert hier eine mögliche Erklärung:

Diese kennt man eigentlich von Osteoclasten und Neutrophilen als lokale Reorganisation der Membran durch Aktinpolymerisation. Dort wird ein NADPH-Oxidase-Komplex gebildet, so dass diese Zellen lokal große Mengen an zytotoxischen „oxygen free radicals“ (OFRs) produzieren und freisetzen können. Die von Osteoclasten freigesetzten OFRs dienen dem Abbau der Knochenmatrix und Neutrophile töten damit Pathogene ab. Demnach besitzen also ebenfalls die Plättchen die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffverbindungen freizusetzen, die auch bekannt ist in Verbindung mit der IgE-vermittelten Abtötung von Parasiten durch Plättchen (Klinger und Ulbricht, 2003).

Parasitäre Pathogene werden durch IgE-Antikörper (IgE-Ak) opsoniert und dann über diese an Fc ϵ -Rezeptoren auf Makrophagen und Neutrophilen gebunden. Auch auf Thrombozyten hat man Fc ϵ -I- und Fc ϵ -II-Rezeptoren nachgewiesen, an die IgE-Ak binden. Bei der Thrombozyten-vermittelten Abtötung von Parasiten sind IgE-Ak beteiligt, die sich schon sehr früh während der ersten Infektion in der Zirkulation befinden und auch nur für kurze Zeit persistieren. Diese töten die Parasiten auch unabhängig von Spezies oder Stadium ab (z. B. *Shistosoma mansoni*, *Toxoplasma gondii*). Dagegen sind die IgE-Ak, welche die Makrophagen- und Neutrophilenadhärenz an Parasiten vermitteln, erst bei einer Sekundärinfektion vorhanden, persistieren lange über die Zeit der Infektion hinaus und töten Parasiten spezies- und stadiumspezifisch ab. Daraus folgt die Vermutung, dass die Parasiten Antigene besitzen, die stadium- und speziesunabhängig vorhanden sind, und andere Antigene, die spezifisch auftreten und das adaptive Immunsystem stimulieren. Über die Fc ϵ -Rezeptoren werden die Plättchen aktiviert, setzen OFRs frei, und darauf folgt, genauso wie bei den Bakterien, eine Aggregation der Plättchen mit Sequestration der Parasiten (Haque et al., 1985).

Verschiedene pathogene Pilzarten (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Candida spp.*) interagieren direkt mit den Plättchen und werden von diesen umhüllt. Dabei führen der Kontakt und die Bindung zu/an Konidien und Hyphen zur Aktivierung der Plättchen mit Granulasekretion und Aggregation. Konidien von *Aspergillus* interagieren mit Fibrinogen, so dass dieses wahrscheinlich eine vermittelnde Funktion bei der Plättchenbindung an *Aspergillus* hat, wie es ebenfalls bei *Candida albicans* bekannt ist. Den Granulainhaltsstoffen, Serotonin und den PMPs, werden ebenfalls antifungale Eigenschaften zugesprochen. An verschiedenen Merkmalen lässt sich festmachen, dass die Plättchen die Virulenz der Fungi attenuieren, wie z. B. an der Verminderung der Galaktomannanfreisetzung und an der reduzierten Hyphenverlängerung. Außerdem werden die Fungi mit Hilfe von Plättchen opsoniert, so dass diese den Neutrophilen beim Abtöten der Pilze assistieren (Perkhofer et al., 2008; Christin et al., 1998).

Viren, z. B. *Herpes*-, *Influenza*- und *HI*-Viren, binden an spezifische Glykoproteine auf Plättchen und können durch diese phagozytiert werden, mit anschließender Antigen-

Präsentation auf deren Oberfläche (Youssefian et al., 2002). Crombie et al. zeigten, dass TSP-1 (hauptsächlich aus aktivierten Plättchen freigesetzt) eine hemmende Wirkung auf die Ausbreitung von HIV-1 hat (Crombie et al., 1998). Es erkennt und bindet an das Glykoprotein gp 120 in der HIV-Hülle, welches ebenfalls die Bindungsstelle für CD4-T-Lymphozyten ist, so dass die Bindung des Virus an die T-Zellen kompetitiv gehemmt wird. Außerdem vermitteln zwei weitere Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche die Bindung und Internalisierung von HIV-1: das Lektin DC-SIGN (dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) und das CLEC-2 (c-type lectin-like receptor 2). HIV-1, welches über diese Rezeptoren an Plättchen gebunden ist, bleibt über längere Zeit infektiös, wird so in der Blutbahn verteilt und kann den CD4-tragenden Zellen präsentiert werden, die den Viruseintritt zulassen (Chaipan et al., 2006).

Die Zytotoxizität der Thrombozyten wird auch über das Komplementsystem vermittelt. An der klassischen Komplementaktivierung sind sie beteiligt, indem sie Rezeptoren für verschiedene Komplementfaktoren besitzen, z. B. cC1q-R und gC1q-R für C1q. Durch die Bindung von C1q an gC1q-R auf den Plättchen werden diese aktiviert, mit nachfolgender Granulasekretion und Expression von Adhäsionsmolekülen (CD62P) und noch stärkerer Expression von gC1q-R, welcher auf ruhenden Plättchen, ebenso wie auf Endothelzellen, nur in geringer Anzahl vorhanden ist. GC1q-R interagiert mit einer Vielzahl von sowohl zellulären, bakteriellen und viralen Proteinen, als auch mit Plasmaproteinen. So kann z. B. Fibrinogen über gC1q-R an entzündete Endothelzellen oder aktivierte Plättchen binden und die Adhäsion von *S. aureus* über dessen fibrinogen- und fibronectinbindenden Proteine (siehe Kap. *S. aureus*) vermitteln (Peerschke et al., 2003; Sjöbring et al., 2002).

Auch mit Hilfe von Protein A kann *S. aureus* über gC1q-R an Thrombozyten oder auch an die Endotheloberfläche binden. So können auch die Thrombozyten *S. aureus* durch diese Interaktionen am Endothel lokalisieren bzw. bei ihrer Aktivierung in einen Thrombus integrieren. So ist diese zusätzliche Bindungsmöglichkeit von Protein A an gC1q-R, kompetitiv zur IgG-Bindung, ein wichtiger Virulenzfaktor für *S. aureus*, zum Beispiel in der Etablierung einer infektiösen Endokarditis (IE). Denn *S. aureus* kann auf diese Weise die Wirtsabwehr reduzieren, da Protein A mit seiner IgG-Bindungsstelle schon an gC1q-R gebunden ist (Nguyen et al., 2000).

Hartleib et al. bewiesen zudem, dass Protein A an vWF bindet und somit *S. aureus* über diese Interaktion an das Endothel und an Thrombozyten lokalisiert - über GPIIb/IIIa am Endothel und über GPIIb/IIIa und GPIb/V/IX an den Plättchen.

Thrombozyten sind auch in die alternative Komplementaktivierung eingebunden. Aus den dichten Granula setzen sie Ca^{2+} und ATP frei, die für die Phosphorylierungen von C3 durch die thrombozytäre Casein-Kinase notwendig sind. Diese Phosphorylierungen führen sowohl zu einer vermehrten Bindung von C3b an Immunkomplexe und an „complement receptor

type 1“ auf Erythrozyten, PMNs und Monozyten, als auch zu einer verminderten Spaltung von C3b zu iC3b (Nilsson-Ekdahl und Nilsson, 2001).

Hänsch et al. haben nachgewiesen, dass das bei der oben genannten Phosphorylierung entstandene C3b auf der Plättchenoberfläche die Bildung des „membrane attack complex“ anstößt, der dann in die Plättchenmembran eingefügt wird und eine Aktivierung und Lyse der Plättchen auslöst (Hänsch et al., 1985).

Andererseits enthält die Plättchenmembran verschiedene Proteine, die diese gegen das Komplementsystem schützen, sogenannte „lysis proteins regulating factors“ (unter anderem C8bp, MIRL, DAF) (Spycher und Nydegger, 1995).

Generell vermitteln die Thrombozyten als Teilhaber der angeborenen Immunabwehr zwei widersprüchliche Effekte:

Einerseits werden die Plättchen wie oben beschrieben durch Bakterien, Pilze und Parasiten aktiviert, wodurch die Keime in Thromben sequestriert, also aus der Zirkulation entfernt und unschädlich gemacht werden. Andererseits heißt das aber auch, dass die Keime in den Thromben vor dem Immunsystem und keimabtötenden Medikamenten geschützt sind, so dass sich eine persistierende Bakteriämie entwickeln kann. Außerdem bilden Plättchenaggregate mit dem auf ihnen gebundenen Fibrin ein adhäsives Substrat, über das die bakterielle Kolonisation des geschädigten Endothels erleichtert wird.

Angesichts der Tatsache, dass die Thrombozyten PMPs und reaktive Sauerstoffmoleküle freisetzen und die Keime an ihrer Oberfläche binden, so dass diese Substanzen die Keime effektiv abtöten können, ist die Funktion der Blutplättchen im Ganzen betrachtet doch eher als abwehrverstärkend zu sehen (Klinger und Ulbricht, 2003).

I.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus gehört zur Familie der Micrococcaceae, und es sind neben *S. aureus* noch 31 weitere Spezies der Gattung *Staphylococcus* bekannt. In der Regel sind sie fakultativ pathogen und viele von ihnen besiedeln als Kommensalen die Haut und die Schleimhäute des Nasopharynx bei Menschen und Tieren. Einige pathogene Staphylokokken besitzen die Eigenschaft, Koagulase zu produzieren. Zu diesen gehören *S. aureus*, *S. intermedius* und *S. hyicus* (variabel) (Harris et al. 2002).

Veterinärmedizinisch in erster Linie relevant sind *S. aureus* (z. B. Wundinfektionen, Mastitiden, Pyodermien und Arthritiden bei verschiedenen Tieren), *S. intermedius* (Pyodermien und Otitiden bei Hunden und Katzen) und *S. hyicus* (Pyodermien und Arthritiden bei Schweinen) (Songer und Post, 2005). Beim Menschen haben vor allem *S. aureus* und *S. epidermidis* eine medizinische Relevanz (Harris et al., 2002). Von Eiff et al. publizierten 2001, dass die Besiedelung der nasalen Schleimhäute mit *S. aureus* (bei mind. 60% der Bevölkerung) das Risiko für eine Bakteriämie nach einem operativen Eingriff stark erhöht (von Eiff et al., 2001). Eine infektiöse Endokarditis (IE) kann die Folge davon sein; sie gehört mit zu den gefürchtetsten Erkrankungen, die durch *S. aureus* als Hauptpathogen verursacht werden (31,4% werden beim Menschen durch *S. aureus* verursacht, davon 40% durch MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*)) (Fowler et al., 2005). Middleton et al. haben 2005 bei 14% von *S. aureus*-infizierten Patienten verschiedener Tierarten eine MRSA-Besiedelung nachgewiesen (Middleton et al., 2005).

Matthew W. Miller berichtete im „Journal of Veterinary Cardiology“, dass Infektionen des Endokards bei Hunden und Katzen zwar eher selten vorkommen (Prävalenz bei Hunden 0,11-0,58%, bei Katzen 0,006-0,018%), aber dass manifeste Infektionen dann auch mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden sind. Prädisponiert scheinen ältere und männliche Tiere zu sein, sowie Tiere kleinerer Rassen (Miller et al, 2004). Auch im Zusammenhang mit angeborenen Herzfehlern, die beim Menschen als Risikofaktoren gelten (z.B. ein Ductus arteriosus Botalli oder ein Ventrikelseptumdefekt), wurden Endokarditiden bei Hunden und Katzen beobachtet. Beteiligte Bakterien, die aus dem Blut von erkrankten Tieren kultiviert wurden, sind vor allem Streptokokken, Staphylokokken und *Escherichia coli*.

Bei Rindern wurden *Arcanobacterium pyogenes*, Streptokokken und einige Enterobacteriaceae aus dem Blut isoliert. Auch hier sind Mastitiden, Metritiden, Leberabszesse oder eine Fremdkörperperikarditis Lokalinfektionen, die eine IE initiieren können (Maillard et al., 2007). Bei Pferden wird dagegen *Actinobacillus equuli* als Haupterreger genannt, der als Kommensale auf den oropharyngealen Schleimhäuten vorkommt und besonders bei neugeborenen Fohlen Septikämien und Endokarditiden auslösen kann (Ashhurst-Smith et al., 1998). Melissa Trogdon Hines et al. vermuten

außerdem, dass das Pferd in ihrem Fallbericht ausgehend von einer Infektion mit *Streptococcus equi* eine IE entwickelte (Trogon Hines et al., 1993).

I.4.1 Entstehung einer IE durch *S. aureus*

Einer IE geht grundsätzlich eine transiente oder permanente Bakteriämie voraus; prädisponierende Faktoren dafür sind postoperative Wundinfektionen, Venenverweilkatheter, eine Immunsuppression und Stomatitiden/Gingivitiden mit entsprechenden Zahnbehandlungen. Für den Menschen stellen künstliche Herzklappen (Fowler et al., 2005) mit das größte Risiko für eine IE dar, neben den bereits für die Veterinärmedizin genannten Faktoren. Ein zweiter, aber nicht zwingend notwendiger Faktor ist in der Regel ein Endothelschaden oder eine Endothelentzündung, welche die Entstehung einer IE stark begünstigen. Ein Endothelschaden kann z. B. durch eine Katheterisierung hervorgerufen werden, aber auch durch Turbulenzen im Blutfluss (Miller et al., 2004).

Bei der Entstehung einer Endokarditis erfolgt zunächst eine Aktivierung der Plättchen, entweder durch das entzündete oder geschädigte Endothel oder aber durch eine direkte Interaktion der Thrombozyten mit den Bakterien, die durch bakterielle Adhäsine, Immunglobuline und Plasma-, bzw. Matrixproteine vermittelt wird (Fitzgerald et al., 2006). Vor allem Gram-positive Bakterien, wie Staphylokokken und Streptokokken, erkennen und binden mit Hilfe von Adhäsinen, den sogenannten MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), spezifisch an Wirtsproteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Vitronectin und Kollagen (Rennemeier et al., 2007). Zu den MSCRAMMs gehören unter anderem die „Fibronectin binding Proteins A and B“ (FnBPA, FnBPB) und die Fibrinogen-bindenden Proteine „Clumping Factor A and B“ (ClfA, ClfB) (Patti et al., 1994).

S. aureus setzt außerdem noch lösliche Adhäsine frei, die sogenannten SERAMs (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules), und bindet auch über diese an Proteine der extrazellulären Matrix (Chavakis et al., 2005; siehe Kap. I.5).

Zunächst hüllen sich die Bakterien über diese Adhäsine mit vielen im Plasma gelösten Fibrinogen-/Fibronectinmolekülen ein und interagieren über diese mit den GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf ruhenden Plättchen. Vor allem die FnBPs vermitteln eine Interaktion zwischen den Bakterien und Plättchen mit deren Aktivierung als Folge, so dass diese Adhäsine auch entscheidende Virulenzfaktoren für die Entstehung einer IE darstellen.

Für diese Art der Plättchenaktivierung ist allerdings zusätzlich ein spezifischer Antikörper (IgG) notwendig, der die FnBPs erkennt und eine Querverbindung zum FcγRIIIa-Rezeptor

herstellt; auch Clf A und Clf B benötigen Fibrinogen und Clf-spezifische AK für die Plättchenstimulation.

„Staphylococcal Protein A“ (SPA), als weiteres Oberflächenprotein von *S. aureus*, ist ebenfalls ein wichtiger Mediator für die Plättchenaktivierung durch *S. aureus*, besonders bei hohem Scherstress; SPA bindet mit hoher Affinität an die A1 Domäne des vWF und vermittelt so die Bindung von *S. aureus* am GPIb der Plättchen (Fitzgerald et al., 2006).

Am geschädigten Endothel wirkt die subendotheliale Matrix mit dem TF als prokoagulante Oberfläche, an der die Plättchen über Fibrinogen- und Fibronectinbrücken miteinander aggregieren. Besteht oder entwickelt sich nun parallel eine Bakteriämie, werden die Bakterien über die oben beschriebenen Interaktionsmechanismen direkt in die Aggregate mit eingelagert (Veltrop et al., 1999). Die Bakterien in den Thromben produzieren proteolytische Enzyme und dringen in das unterliegende Gewebe vor, zerstören es und gelangen von dort aus wieder in die Blutbahn oder andere Gewebe (Alston et al., 1997). Sehr oft ist dieser Prozess mit Embolisationen, daraus folgenden Infarkten und metastatischen Infektionen in anderen Organen verbunden (Fowler et al., 2005), vor allem in der Milz und in den Nieren (Miller et al., 2004)

Beim Menschen (Fowler et al., 2005) und bei verschiedenen Haustierarten sind am häufigsten die Mitralklappen und Aortenklappen von diesen Läsionen und der Bakterienkolonisation betroffen. Bei Rindern kommt jedoch am häufigsten die Rechtsherzendokarditis vor, größtenteils mit pathologischen Veränderungen an der Trikuspidalklappe. Als Ursache steht beim Trikuspidaltyp die Einschwemmung von septischen Emboli aus den oben genannten primären Infektionsherden in den rechten Herzraum im Vordergrund (Dahme und Weiss, 2007).

Durch die bakterienbedingte Gewebeerstörung entstehen Deformationen, Perforationen und Rupturen an den Klappensegeln, so dass das Herz keinen effektiven Transport des Blutes mehr gewährleisten kann. Eine Linksherzinsuffizienz resultiert in der Regel in einer pulmonalen Kongestion und einem Lungenödem (Nelson und Couto, 2006), eine Rechtsherzinsuffizienz dagegen durch Rückstauung in das venöse Gefäßsystem des Körperkreislaufs unter anderem in einer chronischen Stauungsleber und einer Aszites (Dahme und Weiss, 2007).

Mit Hilfe von FnBPs kann *S. aureus* aber auch an morphologisch intaktem Endothel anheften, und wie zuvor erwähnt, auch durch TSP-1 (Rennemeier et al., 2007). Die FnBPs von *S. aureus* vermitteln nicht nur die Adhäsion, sondern auch die Invasion der Bakterien in Endothel- und Epithelzellen. Die Fibronectinmoleküle binden dabei an die $\alpha_v\beta_1$ -Integrine, die auf den Wirtszellen im Rahmen einer lokalen Entzündung vermehrt und mit einer höheren Ligandenaffinität exprimiert werden (Sinha et al., 2000). *S. aureus* wird daraufhin von diesen

Zellen internalisiert, und die Endothelzellen exprimieren eine TF-abhängige prokoagulante Aktivität (Veltrop et al., 1999).

Die Langzeitprognose für Tiere mit einer IE ist eher schlecht einzustufen, vor allem wenn eine Volumenüberlastung vorhanden ist und echokardiographisch schon Deformationen an den Klappen nachweisbar sind; eine frühzeitige Diagnose und eine aggressive Antibiotikatherapie können die Prognose begünstigen (Nelson und Couto, 2006).

I.4.2 Bakterielle Persistenzmechanismen

Neben den bekannten Resistenzmechanismen gegenüber verschiedenen antibiotischen Medikamenten besitzen die Staphylokokken auch Resistenzen gegenüber den PMPs der Plättchen; Staphylokokken sollen hier als Beispiel für Gram-positive Bakterien dienen. Die äußere Bakterienmembran bei Gram-negativen bzw. die Zellwand bei Gram-positiven Bakterien sind die effizientesten Abwehrbarrieren der Bakterien. Ihre Empfindlichkeit hängt unter anderem stark von der Oberflächenladung, vom Membranpotenzial und von der Permeabilität der Membran ab, da die Interaktion zwischen den meist positiv geladenen Peptiden und der negativ geladenen Bakterienoberfläche ohne Rezeptoren stattfindet (Matsuzaki et al., 1995). Gram-positive Bakterien besitzen einen großen Anteil an negativ geladenen Phosphatgruppen in den Teichonsäuren der Zellwand, die die Interaktion mit den CAMPs stark begünstigen.

S. aureus kann die Teichonsäuren durch den Einbau von D-Alanin modifizieren, welches eine ungebundene, positiv geladene Aminogruppe besitzt. Damit wird die negative Oberflächenladung von *S. aureus* stärker positiv und wirkt abstoßend auf die CAMPs (Peschel et al., 1999).

Die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Peptiden ist bei der Entstehung einer IE ein limitierender Faktor (Dhawan et al., 1998).

Durch die Invasion in Endothelzellen und die Integration in Thromben wird den Staphylokokken eine vor dem Immunsystem und den Medikamenten geschützte Nische gewährt (Sinha et al., 2000; Veltrop et al., 1999).

Diese vielseitigen Resistenzmechanismen sind effiziente Virulenzfaktoren der Bakterien, die ihnen die Etablierung und Persistenz im Körper ermöglichen. Nicht nur, dass sie die körpereigene Abwehr ins Leere laufen lassen, diese wirkt sich auch noch zusätzlich schädlich auf den Körper aus, obwohl sie eigentlich als Schutzmechanismus gedacht ist. So entstehen oft schwer zu behandelnde, langwierige und rezidivierende Erkrankungen.

Die Tatsache, dass *S. aureus* verschiedene Persistenzmechanismen besitzt und sich so im Wirtsgewebe etablieren kann, findet sich im Klinikalltag bestätigt. Es überrascht also nicht,

dass infektiöse Endokarditiden so schwer zu behandeln sind, da *S. aureus* entweder in den Thromben oder in den Wirtszellen vor den Antibiotika geschützt ist und sich von dort aus immer wieder ausbreiten kann. Auch Rinder mit Mastitiden, die durch *S. aureus* verursacht werden, haben eher eine schlechte therapeutische Prognose, da die Euterentzündung aufgrund dieser Persistenzmechanismen von *S. aureus* in der Regel chronisch rezidivierend verläuft (Sinha et al., 2000; Olson, M.E. et al., 2002).

I.5 Extracellular adherence protein (Eap)

Wie im Kapitel über *Staphylococcus aureus* beschrieben wurde, verursacht dieses Bakterium oftmals ernsthafte, manchmal sogar lebensbedrohliche Infektionen, vor allem, wenn sich die Bakterien aus lokalen Infektionsherden heraus über die Blutbahn ausbreiten. Der erste wichtige Schritt für eine Infektion ist die Interaktion der Keime mit dem Wirtsgewebe und die nachfolgende Bindung an dieses mit Hilfe der Staphylokokken-Adhäsine. Zu diesen Adhäsinen gehören die kovalent an die Zellwand gebundenen Proteine, zuvor bereits als MSCRAMMs erwähnt (FnBPA, FnBPB, ClfA, ClfB), sowie „collagen adhesin“ und „staphylococcal protein A“ (SPA) (Patti, 1994). Neben diesen zellwandgebundenen Proteinen setzt *S. aureus* auch lösliche Adhäsine frei, die keine wirklichen Bindungsstellen auf der Bakterienoberfläche besitzen, aber dennoch mit der Zelloberfläche assoziiert sind (Hansen et al., 2006); sie werden als „Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules“ (SERAMs) bezeichnet. Dazu gehören die Coagulase, die an Fibrinogen und Prothrombin bindet und darauffolgend die Bildung des Staphthrombins und die Fibrinogenspaltung induziert. Das „von Willebrand factor binding protein“ bindet an den vWF, besitzt eine Coagulase-ähnliche Aktivität und interagiert mit Prothrombin. Die Funktionen der letzten beiden Adhäsine bei endovaskulären Infektionen, wie auch die Funktion des „Fibrinogen binding protein A“ sind bisher noch unklar. Das „Extracellular fibrinogen binding protein“ blockiert die Plättchenaggregation, da es an die α -Kette des Fibrinogens bindet. Außerdem bindet es an den Komplement Faktor C3b, so dass die Komplementaktivierung und die komplementvermittelte Phagozytose inhibiert werden. Das „Extracellular matrix binding protein“ bindet an die Matrixproteine Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Kollagen. Ähnlich wie das Extrazelluläre Adhäsionsprotein (Extracellular adherence protein (Eap)) trägt es zwar auf diese Weise zur Adhäsion von *S. aureus* an den EZM-Strukturen bei, allerdings ist seine genaue Funktion noch nicht geklärt. Die SERAMs nutzen ihre adhäsiven Eigenschaften nicht nur, um an die Bakterienzellwand und an extrazelluläre Matrixproteine zu binden, sondern auch, um mit dem Wirtsabwehrsystem und den Plättchen zu interagieren (Chavakis et al., 2005).

Die Vermittlerrolle von Eap bei *S. aureus*-bedingten Infektionen soll im Folgenden ausführlicher erläutert werden. Diese wissenschaftlichen Ergebnisse stellen die Grundlage für die Untersuchungen dieser Dissertation zur Interaktion zwischen Eap und den Thrombozyten dar.

I.5.1 Molekulare Struktur von Eap

Eap ist ein kationisches Protein, dessen Größe je nach *S. aureus* Stamm von ca. 50-70 kDa variiert. Es wird auch als p70 oder Map (MHC-class II analogous protein) bezeichnet. In diesem Molekül kommen ebenfalls stammabhängig fünf bis sechs sogenannte „tandem repeats“ vor, die jeweils eine Eap-Domäne bilden. Sie besitzen jeweils eine β -Faltblatt-Struktur und werden durch „linker regions“ von unbekannter Struktur miteinander verbunden. Über den β -Strängen 1-5 liegt diagonal eine α -Helix, die unterteilt ist in die Abschnitte α_1 und α_2 .

Der Vergleich der Eap-Domänen mit anderen bekannten Strukturen ergab unerwarteterweise, dass die C-terminale Domäne von bakteriellen Superantigenen, genauer Immunotoxine von Gram-positiven Kokken, mit den Eap-Domänen homolog ist. Die Strukturanalyse des Superantigens SEC2 (Staphylococcal Enterotoxin 2), welches an die β -Kette des T-Zell-Rezeptors bindet, ergab, dass es möglicherweise eine Bindungsstelle für SEC2 in der Eap-Domäne gibt. Diese Homologie liefert erste Ansätze für die Strukturanalyse der Eap-Domänen (Geisbrecht et al., 2005). Die Forschungsergebnisse von Hammel et al. zeigen, dass die „loop region“ ein weiteres wichtiges Element in der Eap-Struktur ist. Sie verbindet die Stränge β_5 und β_6 und spielt wahrscheinlich bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle. Außerdem ergaben diese Studien, dass das Molekül in Lösung als Monomer mit 4 Wiederholungssequenzen der Eap-Domänen vorliegt. Das Eap-Molekül präsentiert einige konkave Oberflächenstrukturen, die bei der Ligandenbindung eine wichtige Rolle spielen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass diese Flächen durch zusätzliche Interaktionen zwischen aneinanderliegenden Eap-Modulen zusammengehalten werden (Hammel et al., 2007).

I.5.2 Interaktionen von Eap mit den Wirtsstrukturen und mit der Oberfläche von *S. aureus*

Die „tandem repeats“ verleihen dem Eap-Molekül seine charakteristische und wichtige Eigenschaft, an extrazelluläre Matrix- und Plasmaproteine zu binden (Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, TSP-1, Prothrombin, Sialoprotein im Knochengewebe und Kollagen). Dabei binden die Eap-Domänen spezifisch, aber - trotz deren großer Sequenzähnlichkeit - mit stark unterschiedlichen Affinitäten an diese Proteine.

Die Bindungsbereitschaft von Eap an die extrazelluläre Matrix und an die Plasmaproteine hängt von der molekularen und supramolekularen Zusammenstellung der Matrix ab. Im Kollagen zum Beispiel liegen die bevorzugten Bindungsstellen für Eap in den dreifachen

Helices lokalisiert. Dennoch zeigt Eap unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Kollagentypen. In monomolekularer Form stellt Kollagen Typ I, aber nicht der Typ II, ein Bindungssubstrat dar. Dagegen wird das Kollagen I wiederum nicht von Eap erkannt, wenn es in einem Bündel von Fibrillen eingelagert ist. Verglichen mit den monomeren Proteinen bindet Eap genauso effektiv an Mikrofibrillen mit dem Kollagentyp VI, an das kollagene Netzwerk der Basalmembran, welches den Typ IV enthält, oder an Aggregate, die Fibronectin enthalten. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Bindung von Eap an die extrazelluläre Matrix auf molekularem Niveau relativ undifferenziert erfolgt. Im Gegensatz dazu zeigt Eap nicht dieselbe Bindungsbereitschaft gegenüber einer supramolekularen Struktur, die dieselben Makromoleküle enthält, an deren monomere Form Eap sehr wohl bindet.

Wird die Matrixstruktur mit Hilfe der Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP1) teilweise degradiert, bindet Eap wiederum an diese degradierte Struktur. So kann in Entzündungsreaktionen, wo unter anderem zerstörte Matrixbestandteile durch MMPs degradiert werden, die Adhäsion von *S. aureus* mit Hilfe von Eap begünstigt werden (Hansen et al., 2006).

Diese ausgeprägte Bindungsflexibilität von Eap an die verschiedenen Wirtsproteine und -zellen leistet einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen. Das bakterielle Protein hat dabei eine Vermittlerrolle als Brückenmolekül, indem es ebenfalls auf der Bakterienoberfläche an eine neutrale Phosphatase (NPase) und möglicherweise auch noch an anderen Strukturen der Bakterienzellwand zurückbindet und so das Bakterium direkt am Wirtsgewebe lokalisiert. Ungefähr 80% der NPase sind in der Bakterienzellwand gespeichert, der Rest befindet sich in Lösung und kann ebenfalls mit Eap einen Komplex bilden, der an Matrixproteine bindet (Flock und Flock, 2001).

Wahrscheinlich vermittelt auch die negativ geladene Zelloberfläche durch elektrostatische Interaktionen mit dem kationischen Eap dessen Bindung am Bakterium (Hansen et al., 2006). Die Bindungskapazität der Bakterienoberfläche liegt bei über 50.000 Eap-Molekülen pro Bakterium und ist nur schwer zu sättigen. Beide Tatsachen sprechen eher dafür, dass die Bindung von Eap nicht über spezifische Rezeptoren erfolgt (Flock und Flock, 2001).

Angesichts dessen, dass Eap-Moleküle eine starke Tendenz haben, sich zu Oligomeren zusammenzulagern, führt dies möglicherweise zu einer Vervielfachung der Brückenbildung zum Wirtsgewebe, die die Bindung von *S. aureus* daran noch verstärkt (Palma et al., 1999). Durch die Adhäsion von *S. aureus* wird die Phosphataseaktivität des Eap-NPase-Komplexes in die direkte Nähe der Wirtszelloberflächen gebracht. Diese könnte möglicherweise Prozesse der Bakterienphagozytose bzw. -internalisierung und andere Signalwege in oder auf den Zellen beeinflussen. So werden die eukaryotischen Zelloberflächen auf die

Bakterienadhäsion vorbereitet, wo die einzelnen Komponenten jeweils ihren Beitrag zur Manifestation einer Infektion leisten (Flock und Flock, 2001).

Es ist bewiesen, dass Eap neben der Adhäsion am Wirtsgewebe auch zur Zellinvasion (siehe I.4.1 und s. u.) von *S. aureus* beiträgt. Die Oligomerisierung der Eap-Moleküle und deren Adhäsion an die Bakterienoberfläche führen zur Agglutination von *S. aureus*, so dass die Bakterien in den charakteristischen traubenförmigen Haufen zusammengelagert werden (Palma et al., 1999). Harraghy vermutet in seinem Artikel, dass die Adhäsion an das Wirtsgewebe und die Agglutination von *S. aureus* für die Stabilität der komplexen Bakterienpopulationen während der Kolonisation und Infektion des Gewebes einen wichtigen Beitrag leisten (Harraghy et al., 2003). Die Agglutination und somit auch die Adhäsion an das Wirtsgewebe und folgende Prozesse sind alle konzentrations- und speziesabhängig. Das heißt, je mehr Staphylokokken vorhanden sind, also auch Eap in höherer Konzentration, desto ausgeprägter sind der Oligomerisierungsgrad von Eap und die Adhäsion an die Zellen, wodurch wiederum der Infektionsdruck steigt (Palma et al., 1999).

Der erste Schritt für eine Infektion ist die Adhäsion an das Wirtsgewebe und die Fähigkeit, der Wirtsabwehr durch Internalisierung zu entkommen. Das intrazelluläre Überleben ist dann der zweite wichtige Schritt, um eine persistierende Infektion hervorzurufen (Haggart et al., 2003). Wie bereits in Kapitel I.4.1 „*S. aureus*“ beschrieben, können Staphylokokken in Abhängigkeit von den FnBPs an eukaryotische Zellen binden und auch in diese internalisiert werden (z. B. in Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen).

In Experimenten mit Eap-negativen Mutanten zeigte sich einerseits, dass diese, im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, in gleichem Maße an die Matrixproteine binden konnten. Obwohl Eap selbst an die Matrixproteine bindet, scheint dieses Protein nicht die Adhäsion von *S. aureus* an Flächen zu vermitteln, die mit Fibrinogen oder Fibronectin überzogen sind, sondern dies geschieht in Abhängigkeit von den FnBPs (Chavakis et al., 2002; Hussain et al., 2002).

Was allerdings die Zellinvasion und -adhäsion von *S. aureus* in und an Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen betrifft, ist Eap sogar in sehr großem Maße involviert. Ein Versuch mit FnBP-negativen Mutanten zeigte, dass diese trotzdem, wenn auch in geringerem Maße, internalisiert, bzw. gebunden werden konnten, welches die Beteiligung weiterer Elemente neben den FnBPs indiziert. Außerdem ist die Zellinvasion und -adhäsion von Eap-negativen Mutanten in oben genannte Zellen sehr viel stärker reduziert und kann durch externe Zugabe von Eap wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse belegen die Abhängigkeit von Eap bei diesem Prozess, gleichzeitig aber auch die Unabhängigkeit von der endogenen Eap-Synthese. Weiterhin wurde die Internalisierung von *S. aureus* in eukaryotische Zellen durch anti-Eap-Antikörper blockiert. Dagegen konnten Antikörper gegen FnBPs die Zellinvasion nicht inhibieren.

In den Experimenten mit *S. aureus* zeigte sich also, dass die Internalisierung von der Anwesenheit mindestens eines der Proteine, Eap oder FnBP, abhängt, und dass die Abwesenheit von beiden die Internalisierung komplett hemmt.

Zusammenfassend kann man also die Eigenschaften der SERAMs als komplementierend und additiv zu denen der MSCRAMMs ansehen, wobei der Internalisierungsprozess eher kritisch von den SERAMs beeinflusst wird, wie durch die Antikörperversuche deutlich wird (Haggar et al., 2003; Hussain et al. 2002).

Für die Adhäsion von *S. aureus* an Endothelzellen haben Chavakis et al. mit ihren Ergebnissen die Beteiligung von ICAM-1 bewiesen (Chavakis et al., 2002).

Auf den Fibroblasten und Epithelzellen ist genauso wie auf aktivierten Endothelzellen ICAM-1 vorhanden, jedoch konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob ICAM-1 auch an diesen Zellen für die Eap-vermittelte Bindung und Internalisierung von *S. aureus* verantwortlich ist (Harraghy et al., 2003).

Proteine, die bei anderen Bakterien die Invasion in eukaryotische Zellen vermitteln, sind zum Beispiel bei *Listeria monocytogenes* die Internaline A und B und bei *Sc. pyogenes* F1, M1 und M6. Dabei ist Internalin B nicht nur mit der Zelloberfläche assoziiert, sondern kommt auch im Überstand der Bakterienkultur vor, analog zu Eap in einer *S. aureus*-Kultur.

Außerdem exprimiert auch *Enterococcus faecalis*, genauso wie *S. aureus*, eine oberflächenassoziierte Substanz, die zur Aggregation der Bakterien führt und damit auch die Internalisierungsrate in die Darmepithelzellen erhöht (Haggar et al., 2003).

Da Eap nur von *S. aureus* gebildet wird, stellt das entsprechende Gen ein vielversprechendes Ziel für diagnostischen Zwecke dar. Die herkömmlichen diagnostischen Methoden, die auf phenotypischen, biochemischen oder immunologischen Eigenschaften des Bakteriums basieren, weisen eine nur unbefriedigende Sensitivität und Spezifität auf. Zudem benötigt man für diese oft eine über mehrere Tage dauernde Kultivierungs- und Untersuchungszeit. Dagegen bietet eine für das Eap-Gen spezifisch entwickelte PCR-Diagnostik auf der molekularen Basis eine Sensitivität und Spezifität von 100%, sowie Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit (Hussain, 2008).

I.5.3 Eap als entzündungs- und immunmodulierender Faktor

In seiner Interaktion mit dem Wirtsgewebe vermittelt das bakterielle Protein nicht nur die Adhäsion, sondern beeinflusst auch immunologische und entzündliche Prozesse im Körper, was im Folgenden erläutert werden soll.

Haggar et al. haben 2005 nachgewiesen, dass Eap die T-Zellproliferation moduliert. Durch eine niedrige Eap-Konzentration wird die Proliferation der PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) stimuliert. Diese synthetisieren nach einem Eap-Kontakt IL-4, welches die Differenzierung von unreifen Th-Zellen zu Th₂-Zellen induziert. Außerdem wird IL-4 nach der Bindung an den T-Zellrezeptor auch von den Th₂-Zellen freigesetzt, welches die Proliferation, den Klassenwechsel der B- zu Plasmazellen und damit die Produktion spezifischer Antikörper induziert. Ob die T-Zellproliferation auf der Ähnlichkeit des Eaps zu bakteriellen Superantigenen basiert, welche an die β -Kette eines T-Zellrezeptors binden, oder ob dieser Effekt durch die Bindung von Eap an ICAM-1 - exprimiert auf verschiedenen Immunzellen - begründet ist, vielleicht auch durch beides, ist bisher nicht bekannt.

Ein hemmender Effekt wird dagegen durch eine hohe Konzentration an Eap erzeugt, welche die Proliferation der unreifen Th-Zellen bei hypersensitiven Reaktionen vom verzögerten Typ gegenüber einem Antigen inhibiert. Diese Immunreaktion wird durch Th₁-Zellen vermittelt, welche die antigenpräsentierenden Makrophagen durch IFN- γ -Sekretion stimulieren, freie Bakterien zu phagozytieren und zytotoxische Substanzen freizusetzen, so dass infizierte Zellen und freie Bakterien abgetötet werden. Durch die Hemmung der Th₁-Zellproliferation und die Stimulation der humoralen Abwehr gerät das immunologische System aus dem Gleichgewicht. Mit der stark reduzierten oder ausbleibenden zellulären Immunabwehr wird das extra- und intrazelluläre Überleben von *S. aureus* begünstigt, da infizierte Zellen und freie Bakterien aufgrund der fehlenden Phagozytose und zytotoxischen Effekte nicht eliminiert werden können (Haggar et al., 2005; Chavakis et al., 2005).

Im Gegensatz zur Adhäsion, Zellinvasion und Agglutination, für die das komplette Eap-Molekül oder zumindest mehr als eine Eap-Domäne notwendig ist, reicht für den Proliferationsstimulus, bzw. für die Hemmung nur ein „tandem-repeat“ des Eap-Moleküls aus (Hussain et al., 2008).

Als eine unmittelbare Reaktion auf eine bakterielle Infektion oder Gefäßverletzung werden Endothelzellen aktiviert, die daraufhin unter anderem die Adhäsionsrezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren. Wie in I.3.1 beschrieben, rollen die Leukozyten mit Hilfe von P-Selektin am aktivierten Endothel und gehen im Folgenden über die leukozytären β_2 -Integrine (Mac-1 und LFA-1) und das endotheliale ICAM-1 eine feste Bindung ein; über das VLA-4 (β_1 -Integrin) wird die Adhäsion von Leukozyten am VCAM-1 des Endothels vermittelt, worauf Eap allerdings keinen Einfluss hat (Interaktion zwischen Eap und ICAM-1 s. u.).

Auch bezüglich dieses Abschnitts der zellulären Abwehr besitzt Eap einen hemmenden Einfluss. Es bindet hier an das ICAM-1 der aktivierten Endothelzellen, wenn es sich im Rahmen einer Bakteriämie in der Blutbahn befindet. Wie bereits erwähnt ist das ICAM-1 allerdings essenziell für die Adhäsion und folgende Transmigration der Leukozyten in

entzündetes Gewebe. Bei einer akuten infektiösen Peritonitis zum Beispiel verminderte die externe Zugabe von isoliertem Eap die Rekrutierung der Neutrophilen um das Zwei- bis Dreifache. Auch aufgrund dieser Interaktion von Eap können sich durch die geschwächte oder ausbleibende zelluläre Immunabwehr Infektionen chronisch manifestieren, wie zum Beispiel Arthritiden (Chavakis, et al. 2002; Haggart et al., 2004).

Analog zu Chavakis kam auch Xie zu dem Ergebnis, dass Eap die Leukozyten-Rekrutierung stark reduziert. Allerdings konnte dieser im Gegensatz zum vorigen einen Schutzmechanismus durch die Eap-blockierte Leukozytenbindung nachweisen. Eap reduzierte sowohl die Adhäsion als auch die Transmigration von Makrophagen und T-Zellen. Dadurch konnte es die Entstehung einer experimentellen autoimmunvermittelten Enzephalomyelitis (EAE) verhindern bzw. eine bestehende ZNS-Entzündung zurückdrängen und die klinischen Symptome fast komplett aufheben. Der inhibierende Effekt reicht sogar über die Eap-Gabe hinaus; selbst nach Absetzen des Proteins wird das Fortschreiten der Erkrankung weiter unterdrückt. Somit bieten die Eigenschaften von Eap vielversprechende Aussichten, dass es in Zukunft möglicherweise für therapeutische Zwecke genutzt werden könnte (Xie, 2006).

I.5.4 Eap interferiert mit Metastasevorgängen und Wundheilungsmechanismen

Neben seinen entzündungs- und immunmodulierenden Effekten greift das bakterielle Protein auf unterschiedliche Weise auch noch in andere pathologische Prozesse ein.

Ein weiteres markantes wissenschaftliches Ergebnis ist, dass Eap den Verlauf von Brustkrebskrankungen beeinflusst. Die Metastasierung von Krebszellen in die Knochensubstanz ist eine häufige Folge der Brustkrebskrankung und Haupttodesursache (Plunkett et al., 2000). Chemokine dirigieren die Brustkrebszellen zum Knochengewebe, und die Krebskrankung wird infolge der Metastasierung so gut wie unheilbar. Die Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins verleiht den Brustkrebszellen ein höheres Metastasierungspotential, denn es vermittelt die Interaktion mit den Proteinen der Knochenmatrix, so dass eine Adhäsion, Migration und Invasion in das Knochengewebe erfolgt. Eins dieser Proteine ist Osteopontin (OPN), welches zur Familie der „small integrin-binding ligand N-linked glykoproteins“ gehört. Durch proteolytische Spaltung wird die zunächst kryptisch gelegene Bindungsstelle des OPN für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit Hilfe von Thrombin oder MMP-3 und MMP-7 freigelegt. OPN kommt auch im Tumorgewebe vor; eine erhöhte Expression an OPN wird mit einer höheren Metastasierungsrate in Verbindung gebracht.

Eap bindet spezifisch an OPN. Auf diese Weise blockiert Eap konzentrationsabhängig die Bindungsstellen, die für die Metastasierung der Brustkrebszellen von Bedeutung sind.

Aufgrund der breitgefächerten Interaktionen von Eap mit der extrazellulären Matrix, dem Sialoprotein des Knochens und dem OPN wird mit dieser Studie auch deutlich, warum *S. aureus*-Infektionen auch sehr häufig ins Knochengewebe metastasieren, während *S. aureus* über das Endothel der kleinen Knochenkapillaren transmigriert und daraufhin am OPN wie beschrieben bindet (Schneider et al., 2007).

Außerdem vermittelt Eap einen wachstumshemmenden Effekt an Tumorgeweben, indem es die proangiogenetischen Signalwege modifiziert.

Für die Angiogenese werden Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF) aktiviert, und diese produzieren daraufhin vermehrt DAF und TF. Zuvor mit Eap behandelte Endothelzellen wurden konzentrationsabhängig stark in dieser vermehrten Expression attenuiert, und auch die Endothelzellproliferation wurde deutlich vermindert.

In der Signaltransduktion der Angiogenese sind die Kinasen ERK1 und 2, p38 und Akt/PKB beteiligt. Eap reduziert die VEGF- und bFGF-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und 2, allerdings nicht die der anderen beiden Kinasen. Im Gegensatz dazu erzeugt Eap sogar eine Erhöhung der p38- und Akt/PKB-Phosphorylierung, wenn sie durch bFGF induziert wird. Da Eap auf der Ebene von Ras seine hemmenden Eigenschaften entwickelt, wird die Bildung des Ras-GTP-Komplexes in VEGF- und bFGF-stimulierten Endothelzellen stark reduziert (Sobke et al., 2006).

Der MAPK-Signalweg über die ERK1/ERK2-Kaskade reguliert unter physiologischen Bedingungen die Genexpression, Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose. Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine binden hier an Zellrezeptoren mit folgender Aktivierung ihrer Rezeptor-Tyrosinkinasen, was über eine Reihe von weiteren Faktoren zur Stimulation des G-Proteins Ras mit Bildung des Ras-GTP-Komplexes führt. Dieser rekrutiert und aktiviert das zytosolische Raf an der Innenseite der Zellmembran, was wiederum in der Aktivierung der MEK und der ERK resultiert; letzteres aktiviert Proteine im Zytosol und Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Zu Mutationen kann es an den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, am Ras und am Raf kommen. Dieser Signalweg ist in 30% verschiedener Krebszellarten hyperaktiviert. Mutationen in Ras lösen willkürlich die Aktivierung der ERK1/ERK2-Kaskade aus, was bei 15-30% der Krebsarten der Fall ist (Garnett und Marais, 2004). Da Eap, wie oben beschrieben, die Angiogenese hemmt, unterdrückt es möglicherweise auch die Proliferation von Tumoren, bei denen der Signalweg über die ERK1/ERK2-Kaskade hyperaktiv ausgeprägt ist.

Angesichts der Tatsache, dass das proliferierende Gewebe eines Tumors auf eine Neovaskularisierung angewiesen ist, kommt zu dem Aspekt, dass Eap möglicherweise die MAPK-Kaskade in den Tumorzellen selbst hemmen könnte, noch ein zweiter Aspekt hinzu: auch über seine anti-angiogenetische Wirkung könnte Eap das Tumorstadium eindämmen. Tumorgewebe proliferiert autonom und ohne Rücksicht auf die physiologische

Anordnung von Gewebestrukturen und deren Dichte. Reicht die Blutversorgung aufgrund des Tumorumfangs nicht mehr aus, werden die Zellen aufgrund von Hypoxie nekrotisch und setzen ein Alarmprotein frei, das HMGB-1 (High-Mobility-Group-Box-1 Protein) (Schlueter et al., 2005). Es kommt in allen Zellen vor und hat primär eine regulierende Funktion auf Transkriptionsebene, wird aber auch aus aktivierten Makrophagen bzw. Monozyten, aus aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen freigesetzt, wie auch aus allen nekrotischen, jedoch nicht aus apoptotischen Zellen (Erlandsson und Andersson, 2004).

Schlueter et al. postulieren aufgrund ihrer Ergebnisse eine angiogenetische Wirkung von HMGB-1 mit zwei möglichen Signalwegen: Einerseits aktiviert das aus den nekrotischen (Tumor)Zellen freigesetzte HMGB-1 Makrophagen über die Bindung an deren RAGE („Receptor for Advanced Glycation End Products“). In den aktivierten Makrophagen resultiert die HMGB-1-Wirkung über den MAPK-Signalweg und die NF- κ B-Aktivierung in der Freisetzung von angiogenetischen Faktoren, wie VEGF, IL-8, TNF- α und auch von HMGB-1. Die andere Möglichkeit besteht darin, dass HMGB-1 selbst, nachdem es aus aktivierten Makrophagen und Tumorzellen freigesetzt wurde, als angiogenetischer Faktor auf Endothelzellen wirkt.

Es bleibt nach dieser Studie jedoch noch ungeklärt, ob der angiogenetische Effekt von HMGB-1 nur auf der Induktion von VEGF beruht, oder ob noch andere Elemente beteiligt sind, die den Effekt von HMGB-1 unterstützen (Schlueter et al., 2005).

Ergänzend kommen die von Mitola et al. in 2006 publizierten Ergebnisse hinzu, die HMGB-1 als proangiogenen Faktor beweisen. Freigesetzt aus den Tumorzellen und Makrophagen, stimuliert es über die Bindung an RAGE die Migration und Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen.

Weiterhin wird in diesem Artikel beschrieben, dass diese Neovaskularisierung durch anti-RAGE-Antikörper in vivo gehemmt werden kann.

Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Rezeptoren und andere Liganden auf Makrophagen und Endothelzellen eine Rolle spielen; bei infektiösen Prozessen zum Beispiel sind für die erste Aktivierung der Makrophagen TLRs notwendig, die das LPS oder Peptidoglykan von Bakterien erkennen, so dass die intrazelluläre Synthese von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren induziert wird.

Die Angiogenese scheint aber in sehr hohem Maße von RAGE und HMGB-1 abhängig zu sein, wie die Versuchsergebnisse von Schlueter et al. (2005) und Mitola et al. (2006) belegen. Durch die Bindung von HMGB-1 an RAGE ist also auch die ERK1/ERK2-Kaskade in die HMGB-1 vermittelte Wirkung involviert. Die RAGE-vermittelte angiogenetische Wirkung ist also genau an den MAP-Kinase-Signalweg gekoppelt, der durch Eap auf der Höhe von Ras gehemmt wird. Kombiniert man also die Ergebnisse von Sobke et al. (2006), Schlueter et al. (2005) und Mitola et al. (2006), ließe sich die Schlussfolgerung daraus

ziehen, dass Eap möglicherweise in den HMGB-1-aktivierten Makrophagen die Synthese der angiogenetischen Faktoren hemmt und ebenfalls eine hemmende Wirkung auf den MAPK-Signalweg in den Endothelzellen entfaltet, der für deren Proliferation notwendig ist. Das Tumorwachstum könnte also auf verschiedenen Ebenen durch Eap gehemmt werden; einerseits über eine verringerte Neovaskularisierung und andererseits über die Hemmung der MAPK-Signalwege in den Tumorzellen.

In Analogie dazu könnte Eap ein vielversprechendes Potenzial besitzen, nicht nur das Risiko für die Entstehung von Tumoren (wie oben beschrieben durch Ras-Mutationen) zu minimieren, sondern auch bestehende, kleine Tumore in ihrem Wachstum zu inhibieren, Metastasierungen vorzubeugen und somit die derzeit angewendeten Therapeutika in ihrer Wirkung zu unterstützen. Diese Aussicht deuten auch Athanasopoulos et al. (2006) in ihrem Artikel an.

In diesem berichten sie, dass die angiogenesehemmenden und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Eap auch auf die Wundheilung einen negativen Einfluss haben. Diese ist ein gut organisierter Prozess, anfangs die Blutstillung, gefolgt von der Entzündungs-, Proliferations- und Reifungsphase. Mit Hilfe des P-Selektins auf der Plättchenoberfläche werden Leukozyten in den Thrombus rekrutiert. Sie vermitteln nicht nur die primäre Abwehr am Ort der Verletzung, sondern setzen auch zusammen mit den aktivierten Plättchen unter anderem Chemokine und Wachstumsfaktoren frei, die chemoattraktiv und stimulierend auf weitere Leukozyten, Endothel- und glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten wirken, so dass neben der Blutstillung auch gleich die Wundheilung und Geweberegeneration in Gang gesetzt wird (siehe I.3.1). Die Regeneration bedarf allerdings einer sehr guten Durchblutung, die ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe zu den proliferierenden und produzierenden Zellen bringt, und außerdem Abbauprodukte abtransportiert. So ist die Angiogenese nicht nur für das Tumorwachstum, sondern auch für die Wundheilung und bei Entzündungen ein limitierender Faktor.

Die in der Entzündungsphase erforderliche Rekrutierung der Leukozyten an das endotheliale ICAM-1 im Gebiet der Verletzung wird durch Eap unterbunden, so dass damit auch viel weniger Chemokine und Wachstumsfaktoren in diesem Gebiet freigesetzt werden. Die blockierte Leukozytenbindung verhindert gleichzeitig auch die Leukozytenaktivierung, so dass die Synthese von NFκB und die damit verbundene Expression von TF auf den Leukozyten unterdrückt werden; dieser hätte ebenfalls eine proangiogene Wirkung.

Zusammenfassend kommt der anti-angiogenetische Effekt von Eap durch verschiedene Eigenschaften zustande:

1. Eap hemmt durch seine Bindung an ICAM-1 die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten, so dass weniger Wachstumsfaktoren freigesetzt werden und die Proliferation der Endothelzellen nicht ausreichend stimuliert wird.

2. Die oben beschriebene Hemmung der ERK1/ERK2-Kaskade durch Eap leistet somit ebenfalls einen Beitrag zur Wundheilungsstörung, da die Durchblutung nicht ausreichend gewährleistet wird.
3. Eap blockiert außerdem die Bindung der endothelialen $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an extrazellulären Matrixproteinen (Vitronectin und Fibrinogen), so dass die Migration der Endothelzellen entlang der Matrix nicht erfolgen kann, die aber für die Entstehung neuer Gefäße essenziell ist (Athanasopoulos et al., 2006).

Parallel dazu kommen Chavakis et al. (2002) zu dem Ergebnis, dass Eap die uPAR-vermittelte Leukozytenrekrutierung an Vitronectin hemmt.

Der UPAR-uPA-Komplex ist nicht nur bei der Fibrinolyse involviert, sondern moduliert auch die Proliferation, Differenzierung, Migration und Adhäsion von Zellen an der extrazellulären Matrix, die bei Entzündungs- und Regenerationsprozessen beteiligt sind (Mondino und Blasi, 2004); der Komplex ist also auch an der Migration der Endothelzellen beteiligt. UPAR vermittelt dabei die initiale Adhäsion der Zellen an Vitronectin, welches durch die Casein-Kinase 2 dafür phosphoryliert wird. Diese initiale Bindung induziert die Aktivierung der entsprechenden $\alpha\beta$ -Integrine, die für eine feste Bindung der Zellen und deren Ausbreitung an der Matrix notwendig sind (Blasi und Carmeliet, 2002).

UPAR vermittelt also sowohl die Migration und Adhäsion der Endothelzellen an der Matrix als auch die Rekrutierung von Leukozyten an Vitronectin und Fibrinogen. Und beide Prozesse sind abhängig von der $\alpha_v\beta_3$ -Integrinbindung an Vitronectin, welche durch Eap blockiert wird (Chavakis et al., 2002; Athanasopoulos et al., 2006).

I.6 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

In der Regel verursacht *S. aureus* lokale Infektionen, welche bei einem gesunden Menschen oder Tier unter anschlagender antibiotischer Therapie nur selten zu weiteren Komplikationen führen. Entwickelt sich aus einer lokalen Infektion allerdings eine Sepsis, können sich schwere Folgeerkrankungen einstellen, wie eine IE. Thrombozyten bringen dabei ein nicht zu unterschätzendes Risiko für eine disseminierte intravasale Gerinnung infolge einer Sepsis mit ins Spiel. Denn für verschiedene Adhäsionsproteine, die durch *S. aureus* gebildet werden, zum Beispiel die MSCRAMMs (FnBPs und Clf), ist bereits bewiesen, dass sie sowohl zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen als auch die Adhäsion an Matrixstrukturen und die Invasion in Wirtszellen vermitteln können. Dies sind die ersten Schritte, die für eine erfolgreiche Infektion des Wirtsgewebes essenziell sind.

Da *S. aureus* aber nicht nur MSCRAMMs bildet, sondern auch die löslichen SERAMs (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules), ist die Fragestellung dieser Arbeit, ob auch die SERAMs, hier speziell das „Extracellular Adherence Protein“ (Eap), die Fähigkeit besitzt, die Thrombozytenfunktion zu beeinflussen.

Mit den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen werden ganz bestimmte Ziele verfolgt:

Zunächst ist zu klären, ob Eap überhaupt eine Aktivierung der Thrombozyten induzieren kann. Die Aktivierung der Blutplättchen kann durch bestimmte charakteristische Merkmale nachgewiesen werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, diese Merkmale nach Inkubation der Thrombozyten mit Eap nachzuweisen und detektierbar zu machen.

Ein Merkmal ist die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors mit darauffolgender Bindung des Fibrinogens, um die Plättchen miteinander zu vernetzen. Diese Fibrinogenbindung soll mit zwei verschiedenen Assays nachgewiesen werden. Einmal wird die Thrombozytensuspension vor ihrer Inkubation mit Eap mit Fibrinogen versetzt, welches an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist. So wird die Bindung des Fibrinogens als charakteristisches Merkmal der Plättchenaktivierung im Durchflusszytometer messbar. Der gleiche Versuch soll vergleichsweise mit PRP (plättchenreichem Plasma) und mit GFP (gelfiltrierten Plättchen) durchgeführt werden, um festzustellen, ob eventuell eine mögliche Aktivierung der Thrombozyten durch Eap durch die im Plasma vorhandenen Proteine beeinflusst wird.

In einem anderen Assay, und zwar mit Hilfe der Aggregometrie, soll die Aggregatbildung der Thrombozyten infolge der Eap-Behandlung als Maßstab für die Fibrinogenbindung und somit auch für die Aktivierung der Plättchen dienen.

Ein weiteres Merkmal der Thrombozytenaktivierung, welches es nachzuweisen gilt, ist die Sekretion der α -Granula und der „dense bodies“, so dass mit der Fusion der Granula- und

Zellmembran bestimmte Proteine an der Plättchenoberfläche exprimiert werden. So kann man die Aktivierungscharakteristika durch Markieren dieser Proteine (P-Selektin (CD62P), CD63 und CD40 Ligand) mit entsprechenden Fluorescein-gekoppelten Antikörpern im Durchflusszytometer detektierbar machen.

Zum Nachweis der Degranulation der „dense bodies“ soll zusätzlich Mepacrin verwendet werden. Mepacrin ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die Plättchen hineindiffundieren und dann von den dichten Granula aufgenommen werden kann. Werden die „dense bodies“ freigesetzt, nimmt die Fluoreszenz der Thrombozyten ab.

Als weiteres Charakteristikum kommt es im Rahmen der Thrombozytenaktivierung in der Membran zu einer plötzlichen und radikalen Umverteilung der Phospholipide, so dass Phosphatidylserin aus der inneren Schicht in die äußere Schicht der Membran umgelagert wird. Dessen negativ geladene Phosphatgruppen verleihen der Außenseite der Membran eine stark negative Ladung. Diese ist notwendig, damit Gerinnungsfaktoren an der Plättchenoberfläche binden können, so dass der Gerinnungsprozess an diese lokalisiert und auf den Ort der Verletzung begrenzt wird. Um eine solche prokoagulante Oberfläche nachzuweisen, sollen Eap-behandelte Plättchen in verschiedenen Versuchen mit Annexin-V-FITC, FVIIa-FITC, FVIII-FITC und FXIII-FITC inkubiert und Bindung der FITC-gekoppelten Faktoren an Thrombozyten durchflusszytometrisch detektiert werden.

Die prokoagulatorische Oberfläche kann in ihrer Kapazität noch gesteigert werden, wenn sehr starke Agonisten auf die Thrombozyten einwirken und diese daraufhin kleine Vesikel, sogenannte Mikropartikel, abschnüren. Thrombozyten und die sehr viel kleineren Mikropartikel können anhand ihrer unterschiedlichen Größe in der durchflusszytometrischen Messung voneinander differenziert werden. Es wäre auch von Interesse, ob Eap in der Lage ist, die Mikropartikelbildung zu induzieren.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob verschiedene Modulatoren eine mögliche Wirkung des Eap auf Thrombozyten beeinflussen können. Einerseits sollen hier Gerinnungshemmer, speziell Thrombininhibitoren und Komplexbildner, und andererseits thiolreaktive Substanzen getestet werden. Das Ziel ist zunächst, herauszufinden, ob die Bindung von FITC-konjugiertem Fibrinogen beeinflusst wird. Allerdings soll im Weiteren noch geprüft werden, ob durch die Bindung der thiolreaktiven Substanzen an die oberflächlichen Sulfatgruppen außer der Bindung von Fibrinogen auch Aktivierungsmarker wie die Granulasekretion beeinflusst werden können.

Da die Funktion der Thrombozyten und deren Interaktion mit dem Immunsystem nicht nur für die Humanmedizin von großem Interesse ist, ist eine weitere Aufgabe in dieser Arbeit, auch verschiedene Tierarten auf eine mögliche Thrombozytenaktivierung durch Eap zu testen.

Auch hier soll eine potentielle Thrombozytenaktivierung anhand der Fibrinogenbindung nachgewiesen werden.

S. aureus ist ein fakultativ pathogener Keim und vor allem an lokalen Infektionen beteiligt. Wenn man allerdings die kritische Entwicklung der Resistenzen, das relativ hohe Risiko einer Sepsis und die möglichen, irreversiblen Folgeschäden bedenkt, wird deutlich, dass hier ein großer Forschungsbedarf auf den zusammenhängenden Gebieten der Hämostase, der innaten Immunabwehr und der Mikrobiologie besteht, sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin.

II. Material und Methoden

II.1 Geräte

Durchflusszytometrie

- Durchflusszytometer: FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Computer: Macintosh G4 (Apple Computer GmbH, München)
- Betriebssystem: MacOS 9 (Apple Computer GmbH, München)
- Steuer- und Auswerteprogramme: FACSCalibur und CellquestPro (Becton Dickinson, Heidelberg)

Zentrifugen

- Avanti J, HP-30i (Beckmann, München)
- Sigma 3 K-1 (Sigma, Osterode)
- B4i (Jouan, Frankreich)

Aggregometrie

- Lumi-Aggregometer/P.I.C.A. (Chrono-Log, Nobis, Endingen)
- Zwei-Kanal-Schreiber REC 102 (Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frankfurt/M.)

ELISA

- Photometer: MRX (Dynatech, Denkendorf)

Sonstige Geräte

- Analysenwaage: AE50 (Mettler-Toledo, Schweiz)
- Waage: 2355 (Sartorius, Göttingen)
- Eismaschine: Scotsman AF10 (Fisher Scientific, Nidderau)
- Fraktionssammler: Modell 2110 (BioRad, München)
- pH-Meter: STH600 (WTB, Weilheim)
- Photometer: Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frankfurt/M.)
- Wasseraufbereitungsanlage: Elix10 und Milli-Q-biocel (Millipore, Eschborn)
- Zellzählgerät: System 9000 (Serono Baker Diagnostics, USA)
- Schüttler: IKA-Schüttler MTS4 (IKA-Labortechnik, Staufen)

II.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH (Frankfurt/ M.), AstraZeneca (London, GB), Bachem AG (Bubendorf, Schweiz), Becton Dickinson (Heidelberg), Behringwerke AG (Marburg), Bender Medical Systems (Wien, Österreich), Boehringer GmbH (Mannheim), Calbiochem (Bad Soden), Centeon (Wien, Österreich), Fresenius (Bad Homburg), GE Healthcare Bio Sciences (Upsala, Schweden), Immunotech (Hamburg und Marseille), Kordia (Niederlande), Merck (Darmstadt), Novartis-Behring (Marburg), Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark), Pentapharm (Basel, Schweiz), Pfizer Pharma GmbH (Berlin), Pierce (Niederlande), ratiopharm GmbH (ULM), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford (IL, USA), Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, CDN)

II.2.1 Verwendete Antikörper

Antigen	Spezifität	<u>m</u> onoklonal/ <u>p</u> olyklonal (Spezies)	Klonname	Konjugation	Bezugsquelle
P-Selektin (CD62P)	Human	m. Maus	CLB- thromb/6	FITC	Immunotech, Hamburg
CD63	Human	m. Maus	CLB-gran/12	FITC	Immunotech, Hamburg
CD40L	human	m. Maus		Pe	Becton Dickinson, Heidelberg
GPIX CD42a	Human	m. Maus	Beb1	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg

II.3 Präparation der Thrombozyten

II.3.1 Plättchenisolierung durch Zentrifugation

Für die Versuche dieser Dissertation wurden Thrombozyten aus frischem Vollblut gewonnen und nach der Blutabnahme innerhalb von 60 min verarbeitet. Die Einhaltung dieses Zeitlimits ist wichtig, damit die Blutplättchen ihre physiologische Reaktionskapazität behalten und nicht mit fortschreitender Zeit schon voraktiviert und zerstört werden. Das Blut wurde freiwilligen Spendern abgenommen, die mindestens 14 Tage keine Medikamente eingenommen hatten, welche die Plättchenfunktion beeinflussen könnten.

Mit Hilfe eines „Butterfly“-21G-Venenpunktionsbesteckes (Venofix/ Braun, Melsungen) wurde den Spendern das Blut venös entnommen und in der Regel mit einer Natriumcitratlösung (110 mM im Verhältnis 1:10) antikoaguliert (Blutabnahmeröhrchen: 10 ml Citrat-Monovetten von Sarstedt (Nümbrecht)).

Einige Versuche wurden mit dem Blut verschiedener Tierarten durchgeführt, welches ihnen als Nebenprodukt im Rahmen von Forschungsvorhaben anderer Arbeitsgruppen entnommen werden konnte (Blut vom Schaf und von der Ratte wurde in die üblichen kommerziellen Citrat-Blutprobenröhrchen abgenommen; natives Blut vom Schwein (Westfleisch AG in Hamm), wurde in 50 ml-Röhrchen aufgefangen, in die ebenfalls Natrium-Citratlösung (3,13%ig) (Fresenius, Bad Homburg) im Verhältnis 1:10 vorgelegt worden war. Außerdem wurde jeweils drei Pferden, Rindern, Hunden und Katzen im Rahmen einer labordiagnostischen Untersuchung in einer Tierarztpraxis jeweils ein Probenröhrchen Blut mehr abgenommen, um die Reaktion der Blutplättchen verschiedener Tierarten auf die Agonisten zu zeigen.

Den Ratten wurde ein Katheter in die Jugularvene implantiert, über den das Blut abgenommen werden konnte; dies geschah im Rahmen der Versuche der Arbeitsgruppe „Chirurgische Forschung“ des Universitätsklinikums Münster. Den Hunden und Katzen konnte ebenfalls mit dem oben genannten Venenpunktionsbesteck das Blut abgenommen werden. Den Pferden und Rindern wurde mit Hilfe einer 20G-Kanüle Blut abgenommen, den Schafen über einen Venenverweilkatheter, der für die Versuchszwecke der Arbeitsgruppe „Sepsis und Multiorganversagen“ gelegt worden war (Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Münster).

Durch Zentrifugation des Blutes für 10 min bei Raumtemperatur und bei 190 x g (das Blut von Menschen und Nagern), bzw. bei 560 x g (das Blut von den Hunden, Rindern, Schafen, Pferden und Schweinen), erhielt man in den Probenröhrchen das plättchenreiche Plasma (PRP), welches abpipettiert und weiter verarbeitet worden ist.

II.3.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl/ μ l Blut

Je nach Individuum ist eine relativ große Schwankungsbreite in der Thrombozytenzahl/ μ l Blut vorhanden, die mit Hilfe des Zellzählgerätes System 9000 (Serono Baker Diagnostics, USA) ermittelt wurde. Dazu wurden einem Probengefäß mit 10 ml „Rinse“-Puffer (Mallinckrodt Baker, Griesheim) 40 μ l des Überstandes aus den abzentrifugierten Blutproben hinzugefügt. Die Zellzahl wurde nach Angaben des Herstellers im Gerät ermittelt und in Zellzahl/ μ l angegeben.

II.3.3 Separation der Thrombozyten von Plasmaproteinen mit Hilfe der Gelfiltration

Jede weitere Manipulation der Blutplättchen kann schon eine Aktivierung hervorrufen, wodurch die Versuchsergebnisse verfälscht würden. Das heißt, weitere Handhabungen müssen äußerst vorsichtig und mit Rücksichtnahme auf die physiologischen Gegebenheiten im Umfeld der Plättchen erfolgen (zum Beispiel hinsichtlich des pH-Wertes und der Reaktion mit Materialien). Eine schonende Methode, um eine reine Thrombozytensuspension zu erhalten, ist die Gelfiltration. Das Material für die Gelsäule ist Sephadex G25 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Upsala (S)), welches mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und möglichst luftblasenfrei in eine silanisierte Glassäule gegossen wurde. Mit Hapes/Tyrode Puffer (pH 7,4) äquilibrierte man die Gelsäule, um danach das aus 20-40 ml Vollblut gewonnene PRP auf die vorbereitete Gelsäule zu pipettieren. Nach dem vollständigen Einsickern des PRP wurde H/T-Puffer bis zum oberen Säulenrand daraufgegeben. Das Gel besteht aus kleinen Kügelchen mit schwammartiger Struktur und mit Poren von relativ einheitlichem Durchmesser. Im PRP befinden sich die Thrombozyten und die Plasmaproteine. Während die vom Umfang her recht kleinen Plasmaproteine durch die Poren in die Schwämmchen hineindiffundieren können, bleiben den großen Partikeln, also den Thrombozyten, aufgrund ihres Umfangs nur die Räume zwischen den Gelkügelchen. Somit werden die Thrombozyten mit nur geringem oder gar keinem Widerstand eluiert und man erhält die gelfiltrierten Plättchen (GFP). Die Plasmaproteine dagegen diffundieren mit geringerer Geschwindigkeit weiter, da ihnen durch das Diffundieren in die Gelschwämmchen ein Widerstand entgegengesetzt wird.

Lösungen:

-NaCl-Lösung (0,9%)

-Hepes/Tyrode-Puffer (pH 7,4)	NaCl	140,0 mM
	KCl	2,7 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	NaHCO ₃	12,0 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM
	Hepes	5,0 mM

Die Pufferlösung wurde mit HCl (2 M) und NaOH (1 M) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

II.3.4 Herstellung von plättchenarmem Plasma (platelet poor plasma (PPP))

Das gewonnene Vollblut (II.3.1) wurde für 10 Minuten (min) bei 2500 x g zentrifugiert und der klare Überstand wurde als PPP abgenommen. Auch Blutproben, von denen das PRP bereits abgenommen wurde, konnten nochmals bei 2500 x g abzentrifugiert werden, um das PPP aus diesen zu erhalten.

II.4 Aktivierung der Thrombozyten *in vitro*

Verschiedene Agonisten wurden für die Aktivierung der Blutplättchen genutzt, um die Aktivierung durch Eap mit anderen Agonisten vergleichen zu können; neben humanen Blutplättchen wurden dafür auch Thrombozyten verschiedener Tierarten diesem Aktivierungsvergleich unterzogen.

II.4.1 Eap

Eap gehört mit zu den wichtigsten Virulenzfaktoren des Bakteriums, indem es neben weiteren Adhäsionsproteinen die Interaktion mit dem Wirtsgewebe und im Weiteren die Zellinvasion vermittelt, wodurch die Manifestation einer Infektion, unter Umständen sogar eine Persistenz der Keime begünstigt wird.

Für die Aktivierung der Blutplättchen wurde eine Plättchensuspension hergestellt. Für das gewünschte Gesamtvolumen der Suspension wurde eine bestimmte Menge an PRP durch Verdünnung mit PBS-Puffer (s. u.) auf 50.000 Tz/μl Suspension eingestellt.

Bei Verwendung von GFP wurde die Suspension mit Hepes/Tyrode-Puffer (pH 7,4) auf 25.000 Tz/μl eingestellt.

Für diesen Versuch wurde rekombinantes Eap verwendet, das nach der Methode von Hussain et al. (2001) extrahiert worden ist. Das Protein wurde mit Konzentrationen von 1,25 µg/ml bis 25 µg/ml vorgelegt, denen nachfolgend jeweils 100 µl der Thrombozytensuspension hinzugefügt wurde. Die Blutplättchen wurden so für 5 Minuten (min) erschütterungsfrei mit Eap aktiviert, bevor die Proben jeweils mit 100 µl Formaldehydlösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert wurden. Nachfolgend wurde den Aktivierungsröhrchen jeweils 500 µl Puffer hinzugefügt, die dann für 10 min bei 1000 x g abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet mit 500 µl PBS resuspendiert, um die Proben schließlich im Durchflusszytometer zu messen.

Lösungen:

-Eap-Stammlösung:		439,63 µg/ml
-Hepes/Tyrode-Puffer:	siehe II.3.3	
- PBS-Puffer:	NaCl	137,0 mM
(pH 7,4)	KCl	2,6 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,0 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM

Die Pufferlösung wurde mit HCl (2 M) und NaOH (1 M) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

-Formaldehydlösung: Formaldehyd in PBS (pH 7,4) 1%

II.4.2 Thrombin

Das Thrombin (Faktor IIa) ist das wichtigste Enzym und einer der stärksten Induktoren in der Blutgerinnung. Es wird auf der Oberfläche von Blut- und Gefäßzellen mit Hilfe des Prothrombinase-Komplexes durch proteolytische Spaltung aus Prothrombin, welches in der Leber produziert wird, gebildet und aktiviert dann über PAR-1 und -4 die Thrombozyten. Zudem gehört es zu den Serinproteasen und spaltet Fibrinogen zu Fibrin, so dass über diese Brückenmoleküle ein festes Aggregat aus Plättchen entsteht. Weiterhin aktiviert es die Blutgerinnungsfaktoren V, VIII, XI und XIII.

Der Thrombozytensuspension wurde mit PBS-Puffer (pH 7,8) auf 50.000 Tz/µl eingestellt und zusätzlich wurde das Peptid GPRP (Calbiochem, Bad Soden) in einer Konzentration von 1,20 mM hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation der Plättchen mit diesem Peptid für mindestens 5 min bei Raumtemperatur.

Das GPRP verhindert weitestgehend, dass sich einzelne Fibrinmoleküle aneinanderlagern, was die Polymerisation zur Folge hätte (Michelson, 1994).

In diesem Fall sind aber weder größere Aggregate von Plättchen noch von Fibrin erwünscht, da diese die Detektion einzelner Zellen und Strukturen auf deren Oberfläche stören würden. Die Thrombozytensuspension wurde mit PBS-Puffer (pH 7,8) auf 25.000 Tz/ μ l Suspension eingestellt. α -Thrombin (aus Rinderplasma, Sigma-Aldrich (Steinheim)) wurde in Konzentrationen von 0,05 U/ml bis 1 U/ml in die Probenröhrchen vorgelegt, ergänzt durch Aliquots der Plättchensuspension von jeweils 100 μ l pro Röhrchen. Auch hier erfolgte die Aktivierung erschütterungsfrei für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden auch hier die Proben wie oben beschrieben fixiert und zentrifugiert, bevor sie im Durchflusszytometer gemessen wurden.

Lösungen:

-GPRP-Stammlösung:	GPRP	120	mM
	in 0,9 %iger NaCl-Lösung		
-Thrombin-Stammlösung:	Thrombin	100	U/ml
	in 0,9 %iger NaCl-Lösung		
-PBS-Puffer (pH 7,8)	siehe II.4.1 (gleiche chemische Zusammenstellung und den pH-Wert mit Hilfe von HCl (2 M) und NaOH (1 M) eingestellt)		
-Formaldehydlösung:	Formaldehyd in PBS (pH 7,8)	1%	

II.4.3 ADP

ADP wird in den „dense bodies“ der Thrombozyten gespeichert und bei Aktivierung der Plättchen, zum Beispiel durch das auf den Zellen gebildete Thrombin, freigesetzt. Es ist ein relativ schwacher Plättchenagonist, verstärkt aber die Aktivierung indem es an seine Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ auf den Plättchen bindet.

Das PRP wurde so wie in II.4.1 beschrieben angesetzt und dann in 100 μ l-Aliquots in die Probenröhrchen pipettiert. In diese wurde zuvor das ADP (Boehringer GmbH, Mannheim) in Konzentrationen von 0,5 μ M bis 10 μ M vorgelegt. So wurden die Plättchen für 5 min bei Raumtemperatur und erschütterungsfrei aktiviert und danach wie in II.4.1 beschrieben, mit Formaldehyd fixiert, abzentrifugiert, mit PBS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Lösungen:

-ADP-Stammlösung:	ADP	250	μ M
	in 0,9 %iger NaCl-Lösung		
-PBS-Puffer: (pH 7,4)	siehe II.4.1		

-Formaldehydlösung: siehe II.4.1 1 %

II.4.4 Kollagen

Methyliertes Kollagen Typ I ist ein weiterer Plättchenagonist und wurde nach der Methode von Rauterberg et al. (1968) in unserem Labor hergestellt.

Auch hier wurde das methylierte Kollagen Typ I im Konzentrationsbereich von 0,2 µg/ml bis 2 µg/ml in die Probenröhrchen vorgelegt. Jeweils 100 µl des wie zuvor angesetzten PRP wurden mit den entsprechenden Konzentrationen an Kollagen für 5 min inkubiert und mit der oben genannten Vorgehensweise weiter verarbeitet und gemessen.

Lösungen:

- Kollagen-Stammlösung: methyliertes Kollagen Typ I 200 µg/ml
 in 0,9 %iger NaCl-Lösung
 und 0,05 % Essigsäure
- PBS-Puffer: siehe II.4.1
(pH 7,4)
- Formaldehydlösung (1%): siehe II.4.2

II.5 Durchflusszytometrie

II.5.1 Optische Technik und Signaldetektion

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, mit der *in vitro* aktivierte Thrombozyten und auch andere Zellen und Partikel auf ihre optischen Eigenschaften hin gemessen und analysiert werden, so zum Beispiel die qualitative und quantitative Messung der Plättchenaktivierung. Nachfolgend werden Zellen nur noch als zu messende Einheiten genannt, also stellvertretend auch für andere Partikel.

Die zu analysierende Probe wird über eine Stahlkanüle in eine Messkammer eingesaugt, wo die Zellen zunächst willkürlich im Raum verteilt sind. Für eine korrekte Messung müssen sie allerdings einzeln aneinandergereiht werden. Dies geschieht mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit, welche eine laminare Strömung erzeugt. Dadurch werden die Zellen beschleunigt und soweit separiert, dass immer nur eine Zelle am Kreuzpunkt von Laser und Nachweisoptik vorbeigeführt wird. Diesen Effekt nennt man auch hydrodynamische Fokussierung.

Ein Laserstrahl besteht aus einem Bündel von Lichtstrahlen mit annähernd gleicher Frequenz (kohärentes Licht). Wenn eine Zelle diesen Laserstrahl passiert, streut sie die auftreffenden Lichtstrahlen aus diesem Bündel je nach Zellgröße, Membranbeschaffenheit und nach Komplexität des Zellinneren (mit den Granula und dem Nucleus). Diese Streuung erfolgt charakteristisch und ist aufgetrennt in Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht besteht aus Lichtstrahlen, die nur geringfügig von ihrer ursprünglichen Laserstrahl-Achse abgelenkt wurden (bis max. 20°), und ist daher mit der Zellgröße in Relation zu setzen. Das heißt die Ablenkung des Lichtstrahls ist proportional zur Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht zur Zellgranularität, bzw. inneren Komplexität und auch zu den Fluoreszenzeigenschaften proportional ist. Über das Maß der Ablenkung und Streuung der Lichtstrahlen ermittelt das Zytometer simultan die genannten Zellparameter.

Mit Hilfe einer Photodiode, dem „forward scatter channel“ (FSC), wird auf der Achse des Laserstrahls das Vorwärtsstreulicht detektiert, und so erzeugen kleine Zellen entsprechend ein schwaches und große Zellen ein starkes FSC-Signal. Im 90°-Winkel zur Achse des Vorwärtsstreulichts befindet sich eine Photomultiplieröhre, „side scatter channel“ (SSC) genannt, die das Seitwärtsstreulicht misst. Das SSC-Signal ist ebenso proportional zur Zellgranularität bzw. zur inneren Komplexität der Zelle.

Zusätzlich ist es möglich, Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen zu messen, mit der qualitative und quantitative Daten von Rezeptoren auf einer Zelloberfläche ermittelt werden können; auch intrazelluläre Moleküle können damit erfasst werden, wie die DNA oder Zytokine. Dafür werden diese Zellstrukturen (Antigene) mit einem Antikörper oder einem anderen daran bindenden Molekül markiert, die wiederum mit einem Fluorochrom konjugiert sind.

Um die Spezifität für die Messung der verschiedenen Wellenlängenbereiche der fluoreszierenden Stoffe zu gewährleisten, sind auf der Achse des Seitwärtsstreulichts optische Filter eingebaut. Diese lassen bestimmte Wellenlängen passieren, während andere blockiert und im 90°-Winkel zu den Photomultiplieröhren abgelenkt und gemessen werden. In der Art sind mehrere solcher optischer Filter hintereinandergeschaltet, an denen jeweils die verschiedenen Wellenlängen des Seitwärtsstreulichts und des emittierten Fluoreszenzlichts separiert werden. Dabei werden die detektierten Wellenlängen in den Photomultiplieröhren in ein elektronisches Signal transformiert und verstärkt. Vor diesen sind außerdem nochmals optische Filter zur Optimierung der Spezifität geschaltet.

Von den oben beschriebenen optischen Filtern gibt es drei Haupttypen: Ein „Longpass“-Filter kann zum Beispiel Wellenlängen von >500 nm passieren lassen, ein „Shortpass“-Filter lässt Wellenlängen von <560 nm passieren und der „Bandpass“-Filter lässt spezifisch einen eingegrenzten Wellenlängenbereich passieren (615-645 nm).

Dieser Wellenlängenbereich und damit auch der notwendige optische Filter sind für die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlich.

In den FACSCalibur sind vier verschiedene Filter eingebaut: Für Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Konjugate ein 530/30-„Bandpass“-Filter, für Phycoerythrin (Pe)-Konjugate ein 585/45-„Bandpass“-Filter, für das Seitwärtsstreulicht ein 488/10-„Bandpass“-Filter und für Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex (PerCP)-Konjugate ein 620 „Longpass“-Filter.

Somit separieren die Filter das Fluoreszenzlicht in die einzelnen Wellenlängenbereiche und leiten diese an die entsprechenden Detektoren weiter.

In dieser Arbeit wurde für die Durchflusszytometrie der FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. In diesem ist ein Argonionen-Laser eingebaut, der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm (blaues Licht) produziert. Das Spektrum des sichtbaren Lichts reicht von 400 nm bis 700 nm. Somit determiniert die Wellenlänge die Farbe des Lichts, und hängt die Frequenz von der Wellenlänge ab. Das heißt, blaues Licht liegt im Bereich einer kurzen Wellenlänge und besitzt somit eine höhere Frequenz, also auch ein höheres Energieniveau.

Fluorochrome sind Farbstoffe, die Lichtenergie absorbieren und innerhalb von 1-10 Nanosekunden wieder emittieren. Bei der Exzitation des Farbstoffes nimmt dieser durch die Absorption des Lichtes Energie auf und werden die Elektronen in den Atomen dadurch auf ein höheres Energieniveau beschleunigt. Die dafür benötigte Energie wird der zugefügten Lichtenergie abgezogen. Der Rest der absorbierten Energie kann nicht weiter genutzt werden und wird wieder in Form von Fluoreszenzlicht- und Wärmeenergie emittiert. Aufgrund des Energieverbrauchs für die Exzitation emittieren die Fluorochrome nun Licht mit geringerer Energie, also auch größerer Wellenlänge, verglichen mit dem Licht, welches von dem Farbstoff absorbiert wurde. In dieser Arbeit wurden die Fluorochrome FITC und Pe verwendet. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm, die Emissionsmaxima (E_{\max}) der Fluorochrome sind so unterschiedlich, dass jedes Fluoreszenzsignal von einem anderen Detektor erfasst werden kann. Somit kann die Messung verschiedener Fluorochrome zeitgleich erfolgen ($E_{\max}(\text{FITC}) = 530\text{nm}$, $E_{\max}(\text{Pe}) = 585\text{nm}$, $E_{\max}(\text{PerCP}) = 675\text{nm}$), also insgesamt 5 Parameter mit dem FSC-, SSC-Signal und den verschiedenen Wellenlängenbereichen.

Zusätzlich muss allerdings eine Signalkompensation erfolgen, da sich die Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome überlappen, obwohl die Filter nur recht schmale Wellenlängenbereiche zu den Photomultiplirohren passieren lassen. Es kommt oft vor, dass Zellen mit mehreren Fluorochromen gleichzeitig markiert sind, von denen die Fluoreszenzsignale überlappen. Um hier keine falschen Ergebnisse zu erhalten, subtrahiert das Zytometer automatisch diese Überschneidungen voneinander.

Ein weiterer Störfaktor wird eliminiert: Fragmente der zu untersuchenden Zellen, vor allem jene, an die auch Fluorochrome gebunden sind, erzeugen ein elektronisches Grundrauschen. Sie sind für die Messung nicht erwünscht, da es keine kompletten Zellen sind und damit die Messergebnisse verfälschen würden. Um das zu verhindern, richtet man einen Schwellenwert am FSC ein, so dass nur Signale von Zellen ab einer bestimmten Größe in das Messergebnis mit eingehen.

II.5.2 Signalverarbeitung und Signalanalyse

Die Signale, die bei den Detektoren eingehen, erzeugen eine geringe Menge an Strom (μA), der mit einer bestimmten Spannung assoziiert ist. Die Spannungstärke ist proportional zur Anzahl der bei dem Detektor eingegangenen Lichtphotonen. Die Spannung kann linear oder logarithmisch verstärkt werden. Ein „Analogue-to-Digital-Converter“ wandelt daraufhin diese Spannung in elektrische Signale um und verteilt die für jeden Parameter gemessene Signalintensität auf 1024 Kanäle. Diese Signale sind dann stark genug, um sie graphisch darstellen zu können. Die Analyse der erfassten Daten erfolgt dann mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogramms (CellquestPro).

Normalerweise werden Fluoreszenzsignale von kleineren Zellen, wie zum Beispiel von Thrombozyten, sowohl im FSC als auch im SSC im logarithmischen Modus gemessen, da mit diesem die schwachen Signale von kleineren Zellen expandiert und stärkere Signale von großen Zellen komprimiert werden können. Dagegen werden große Zellen, wie Endothelzellen, aufgrund ihrer Größe im linearen Modus gemessen.

Durch die logarithmische Verstärkung ist es somit möglich, die erfassten Daten, die im linearen Modus über ein Spektrum von mehreren Größenordnungen verteilt sind, trotzdem in derselben Skalierung darzustellen.

Die Art der Signalauswertung ist abhängig von der Anzahl der auszuwertenden Signale. So kann die Zweiparameterdarstellung verwendet werden, um einzelne Zellpopulationen zu differenzieren, wo der FSC und der SSC gegeneinander aufgetragen werden.

Aber auch Fluorochrome, die unterschiedliche Wellenlängen emittieren, können gegen den FSC oder SSC aufgetragen werden. Zur Auswertung einzelner Signale, zum Beispiel eines einzelnen Fluoreszenzsignals, welches zur Menge der zellgebundenen Fluorochromgekoppelten Moleküle proportional ist, wird eine Einparameterdarstellung genutzt. Hier wird die Anzahl der Zellen auf der Ordinate gegen die Zahl der Kanäle, die das FITC-Signal detektieren, auf der Abszisse aufgetragen. Mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms kann man zusätzlich ein „Gating“ vornehmen, wodurch bestimmte Zellpopulationen hinsichtlich bestimmter Eigenschaften von den übrigen Zellen abgegrenzt und separat ausgewertet

werden. In der statistischen Auswertung der Signale bei der Einparameterdarstellung bestimmt das Verarbeitungsprogramm den Median, bei dem 50 % der Werte unter diesem liegen und 50 % der Werte darüber. Der Median wird von Störsignalen am geringsten beeinflusst (wie zum Beispiel Signale von Zellfragmenten oder Zellaggregaten) und ist daher ein gutes Maß für die Signalwerte der Hauptpopulation von Zellen.

II.6 Detektion der Plättchenaktivierung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Thrombozytenaktivierung sowohl qualitativ als auch quantitativ erfasst werden. Mit der Aktivierung der Plättchen werden charakteristisch ganz bestimmte Rezeptoren bzw. Proteine auf deren Zelloberfläche exprimiert oder bereits exprimierte Rezeptoren aktiviert und/ oder in ihrer Anzahl vermehrt:

Das GPIIb/IIIa ist der Rezeptor für das Fibrinogen bei der Aggregatbildung. Es wird mit der Plättchenstimulation aktiviert und vermehrt exprimiert. CD62P oder P-Selektin, CD63 und CD40L werden mit der Aktivierung der Plättchen an deren Membranoberfläche exprimiert und haben eine abwehrvermittelnde Rolle. GPIb/V/IX ist der Rezeptorkomplex, der wichtig ist für die Bindung von unter anderem Thrombin, vWF und TSP-1.

Man kann diese Rezeptoren/ Proteine auf der Zelloberfläche als charakteristisches Indiz für die Aktivierung nachweisen, indem man die Blutplättchen nach der Aktivierung mit Antikörpern oder anderen Adhäsionsmolekülen inkubiert.

Damit dieser Nachweis auch messbar wird, koppelt man diese Antikörper/ Adhäsionsmoleküle jeweils mit einem Fluorochrom, dessen Fluoreszenz im Durchflusszytometer erfasst werden kann. Die Aktivierung und damit auch die Anzahl der exprimierten Rezeptoren/ Proteine sind abhängig von der Agonistenkonzentration unterschiedlich groß. Das heißt auch, dass mehr oder weniger markierte Antikörper/ Adhäsionsmoleküle gebunden werden, was dann einem stärkeren oder schwächeren Detektionssignal entspricht. Neben der Aktivierung können so natürlich auch verschiedene Thrombozytenfunktionen überprüft werden.

II.6.1 Fibrinogenbindung

Mit der Aktivierung der Blutplättchen wird der Rezeptorkomplex GPIIb/IIIa vermehrt exprimiert, durch das „inside-out-signaling“ aktiviert und in seiner Konformation geändert. Auf ruhenden Plättchen befindet er sich in einem inaktiven Zustand und kann keine löslichen, sondern nur immobilisierte Adhäsionsproteine binden. In der aktiven Form des GPIIb/IIIa

binden eine ganze Reihe von Adhäsionsproteinen, wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, vWF und TSP-1 an diesen Komplex. In der Hämostase ist es einer der wichtigsten Rezeptoren, da durch die Bindung der Adhäsionsmoleküle Brücken zwischen den einzelnen Plättchen und somit größere Zellaggregate entstehen, die eine Wunde, bzw. einen Schaden in der Gefäßwand zuverlässig abdecken können. Diese Fibrinogenbindung kann mit Hilfe von Fibrinogen-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dies ist auch ein indirekter Nachweis des GPIIb/IIIa-Komplexes an sich, bzw. die Aktivierung dessen.

Ein indirekter Nachweis dieses Komplexes kann auch mit Fluorochrom-gekoppeltem Fibrinogen geführt werden. Diese Methode ist gegenüber der ersten sehr sensitiv, da man Fibrinogen mit mehreren Fluorochrom-Molekülen gleichzeitig markieren kann, so dass man eine Verstärkung des Signals erhält.

Für den Nachweis der Plättchenaktivierung, also auch des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch Eap und bekannte Plättchenagonisten wurde humanes Fibrinogen genutzt, welches mit FITC konjugiert wurde (siehe II.6.2). Dieses wurde der eingestellten PRP-Suspension, bzw. den GFP vor der Aktivierungsphase hinzugefügt (siehe II.4.1 bis II.4.4), so dass es mit einer Endkonzentration von 150 µg/ml in der jeweiligen Suspension vorlag. Die Plättchen wurden damit für etwa 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Aktivierung und Fixierung wurde das nicht gebundene Fibrinogen-FITC entfernt, indem den Proben 500 µl PBS zugefügt und diese anschließend bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert wurden; anschließend wurde noch der Überstand abgesaugt. Dieses Entfernen von nicht gebundenen Bestandteilen wird auch als „waschen“ der Proben bezeichnet.

II.6.1.a Markierung von Fibrinogen, FVIIa, FVIII und FXIII mit Fluoresceinisothiocyanat

Die Konjugation von Fibrinogen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wurde nach einer leicht modifizierten Methode von Xia et al. (1996) durchgeführt.

Dazu wurden 10 mg humanes Fibrinogen (Kordia, Niederlande) und 5 mg FITC an Celite (10 %) (Calbiochem, Bad Soden) gemeinsam in 4,5 ml PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst. Der Lösung wurden außerdem 24 µl Natriumhydrogencarbonat (5 %) und 0,5 ml Natrium-Citratlösung (3,13 %) (Fresenius, Bad Homburg) hinzugefügt. Die Lösung wurde ausgiebig auf dem Vortexer vermischt und anschließend für 24 Stunden (h) bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4° C auf einem Schüttler und im Dunkeln inkubiert. Danach wurden nicht gelöste Bestandteile bei 13.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das erwünschte mit FITC konjugierte Fibrinogen wurde mittels Gelfiltration von dem Celite-gebundenen FITC in der Lösung getrennt. Als Material für die Gelsäule wurde Sephadex G25 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Upsala (S)) genutzt, welches zuvor mit PBS-Puffer (pH 7,4) äquilibriert wurde.

Die humanen Gerinnungsfaktoren VIIa, VIII, und XIII wurden jeweils im Verhältnis 2:1 in TBS-Puffer (pH 7,4) gelöst (hier zum Beispiel 1 mg/ml vom jeweiligen Protein mit 0,5 mg/ml FITC an Celite (10 %) in TBS-Puffer). Diese Lösung wurde für 24 h, bei 4° C, mäßigem Schütteln und im Dunkeln inkubiert. Auch hier wurden nicht gelöste Bestandteile abzentrifugiert (13.000 x g, 10 min) und der Überstand über eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Gelsäule gegeben (Säulenmaterial: Sephadex-G25 (s. o.); PD-10-Säulen, Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frankfurt/M.), wodurch das überschüssige FITC-Celite von dem jeweiligen FITC-konjugierten Protein separiert wurde.

Lösungen:

-PBS-Puffer: (pH 7,4)	siehe II.4.1	4,5	ml
-Natriumhydrogencarbonat-Lösung:	5 %	0,024	ml
-Natriumcitrat-Lösung:	3,13 %	0,5	ml
-TBS-Puffer: (pH 7,4)	TRIS	10	mM
	NaCl	150	mM

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen kann allgemein mit Hilfe des BCA-Tests erfolgen; hier wurde das Pierce® BCA Protein Assay Kit verwendet (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (IL, USA)); dieser Test basiert auf der von Smith et al. (1985) und Wiechelmann et al. (1988) beschriebenen Methode mit Verwendung der Bicinchinonsäure (BCA). Dieses Reagenz ist eine Detektionssubstanz für einwertige Kupferionen (Cu^+), die in alkalischem Milieu entstehen, indem sie in ihrer zweiwertigen Form durch Proteine reduziert werden. Die Cu^+ -Ionen komplexieren mit BCA, so dass sich ein violetter Farbkomplex bildet. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration in der Probenlösung wurde eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt, hier wurde BSA (Bovines Serumalbumin, Fraktion V; Sigma-Aldrich, Steinheim) genutzt. Jeweils 25 μl der BSA-Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 50 $\mu\text{g/ml}$ bis 1200 $\mu\text{g/ml}$ wurden in die „wells“ einer 96-Well-Platte vorgelegt; ebenso wurden 25 μl der Probenlösung unbekannter Konzentration in eines dieser „wells“ pipettiert. Für den Leerwert und als Verdünnungslösung wurde die entsprechende Trägerlösung verwendet, in dem sich auch das Protein befand, dessen Konzentration bestimmt werden soll. Nach Zugabe von 200 μl BCA-Reagenzlösung und einer Inkubationszeit von 30 min bei 37° C, erfolgte dann die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm, mit der die Intensität der Farbkomplexe in den verschiedenen „wells“ entsprechend der unterschiedlichen Proteinkonzentration gemessen werden konnte.

Nach der Methode von Peters und Baumgartner (1990) wurde zusätzlich das FITC/Protein-Verhältnis (F/P-Ratio) bestimmt. Dafür wurde die optische Dichte (OD) der Proteinlösung bei 280 nm und 495 nm in einem Photometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frankfurt/M) gemessen.

Die F/P-Ratio wurde wie folgt berechnet:

$$F/P \text{ (molar)} = \frac{OD_{495} \times \epsilon \text{ (Fibrinogen)} \times MG \text{ (Fibrinogen)}}{(\epsilon \text{ (FITC)} \times MG \text{ (FITC)} \times (OD_{280} - 0,35 \times OD_{495}))}$$

$$F/P \text{ (molar)} = \text{Anzahl der FITC-Molekül pro Proteinmolekül}$$

$$\text{Extinktionskoeffizient } \epsilon \text{ (Protein)} = \frac{OD_{280} - (0,35 \times OD_{495})}{\text{Proteinkonzentration [mg/ml]}}$$

$$\text{Extinktionskoeffizient } \epsilon \text{ (Fibrinogen)} = 1,4$$

$$\text{Extinktionskoeffizient } \epsilon \text{ (FITC)} = 200$$

$$\text{Molekulargewicht (MG) (Fibrinogen)} = 333.000 \text{ Da}$$

$$\text{MG (FITC)} = 390 \text{ Da}$$

Im Durchschnitt binden fünf bis sieben FITC-Moleküle an ein Fibrinogenmolekül.

II.6.2 Aggregometrie

Neben der durchflusszytometrischen Methode kann man die Aktivierung der Thrombozyten mit der Bindung von Fibrinogen an diese auch mit Hilfe der Aggregometrie detektieren. Der Unterschied bei dieser Methode ist allerdings, dass hier die Aggregation der Plättchen für die Messbarkeit notwendig ist, während sie für die Durchflusszytometrie nicht erwünscht ist. Denn mit dieser Methode sollen ja spezifisch Rezeptoren oder andere Bindungsstellen mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern markiert und somit nachgewiesen werden; diese könnten aber im Falle einer Aggregatbildung nicht oder nur zu einem wesentlich geringeren Anteil an die Rezeptoren binden.

Für die Messung der Aggregation der Blutplättchen wurde ein Aggregometer P.I.C.A. (Chrono-Log, Nobis, Endingen) genutzt und der Versuch nach der Methode von Born (1962) durchgeführt.

PRP wurde mit Hilfe von autologem PPP auf 300.000 Tz/ μ l eingestellt. 500 μ l dieser Suspension wurden in eine silanisierte Glasküvette gegeben und zunächst für 5 min bei 37° C erschütterungsfrei vortemperiert. Dann wurde diese Küvette zusammen mit einer

Zweiten in die Messkammer gestellt; in der zweiten Küvette befanden sich als Referenz 500 µl PPP. Der PRP-Küvette wurde noch ein Mini-Stirrer hinzugefügt - ein kleiner Stabmagnet, der die Suspension bei konstanter Geschwindigkeit rührte (1000 rpm und bei 37° C). Das Aggregometer wurde mit dem Zwei-Kanal-Schreiber REC 102 (Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frankfurt/ M.) verbunden, welches die im Aggregometer photometrisch (bei 600 nm) erfasste Lichttransmission in Abhängigkeit von der Zeit aufzeichnete. Zunächst befand sich die PRP-Küvette ohne Zusatz von Agonisten im Aggregometer und die dazu gemessene Lichttransmission bildete den Basiswert, der noch eine sehr geringe Lichttransmission anzeigt. Nach etwa 1 min wurde ein Agonist hinzugefügt, so dass die Blutplättchen aktiviert wurden und aggregierten mit gleichzeitiger Zunahme der Lichttransmission.

Für jede Eap-Konzentration (hier in einem Bereich von 0,5 µg/ml bis 2,5 µg/ml vorgelegt) wurde so zunächst der Basiswert bestimmt und darauffolgend die Agonist-induzierte Transmissionszunahme gemessen.

Lösungen:

- Eap-Stammlösung: siehe II.4.1
- Plättchenarmes Plasma (PPP): siehe II.3.4

II.6.3 Sekretion der α -Granula

P-Selektin (CD62P) ist ein Protein der Granulamembran, welches im Rahmen der Plättchenaktivierung mit der α -Granula-Sekretion auf die Zellmembranoberfläche transloziert wird. Es kann somit als Marker für die Sekretion der α -Granula im Zuge einer Thrombozytenaktivierung genutzt werden und mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper durchflusszytometrisch erfasst werden.

Die Plättchenaktivierung erfolgte in PRP wie in II.4.1 beschrieben, bevor den fixierten und „gewaschenen“ Proben jeweils 5 µg/ml des Antikörpers anti-CD62P-FITC (Klon CLB-thromb/6) hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Proben für 1 h, bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken inkubiert, bevor sie erneut gewaschen und dann im Durchflusszytometer gemessen wurden.

Lösung:

- Formaldehydlösung (1%): siehe II.4.1

II.6.6 Expression von CD154 (CD40 Ligand, CD40L)

CD40L wird mit der Aktivierung der Plättchen aus dem Zytosol und den α -Granula freigesetzt und auf der Plättchenoberfläche exprimiert. Neben der Expression auf den Thrombozyten kommt es auch auf CD4⁺T-Zellen, stimulierten Mastzellen und Basophilen vor. Der entsprechende Rezeptor (CD40) befindet sich außer auf den Plättchen, auch noch auf B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Der CD40 Ligand hat eine zentrale Funktion in der Immunglobulin-vermittelten Abwehr, indem es die Interaktion zwischen den beteiligten Zellen, wie zum Beispiel zwischen B- und T-Zellen, Monozyten, T-Zellen und Plättchen, vermittelt (Henn et al., 1998). CD40L wird nach einiger Zeit von der Thrombozytenoberfläche abgespalten.

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte wie zuvor beschrieben in PRP (II.4.1), allerdings wurden die Plättchen diesmal nicht fixiert, da die Rezeptoren sehr empfindlich sind und das CD40L zudem relativ schnell von der Thrombozytenoberfläche abgespalten wird.

Nach der Aktivierung wurden 5 $\mu\text{g/ml}$ des monoklonalen, Pe-konjugierten anti-CD40L-Antikörpers den 100 μl -Ansätzen hinzugefügt. Die Proben wurden für 15 min, ruhig stehend, bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 500 μl PBS-Puffer durchflusszytometrisch gemessen.

Lösungen:

-PBS-Puffer: siehe II.4.1
(pH 7,4)

II.6.7 Prokoagulanter Zustand

Mit der Aktivierung der Thrombozyten wird durch den „Flip-Flop“-Effekt die Phospholipidverteilung der äußeren und inneren Phospholipidschicht der Zytoplasmamembran verändert, so dass vermehrt PS in der äußeren Lipidschicht lokalisiert wird. Das PS verleiht der Membran nach außen eine stärkere negative Gesamtladung, die für die Bindung der Gerinnungsfaktoren, speziell für die Tenase (FVIIIa/FIXa)- und Prothrombinasekomplexe (FXa/FVa/Prothrombin), und somit für eine ausreichende Thrombinentstehung essenziell ist (Shapira et al., 1997).

Bei einer sehr starken Aktivierung der Blutplättchen wird die prokoagulante Oberfläche durch die Bildung von Mikropartikeln noch vergrößert und somit das hämostatische Potenzial verstärkt (siehe II.6.7).

II.6.7.a Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von Annexin-V-FITC

Annexin-V-FITC bindet mit hoher Affinität und in Abhängigkeit von Ca^{2+} an Phosphatidylserinreste, so dass man mit dieser Substanz den prokoagulanten Zustand der Thrombozytenoberfläche nachweisen kann.

Für diesen Versuch wurden GFP mit H/T-Puffer (+ 6 mM CaCl_2) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt. Das Eap wurde in den bisher genutzten Konzentrationen in die Röhrrchen vorgelegt und jeweils 100 μl des GFP-Ansatzes dazupipettiert. Die Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur massiv geschüttelt und im Folgenden mit Annexin-V-FITC (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Bender Medical Systems, Wien (A)) für 15 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Bevor die Proben durchflusszytometrisch gemessen wurden, wurde noch einmal 500 μl H/T-Puffer hinzugefügt.

Lösungen:

-Hepes/Tyrode (H/T)-Puffer:	siehe II.4.1
(pH 7,4)	hier mit Zusatz von CaCl_2 : 6 mM

II.6.7.b Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FVIIa-FITC

Der GFP-Ansatz für diesen Versuch wurde zunächst mit H/T-Puffer (+ 6 mM CaCl_2) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt. Nach dem Zusatz von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Faktor VIIa (Novoseven® von Novo Nordisk, Bagsvaerd (DK)), der in unserem Labor mit FITC konjugiert wurde, und einer Inkubationszeit von 5 min, wurden Aliquots von jeweils 100 μl des GFP-Ansatzes den verschiedenen Eap-Konzentrationen in den Probenröhrrchen hinzugefügt. Zunächst für 20 min bei Raumtemperatur massiv geschüttelt, wurden die Proben dann mit 500 μl H/T-Puffer verdünnt und gemessen.

Lösungen:

-Faktor VIIa-FITC-Stammlösung:	in TBS-Puffer (pH 7,4)	514 $\mu\text{g}/\text{ml}$
-H/T-Puffer:	siehe II.4.1	
(pH 7,4)	hier mit Zusatz von CaCl_2 :	6 mM

II.6.7.c Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FVIII-FITC

Wie in II.6.6 beschrieben bindet FVIIIa zusammen mit FIXa als Tenase-Komplex an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten, so dass diese Bindung mit Hilfe des rekombinanten FITC-konjugierten Faktor VIII (Beriate® von Novartis-Behring (Marburg)), nachgewiesen werden kann. Die Versuchsdurchführung erfolgte hier analog zu II.6.7b und es wurde FVIII-FITC mit einer Konzentration von 20 µg/ml dem GFP-Ansatz hinzugefügt.

Lösungen:

-Faktor VIII-FITC-Stammlösung:	in TBS-Puffer (pH7,4)	550 µg/ml
-H/T-Puffer:	siehe II.4.1	
(pH 7,4)	hier mit Zusatz von CaCl ₂ :	6 mM

II.6.7.d Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FXIII-FITC

FXIII wird durch Thrombin zu FXIIIa aktiviert und polymerisiert das durch Thrombin gebildete Fibrin.

Die Versuchsdurchführung erfolgte hier analog zu II.6.7b und der mit FITC konjugierte FXIII (Fibrogammin® von Centeon, Wien (A)) wurde mit einer Konzentration von 200 µg/ml dem GFP-Ansatz hinzugefügt.

Lösungen:

-Faktor XIII-FITC-Stammlösung:	in TBS-Puffer (pH 7,4)	1000 µg/ml
-H/T-Puffer:	siehe II.4.1	
(pH 7,4)	hier mit Zusatz von CaCl ₂ :	6 mM

II.6.8 Mikropartikelbildung

Werden die Thrombozyten durch sehr starke Agonisten massiv aktiviert, kann dies die prokoagulante Aktivität erhöhen, indem kleine Membranvesikel von den Plättchen abgeschnürt werden. Mit einem großen Membran- und geringen Zytoplasmaanteil und ihrem Vorkommen in großer Zahl vermitteln sie eine starke Vergrößerung der prokoagulanten Oberfläche. Auf diesen Mikropartikeln befinden sich ebenfalls prokoagulante Komplexe und zahlreiche Rezeptoren bzw. andere Bindungsmöglichkeiten für die Gerinnungsfaktoren, wie sie auch auf den Thrombozyten vorhanden sind (Barry, 1998).

Diese Partikel können ebenfalls qualitativ und quantitativ anhand von spezifisch bindenden Antikörpern und ihrer geringen Größe durchflusszytometrisch erfasst werden. Hier erfolgte der Nachweis der Mikropartikel mit Hilfe des Thrombozyten-spezifischen Antikörpers anti-CD42a-FITC (Klon Beb1). So konnten andere Fremdpartikel von den Thrombozyten und den Mikropartikeln differenziert werden.

Für diesen Versuch wurden GFP mit H/T-Puffer (+ 6 mM CaCl_2) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt. Das Eap wurde in den bisher genutzten Konzentrationen in die Probenröhrchen vorgelegt und jeweils 100 μl des GFP-Ansatzes dazupipettiert. Die Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur massiv geschüttelt, daraufhin mit je 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD42a-FITC versehen und für 15 min bei leichtem Schwenken, Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Bevor sie durchflusszytometrisch gemessen wurden, wurde noch einmal 500 μl H/T-Puffer hinzugefügt. Anhand der FSC-Signalstärke konnten die intakten Zellen und die gebildeten Mikropartikel in jeweils ein „Gate“ eingegrenzt und differenziert werden; auch der jeweils prozentuale Anteil ist damit zu berechnen.

Lösungen:

-Hepes/Tyrode (H/T)-Puffer:	siehe II.4.1	
(pH 7,4)	hier mit Zusatz von CaCl_2 :	6 mM

II.7 Einfluss von Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Thrombozytenaktivierung

Für diese Versuche wurden die Thrombozyten wie in II.3.1 und II.3.2 beschrieben präpariert und anschließend mit Eap aktiviert (siehe II.4.1). Die Antikoagulantien wurden jeweils in die Blutabnahmeröhrchen vorgelegt, um die Thrombozyten direkt bei der Blutabnahme mit dem Antikoagulanzen zu inkubieren.

II.7.1 Komplexbildner

Komplexbildner werden vor allem für Laborzwecke eingesetzt, um ungeronnenes Blut im Labor untersuchen zu können. Aber auch bei der Behandlung von Metallvergiftungen kommen Komplexbildner wie $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ zum Einsatz.

Komplexbildner haben die Eigenschaft, mit Kationen (mindestens zweiwertig) stabile Komplexe zu bilden, sogenannte Chelatkomplexe im Verhältnis 1:1. EDTA und Citrat gehen dabei eine Verbindung mit Ca^{2+} ein, so dass dieses für die Blutgerinnung essentielle Kation dafür nicht mehr zur Verfügung steht. Das Kalium-EDTA und Tri-Natriumcitrat liegen jeweils

bereits in den kommerziellen Blutabnahmeröhrchen vor und wurden in diesen Versuchen ebenfalls in dieser Form genutzt.

Lösungen:

-Tri-Natriumcitrat-Stammlösung:	110 mM
-Kalium-EDTA-Stammlösung:	1,6 mg/ml

II.7.2 Hirudin

Dieses Polypeptid stammt aus dem medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*) und hat anti-koagulatorische Eigenschaften; heute wird der Thrombininhibitor synthetisch hergestellt. Die Primärstruktur der Hirudinvariante-1 besteht aus 65 Aminosäuren und ist damit ein relativ kleines Protein mit ca. 7.000 Da.

Hirudin bindet an die Fibrinogenbindungsstelle des Thrombins, hemmt damit das aktive Zentrum der Serinprotease und somit die Fibrinogenspaltung zu Fibrin. Es wird vor allem bei Patienten mit HIT-Typ II eingesetzt.

Nachteile dieses Antikoagulanz sind, dass es die Plazentaschranke passieren kann und auch in die Muttermilch gelangt. Außerdem muss bei Hirudin, wie auch bei Heparinen und Vitamin K - Antagonisten, ein frequentes Monitoring der Gerinnungsparameter erfolgen, und es gibt für Hirudin kein spezifisches Antidot.

Das Lepirudin (Refludan® von Pentapharm, Basel (CH)) wurde mit einer Konzentration von 5 U/ml in das Blutabnahmeröhrchen vorgelegt.

Lösung:

-Hirudin-Stammlösung: Wirkstoff: Lepirudin (Hirudin-1) 250 U/ml

II.7.3 Melagatran

Melagatran ist ein direkter Thrombin-Inhibitor, der an die enzymatisch aktive Molekülregion des löslichen und thrombusgebundenen α -Thrombins bindet. Durch diese reversible Bindung verhindert es sowohl die thrombinvermittelte Aktivierung der Gerinnungsfaktoren als auch die Fibrinogenspaltung zu Fibrin.

Ursprünglich sollte es Warfarin, Aspirin und Heparin ersetzen, die zur Prophylaxe und Behandlung von thromboembolischen Komplikationen eingesetzt werden.

Ein Vorteil von Melagatran wäre die orale Einnahme, mit einer konstanten Dosis und schnellem Wirkungseintritt, ohne dass die Gerinnungsparameter hätten überwacht werden müssen.

Ein Nachteil von Melagatran wäre, dass kein Antidot vorhanden ist. Außerdem traten bei einer Langzeit-Therapie unerwünschte Nebenwirkungen in Form von Leberschäden auf, deren Mechanismus bisher allerdings ungeklärt bleibt. Somit ist es zurzeit nur als Kurzzeitprophylaxe gegen venöse Thromboembolien zugelassen, die sich häufig nach orthopädischen Operationen entwickeln.

In diesem Versuch wurde dem Blutabnahmeröhrchen Melagatran-Injektionslösung (AstraZeneca (London, GB)) mit einer Konzentration von 1,5 μM hinzugefügt.

Lösung:

-Melagatran-Injektionslösung: 23,3 mM
oder 3,0 mg/0,3 ml

II.7.4 Heparine

Es gibt zwei Arten des Heparins: unfraktioniertes Heparin (UFH) und niedermolekulares Heparin (NMH). Für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von thromboembolischen Erkrankungen sind es unentbehrliche Arzneistoffe.

Das UFH ist aus Mukopolysaccharid-Ketten aufgebaut und variiert stark in seinem Molekulargewicht (3.000-30.000 Da); es besitzt eine Kettenlänge von 18 oder mehr Monosacchariden. Das NMH wird durch chemische und enzymatische Spaltung aus dem UFH hergestellt, welches dann ein mittleres Molekulargewicht von 4.000-5.000 Da und eine Kettenlänge von fünf bis siebzehn Monosacchariden aufweist.

Die anti-thrombotische Wirkung des Heparinmoleküls wird vor allem durch die Pentasaccharidsequenz aus Iduronsäure-Glukosamin-Glukuronsäure vermittelt. Als Substituenten sind häufig die Sulfatgruppen der Iduronsäure und des Glukosamins, sowie das N-acetylierte D-Glukosamin vorhanden. Diese Substituenten in der Pentasaccharidsequenz - auch „high-affinity-region“ genannt - verstärken die negative Ladung des Heparinmoleküls und erleichtern so dessen Anlagerung an positiv geladene Lysingruppen des Antithrombins, wodurch dieses aktiviert wird.

Für eine Hemmung des Thrombins ist die Bildung dieses Komplexes aus Antithrombin, Thrombin und Heparin notwendig, dagegen reicht für die Inaktivierung von FIXa und Xa die Bindung von Heparin an Antithrombin aus.

UFH bildet aufgrund seiner Größe und seiner negativen Ladung Komplexe mit Kationen und hat so neben der direkten Gerinnungshemmung auch eine indirekte Wirkung. Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen wird stimuliert, so dass aus Letzteren der TFPI und das antikoagulatorisch wirksame Heparansulfat freigesetzt werden.

Außerdem wird t-PA („tissue plasminogen activator“) aus den Endothelzellen freigesetzt, welches die Fibrinolyse induziert.

Bei der Behandlung mit Heparin treten auch unerwünschte Nebenwirkungen auf, wie die Heparin induzierte Thrombozytopenie (HIT), Osteoporose und allergische Reaktionen. Es werden zwei Formen der HIT unterschieden:

HIT Typ I ist die nicht-immunologische Form, induziert durch die direkte Bindung von Heparin an den Thrombozyten. HIT Typ I ist auch von geringerer Relevanz, da sich die Thrombozytenzahlen bei Fortsetzung der Therapie wieder normalisieren.

HIT Typ II dagegen ist immunologisch bedingt und wird durch Antikörper verursacht, die gegen den Komplex aus Heparin und PF4 gebildet werden, die zusammen ein Neoantigen bilden. Die Antikörper lagern sich an den FcγRIIa-Rezeptoren von aktivierten Thrombozyten an und verknüpfen diese mit dem Neoantigen, mit massiver Thrombozytenaktivierung.

Durch die nachfolgende Aggregation werden Massen von Thrombozyten verbraucht mit der Folge einer Thrombozytopenie.

In ein Blutabnahmeröhrchen wurden 20 U/ml an NMH (Fragmin®, Pfizer (Berlin)) vorgelegt und in ein weiteres 5 I.E./ml Blut an UFH (Heparin-Natrium®, ratiopharm (Ulm)).

Lösungen:

-Fragmin® -Stammlösung: Wirkstoff: Dalteparin-Natrium 250 U/ml

-Heparin-Natrium® -Stammlösung: 5.000 I.E./ml Injektionslösung

II.8 Einfluss von thiolreaktiven Substanzen auf die Eap-induzierte Thrombozytenaktivierung

II.8.1 pCMPS und DTNB

Para-Chloromercuriphenylsulfonat (pCMPS) und 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic-acid) (DTNB) sind Reagenzien, welche die Zellmembran nicht permeieren und mit freien Thiolgruppen auf der Zelloberfläche interagieren. Solche werden auch in der extrazellulären Domäne des aktivierten GPIIb/IIIa exprimiert, welcher für die Plättchenaggregation essentiell ist.

Für diesen Versuch wurde pCMPS (Toronto Res. Chem. Inc., North York (ON, Can.)) mit Konzentrationen von 25 µM bis 200 µM zusammen mit Eap in die Ansatzröhrchen vorgelegt. DTNB (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde im Konzentrationsbereich von 2,0 mM bis 7,5 mM zusammen mit Eap vorgelegt. Bei beiden Probenreihen erfolgte auch hier die Plättchenaktivierung wie in II.4.1 beschrieben.

Lösungen:

-pCMPS-Stammlösung:	20 mM
gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung	
-DTNB-Stammlösung:	100 mM
gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung (pH 5-6)	

II.8.2 Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Peptid, das aus drei Aminosäuren besteht: Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Es ist eines der wichtigsten Antioxidantien im Körper und alle Zellen sind fähig, diesen Stoff zu synthetisieren. Darüber hinaus stellt GSH eine unentbehrliche Quelle für Cystein dar.

Seine Funktion als Antioxidans verdankt das GSH seinen freien Thiolgruppen, indem es Elektronen auf freie Radikale (reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) überträgt und diese dadurch unschädlich macht. Dabei wird GSH oxidiert und geht durch Ausbildung einer Disulfidbrücke von seiner monomeren (GSH) in die dimere Form (GSSG) über.

Dieser Vorgang ist reversibel und die Glutathion-Reduktase kann das GSH unter Verbrauch von NADPH wiederherstellen.

Auf diese Weise schützt das Glutathion die Zellstrukturen, wie Proteine und Membranlipide vor den ROS, die bei der Zellatmung entstehen können.

In der Blutgerinnung hat das GSH eine Funktion als physiologischer Inhibitor bzw. Regulator der Thrombozytenaktivität.

In diesem Versuch wurde GSH (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit Konzentrationen von 5 μ M bis 50 μ M zusammen mit Eap in die Ansatzröhrchen vorgelegt und im Folgenden die Plättchensuspension hinzugefügt (Aktivierungsschema von II.4.1).

Lösungen:

-Glutathion-Stammlösung:	20 mM
gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung	

II.8.3 Gliotoxin

Das Mykotoxin Gliotoxin wird in erster Linie von *Aspergillus fumigatus*, aber auch von anderen Schimmelpilzen gebildet. Es hat eine immunsuppressive und zytotoxische Wirkung, außerdem ist es ein Antagonist des PAF, der in Fibroblasten, Leukozyten, Endothelzellen, Mono- und Thrombozyten gebildet wird und, wie sein Name besagt, auch stimulierend auf die Plättchen wirkt. Gliotoxin inhibiert eine Vielzahl von Wirtsproteinen, indem es mit Hilfe seiner intramolekularen Disulfidbrücke gemischte Disulfide mit diesen bildet.

Bei diesem Versuch wurde Gliotoxin (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit Konzentrationen von 250 nM bis 2000 nM verwendet und zusammen mit Eap in die Ansatzröhrchen vorgelegt, um darauffolgend die Plättchen damit zu aktivieren (siehe II.4.1).

Lösung:

-Gliotoxin-Stammlösung: 10 mM
gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO)

II.8.4 Phenylarsinoxid

Phenylarsinoxid (PAO) hat die Eigenschaft, Tyrosin-Phosphatasen zu hemmen. Diese vermitteln wie Enzym-gekoppelte Rezeptoren eine Signaltransduktion und können auch als Transmembranrezeptoren fungieren. Es interagiert mit Proteinen, welche benachbarte Thiolgruppen enthalten, um mit diesen einen stabilen, heterozyklischen Ring zu bilden.

Analog zu den anderen Modulatoren wurde PAO (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Konzentrationen von 25 nM bis 200 nM zusammen mit Eap in die Ansatzröhrchen vorgelegt und die Plättchen darin inkubiert.

Lösungen:

-Phenylarsine Oxide -Stammlösung: 10 mM
gelöst in DMSO

II.8.5 Bacitracin

Dieser Wirkstoff ist ein Polypeptid-Antibiotikum, welcher bei Gram-positiven Bakterien (z. B. Staphylokokken) die Mureinsynthese der Zellwand hemmt. Entsprechend zeigt es keine Wirkung bei Gram-negativen Bakterien und Pilzen. Das Antibiotikum ist heute nur noch zur äußerlichen Anwendung zugelassen, da es eine starke Nephrotoxizität besitzt.

Bacitracin hemmt spezifisch die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), die sich auch auf der Oberfläche von Plättchen befindet. Die PDI katalysiert unter anderem den Disulfid-Austausch am GPIIb/IIIa-Integrin; dieser ist für die Plättchenaggregation essentiell, die mit der PDI-Hemmung also ebenfalls unterbunden wird (Lahav et al., 2000).

In diesem Versuch wurde Bacitracin in Konzentrationen von 1,25 mM bis 10 mM zusammen mit Eap in die Ansatzröhrchen vorgelegt; die Inkubation der Thrombozyten und die weitere Verarbeitung erfolgten wie in II.4.1 beschrieben.

Lösung:

-Bacitracin-Stammlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim): 100 mM
gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung

II.9 Statistische Auswertung aller experimentellen Daten

Die logarithmisch erfassten Daten wurden zunächst in Diagrammen dargestellt, in denen das Fluoreszenz-Signal (Ordinate) gegen die Konzentration des Agonisten (Abszisse) aufgetragen wurde. Die logarithmischen Kurven spiegeln die Signalstärke der Hauptpopulation (Median) im Verhältnis zur Agonistenkonzentration wider. Im Folgenden wurden die Medianwerte entlogarithmiert und in lineare Werte transformiert, welche anschließend noch gemittelt wurden. Diese Mittelwerte kann man miteinander vergleichen und gelten als signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$ ist. Die Berechnung von p erfolgte mit dem Student'schen t-Test für ungepaarte Stichproben und mit Hilfe des Programms SigmaStat (Jandel Corporation), Version 2.0.

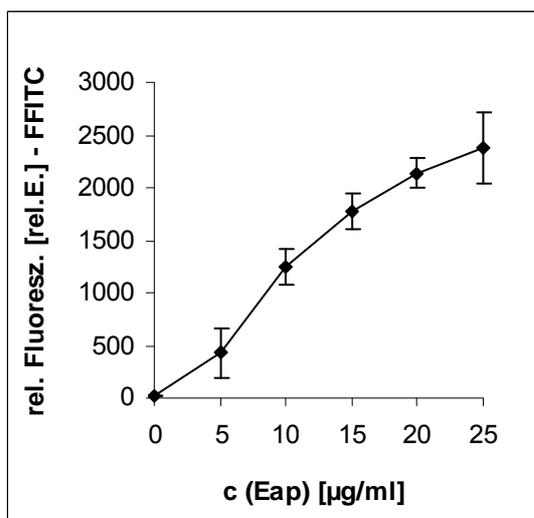
III. Ergebnisse

III.1 Untersuchungen zum Einfluss von Eap auf Thrombozyten

Mit Hilfe von Proteinen, die mit FITC markiert sind, werden Proteinbindungsstellen auf den Blutplättchen qualitativ und quantitativ detektierbar, falls diese aktivierungsabhängig auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert werden.

III.1.1 Eap-induzierte Fibrinogenbindung an humane Thrombozyten

Dem eingestellten PRP-Ansatz (50.000 Tz/ μ l) wurde 150 μ g/ml humanes, FITC-konjugiertes Fibrinogen hinzugefügt. Darauf folgend wurden je 100 μ l dieses Ansatzes für 5 Minuten (min) mit Eap inkubiert.

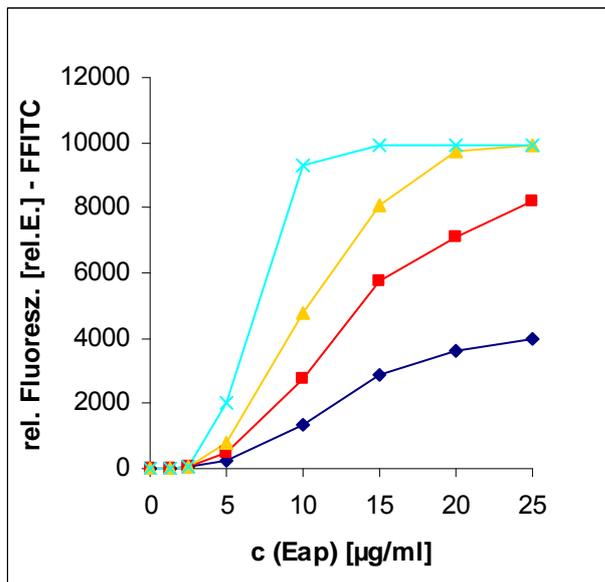


In Abbildung III.1 wird deutlich, dass Eap die Bindung von Fibrinogen-FITC induziert. Dabei nimmt die Signalstärke mit Anstieg der Agonistenkonzentration zu. Der Median des Fluoreszenzsignals, das von FITC ausgeht, gibt dabei die Signalintensität der Hauptpopulation der Plättchen wider.

Abb. III.1: Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.

Thrombozyten im PRP (50.000 Tz/ μ l) wurden 5 min mit 150 μ g/ml Fibrinogen-FITC und anschließend weitere 5 min mit Eap inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die Werte stellen jeweils die Mittelwerte der linearen Mediane \pm S.D. (n=3) dar.

Um feststellen zu können, ob die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC-Bindung zeitabhängig ist, wurde eine Zeit-Dosis-Kinetik erstellt. Das Fibrinogen-FITC wurde hier ebenfalls dem PRP-Ansatz hinzugefügt und anschließend 5 min mit Eap aktiviert. In Abhängigkeit von der



Inkubationszeit und der Agonistendosis ist ein Anstieg in der Signalstärke, also auch in der Bindung von Fibrinogen-FITC zu verzeichnen (Abb. III.2).

Abb. III.2: Zeitabhängigkeit der Eap-induzierten Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten. PRP (50.000 Tz/µl) wurde zunächst mit Fibrinogen-FITC versetzt und anschließend für 5, 15, 30 und 60 min mit Eap (1,25-25 µg/ml) inkubiert. Die Proben wurden dann durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte stellen die linearen Mediane dar.

◆ = 5 min ■ = 15 min ▲ = 30 min × = 60 min

Um festzustellen, ob Eap die Thrombozyten auch in Abwesenheit weiterer Plasmabestandteile, wie der Gerinnungsfaktoren, aktiviert, wurde der gleiche Versuch auch mit gelfiltrierten Plättchen (GFP) durchgeführt.

Auch dem eingestellten GFP-Ansatz (25.000 Tz/µl) wurde 150 µg/ml FITC-konjugiertes Fibrinogen hinzugefügt. Anschließend wurden die GFP für 5 min mit Eap aktiviert.

Die Aktivierung von GFP und von Thrombozyten im PRP mit identischer Konzentration an Eap (25 µg/ml) und gleicher Aktivierungszeit von 5 min resultierte in einer signifikant stärkeren Bindung von Fibrinogen-FITC (***) $p < 0,001$) an GFP mit einer Signalstärke von über 6.000 relativen Einheiten. Währenddessen erzeugte Eap an Thrombozyten im PRP lediglich eine Bindungsstärke von Fibrinogen-FITC mit Fluoreszenzsignalen von über 2000 relativen Einheiten (Abb. III.3).

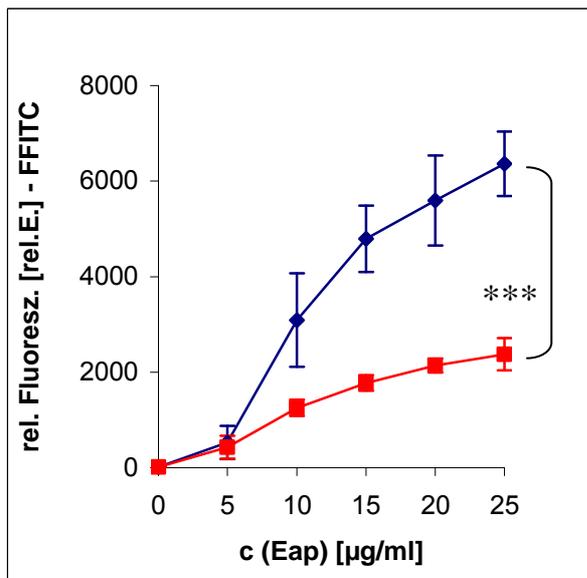


Abb. III.3: Einfluss von Plasma auf die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC Bindung an humane Thrombozyten. Dem PRP- und dem GFP-Ansatz wurden je 150 µg/ml Fibrinogen-FITC hinzugefügt und anschließend wurden Aliquots dieser Ansätze von je 100 µl für 5 min mit Eap (5-25 µg/ml) inkubiert. Die Proben wurden dann durchflusszytometrisch analysiert. Verglichen mit Thrombozyten im PRP induzierte Eap an GFP eine signifikant stärkere Bindung von Fibrinogen-FITC (***) $p < 0,001$. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

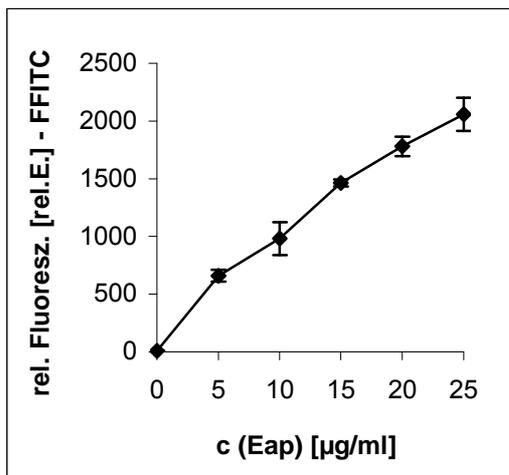
◆ = GFP ■ = PRP

III.1.2 Vergleich der Bindung von Fibrinogen an humane Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen

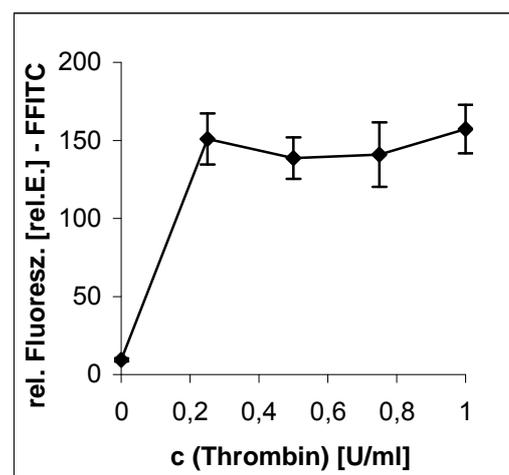
Um die Eap-induzierte Fibrinogenbindung mit der vergleichen zu können, die durch Thrombin, ADP und Kollagen induziert wird, sind jeweils drei Versuchsreihen mit diesen Agonisten in PRP durchgeführt worden.

Für die Thrombinreihe wurde dem PRP-Ansatz 150 µg/ml Fibrinogen-FITC und 1,2 mM GPRP hinzugefügt; den PRP-Ansätzen für die Aktivierung mit Eap, ADP und Kollagen wurden nur 150 µg/ml Fibrinogen-FITC hinzugegeben. Im Folgenden wurden Aliquots von jeweils 100 µl der PRP-Ansätze mit den entsprechenden Konzentrationen an Eap (5-25 µg/ml), Thrombin (0,25-1 U/ml), ADP (0,25-2 µM) oder Kollagen (0,4-2 µg/ml) für 5 min inkubiert. Auch hier zeigte sich in der durchflusszytometrischen Messung ein Anstieg der Fibrinogen-FITC-Bindung in Abhängigkeit von der Konzentration der entsprechenden Agonisten (Abb. III.4a) - d)).

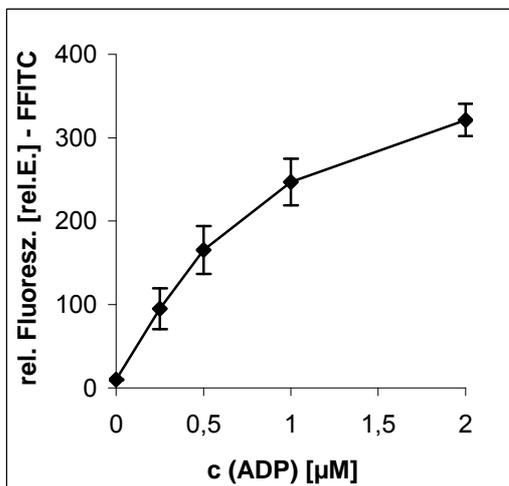
a)



b)



c)



d)

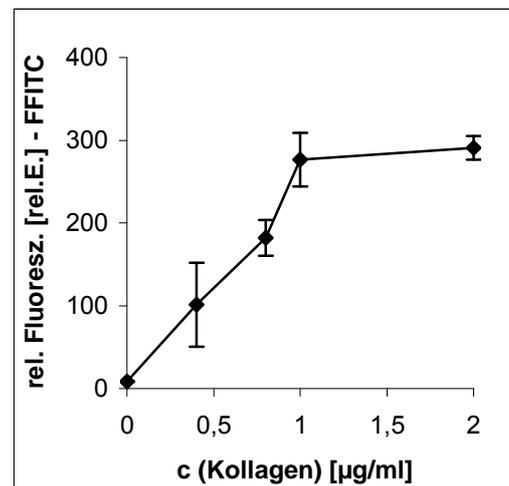


Abb. III.4a) - d): Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP oder Kollagen.

Dem PRP (50.000 Tz/µl) für die einzelnen Versuchsreihen wurde zunächst jeweils 150 µg/ml Fibrinogen-FITC hinzugefügt, dem PRP für die Thrombinreihen zusätzlich noch 1,2 mM GPRP. Daraufhin wurden die PRP-Ansätze für 5 min mit (a) Eap (5-25 µg/ml), (b) Thrombin (0,25-1 U/ml), (c) ADP (0,25-2 µM) oder (d) Kollagen (0,4-2 µg/ml) inkubiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte stellen jeweils die Mittelwerte der linearen Mediane +/- S.D. (n=3) dar.

Der direkte Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass die durch Eap hervorgerufene Fibrinogenbindung signifikant höher ausfiel als diejenige, die durch Thrombin, ADP oder Kollagen induziert wurde (***) ($p < 0,001$) (Abb. III.4e)).

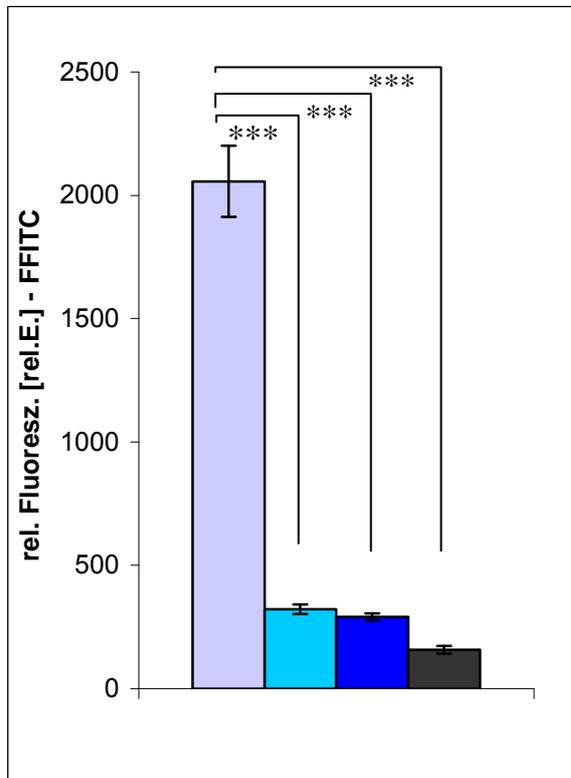


Abb. III.4e): Vergleich der Bindungsintensität von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten induziert durch verschiedene Agonisten.

Das PRP (50.000 Tz/µl) wurde mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC versetzt, für die Thrombinreihe zusätzlich mit 1,2 mM GPRP. Anschließend wurden die Proben 5 min mit Eap (5-25 µg/ml), Thrombin (0,25-1 U/ml), ADP (0,25-2 µM) oder Kollagen (0,4-2 µg/ml) inkubiert. Die Proben wurden dann durchflusszytometrisch analysiert. Im Vergleich zu ADP, Kollagen und Thrombin konnte Eap eine signifikant stärkere Fibrinogenbindung an humanen Thrombozyten induzieren (***) ($p < 0,001$).

Die ermittelten Maximalwerte der Fibrinogen-FITC-Bindung entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

■ = 25 µg/ml Eap ■ = 2 µg/ml Kollagen

■ = 2 µM ADP ■ = 1 U/ml Thrombin

III.1.3 Aggregometrie

Neben der durchflusszytometrischen Methode kann man die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten auch mit Hilfe der Aggregometrie messen. Die Aggregation wird durch Fibrinogen als Brückenmolekül vermittelt, so dass die Aggregatbildung ein indirektes Maß für die Fibrinogenbindung ist. Der Unterschied zur Durchflusszytometrie liegt darin, dass die Aggregation der Plättchen für diese Art der Messung notwendig ist.

Für diesen Versuch wurde die PRP-Suspension mit Hilfe von autologem PPP auf 300.000 Tz/ μ l eingestellt. Davon wurden 500 μ l in eine silanierte Glasküvette gegeben und zunächst für 5 min bei 37°C vortemperiert. Eine zweite Küvette mit 500 μ l PPP als Referenz wurde zusammen mit der ersten in die Messkammer des Aggregometers gestellt.

Bevor die jeweilige Eap-Konzentration hinzugefügt wurde, verblieben die beiden Küvetten dort zunächst für 1 min. Diese gemessene Lichttransmission vor der Eap-Zugabe bildete den Basiswert. Auf diese Weise wurde zunächst für jede Eap-Konzentration (hier in einem Bereich von 0,5 μ g/ml bis 2,5 μ g/ml) der Basiswert bestimmt und darauffolgend die Eap-induzierte Zunahme der Lichttransmission gemessen. Bevor jedoch die Messung für Eap als Agonist lief, wurden die Thrombozyten zunächst noch mit 0,5 U/ml Thrombin auf ihre Fähigkeit zur Aggregation getestet.

Die Lichttransmissionskurven, die in den Abbildungen III.5a) - e) dargestellt sind, zeigen einen unterschiedlich starken Anstieg der Lichttransmission infolge der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen an Eap. Im Gegensatz zu Thrombin (Abb. III.5a)) erfolgte die Aggregation durch Eap (Abb. III.5b) - e)) erst nach ca. 1 min. Die Aggregation verlief bei Eap, genauso wie bei Thrombin, monophasisch. Exemplarisch wird in den Abb. III.5a) - e) ein Ergebnis von drei Versuchsreihen dargestellt.

Der sehr starke Plättchenagonist Thrombin (Abb. III.5a)) diente hier als Referenz und induzierte den stärksten Anstieg der Lichttransmission und damit die stärkste Aggregation der Plättchen. Die Aggregation, induziert durch Eap in unterschiedlichen Konzentrationen, fiel geringer aus, wobei 2,5 μ g/ml Eap (Abb. III.5b)) die Lichttransmission am stärksten ansteigen ließ. Diese ließ sich auch durch eine höhere Konzentration an Eap nicht weiter steigern. Die Plättchenaggregation induziert durch 1,25 μ g/ml Eap (Abb. III.5c)) unterschied sich nur geringfügig von der Aggregation nach Zugabe von 2,5 μ g/ml Eap. 1 μ g/ml Eap (Abb. III.5d)) konnte dagegen nur noch eine sehr viel geringere Aggregation hervorrufen. 0,5 μ g/ml Eap (Abb. III.5e)) stellte sich als Schwellenwert heraus; diese Konzentration konnte nur noch eine sehr geringe Änderung der Lichttransmission gegenüber dem Basiswert hervorrufen.

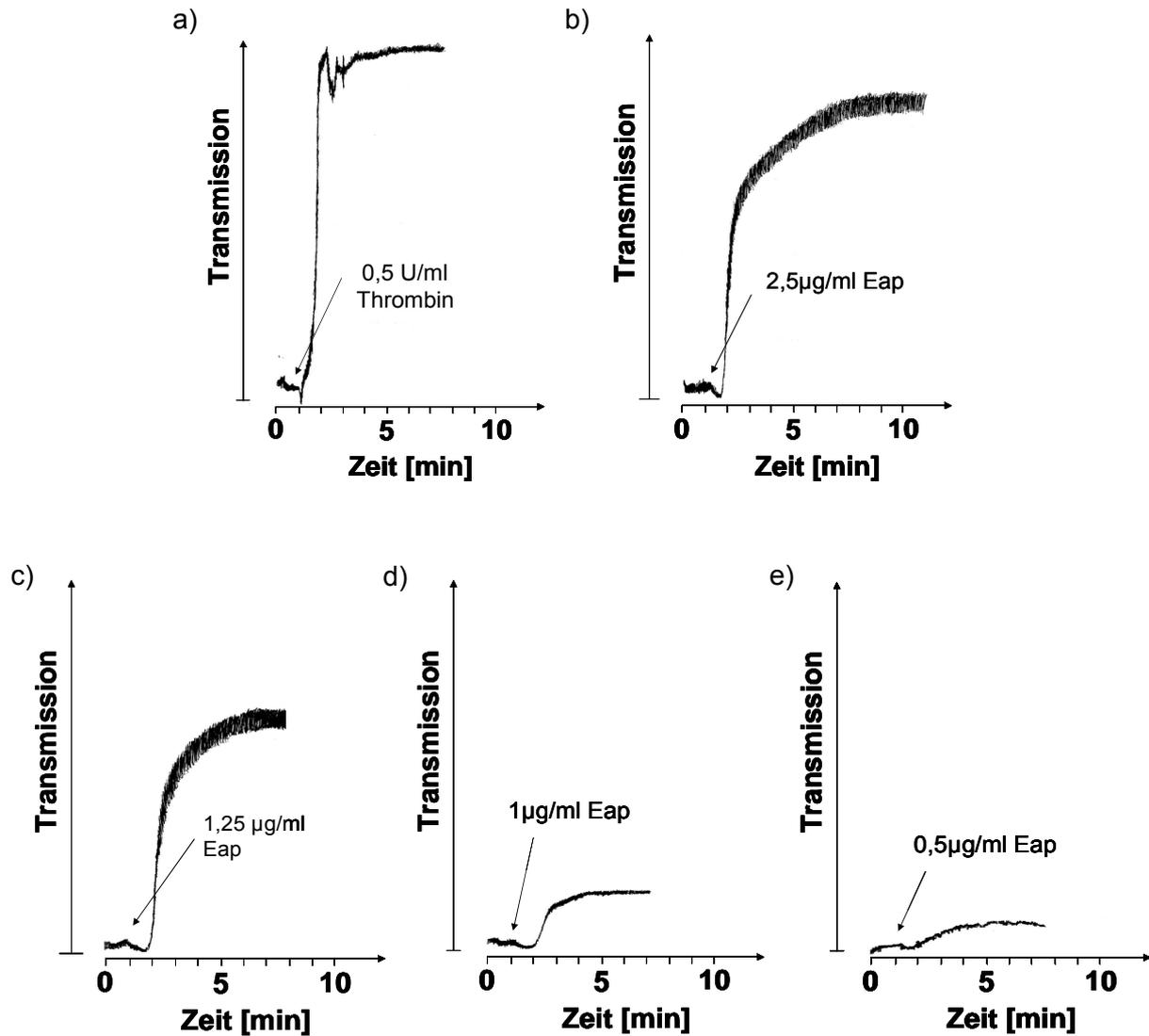


Abb. III.5a) - e): Eap-induzierte Aggregation von humanen Thrombozyten.

PRP, mit autologem PPP auf 300.000 Tz/ μ l eingestellt, wurde in einer silanisierten Glasküvette mit 0,5 U/ml Thrombin oder Eap (0,5-2,5 μ g/ml) aktiviert und der Verlauf der Plättchenaggregation anhand von Veränderungen der Lichttransmission mit einem Aggregometer verfolgt. Exemplarisch wird hier ein Ergebnis von drei Versuchsreihen dargestellt.

III.1.4 Eap-induzierte Sekretion der α -Granula aus humanen Thrombozyten

Mit der Aktivierung der Thrombozyten induzieren Agonisten wie Thrombin oder ADP die Sekretion der α -Granula. Durch die Agonist-induzierte Aktivierung der Plättchen kommt es zur Fusion der Granula- und der Zellmembranen, so dass das auf der Granulamembran vorhandene P-Selektin (CD62-P) an der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird. Um festzustellen, ob auch Eap die Sekretion der α -Granula auslöst, wurde den Probenröhrchen, in denen die Thrombozyten mit Eap inkubiert wurden, nach dem Fixieren und Waschen 5 $\mu\text{g/ml}$ FITC-konjugierter monoklonaler anti-CD62P-Antikörper hinzugefügt.

In der durchflusszytometrischen Messung zeigte sich eine dosisabhängige Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an Thrombozyten (Abb. III.6).

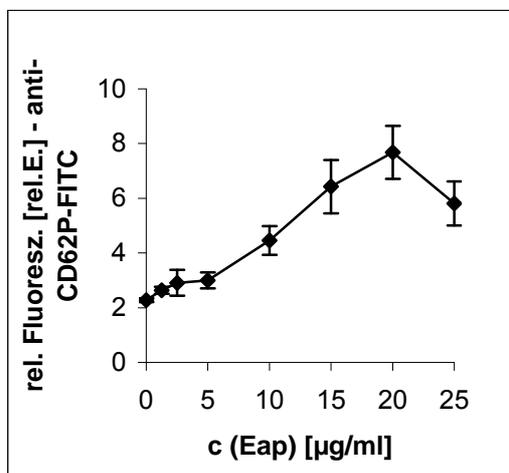


Abb. III.6: Eap-induzierte Expression von CD62P auf der Oberfläche humaner Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/ μl) wurde 5 min mit Eap (1,25-25 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert, danach gewaschen und fixiert und im Folgenden 1 h mit jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD62P-FITC inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane \pm S.D. (n=3).

III.1.5 Eap-induzierte Sekretion der „dense bodies“ aus humanen Thrombozyten

Bei Aktivierung der Thrombozyten (zum Beispiel durch Thrombin), werden auch die „dense bodies“ freigesetzt und somit CD63 an der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Dieses Antigen kann auf der Plättchenoberfläche mit einem monoklonalen, FITC-konjugierten Antikörper (anti-CD63-FITC) markiert werden, so dass es im Durchflusszytometer detektierbar wird. Die Abbildung III.7 zeigt allerdings, dass keine vermehrte Bindung des anti-CD63-FITC Antikörpers infolge der Eap-Inkubation auf der Thrombozytenoberfläche stattfand, sondern die Bindungsintensität konstant auf dem Niveau des Basiswerts blieb.

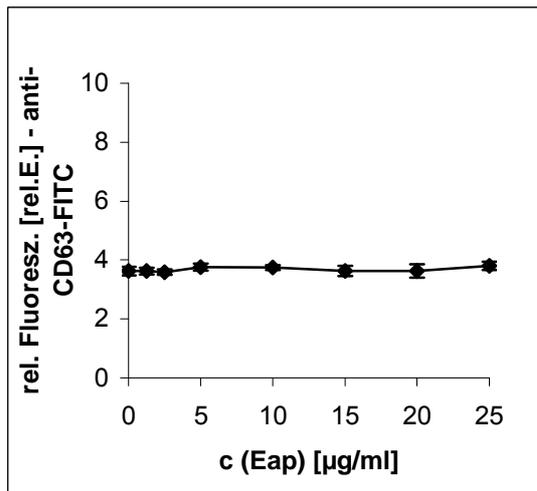


Abb. III.7: Eap induziert keine Bindung des monoklonalen Antikörpers anti-CD63-FITC an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl) wurde 5 min mit Eap inkubiert, danach gewaschen und fixiert. Dann folgte die Zugabe von jeweils 5 µg/ml anti-CD63-FITC und eine einstündige Inkubation. Nach erneutem Waschen wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

III.1.6 Eap-induzierte Freisetzung von Mepacrin aus humanen Thrombozyten

Mepacrin ist ein spezifisches Fluorochrom, das die Fähigkeit besitzt, die Zellmembran zu permeieren; im Zellinneren wird der Farbstoff dann in den „dense bodies“ gespeichert.

Somit ist Mepacrin ein weiterer Marker für die Sekretion der „dense bodies“. Allerdings wird hier keine Zunahme, sondern eine Abnahme der Fluoreszenz gemessen.

Für diesen Versuch wurde dem PRP-Ansatz (50.000 Tz/µl) 5 µM Mepacrin hinzugefügt. Zunächst blieb der Ansatz für 10 min ruhig stehen, damit das Mepacrin in die Thrombozyten diffundieren konnte. In den Probenröhrchen wurden dann jeweils 100 µl des PRP-Ansatzes mit Eap (1,25-25 µg/ml) inkubiert.

Die durchflusszytometrische Messung ergab keine nennenswerte Veränderung der Mepacrin-Fluoreszenz nach der Behandlung mit Eap (Abb. III.8).

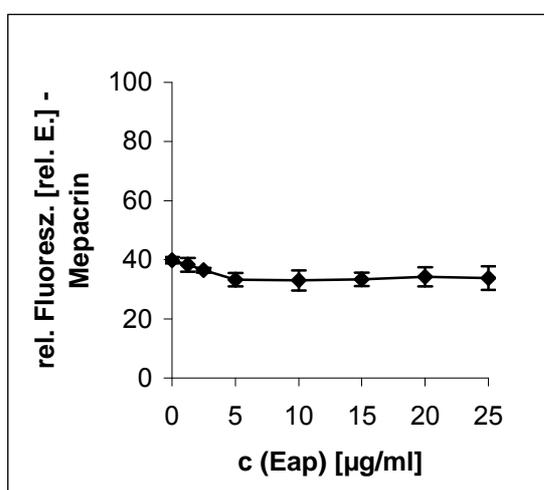


Abb. III.8: Einfluss von Eap auf die Mepacrin-Freisetzung aus humanen Thrombozyten.

Die Thrombozyten (PRP, 50.000 Tz/µl) wurden mit 5 µM Mepacrin für 10 min vorinkubiert, anschließend weitere 5 min mit Eap (1,25-25 µg/ml) inkubiert und dann durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

III.1.7 Eap-induzierte Expression von CD40 Ligand auf der Oberfläche humaner Thrombozyten

Mit der Aktivierung der Thrombozyten, zum Beispiel durch Thrombin, wird CD40 Ligand auf der Oberfläche der Plättchen exprimiert. Die genaue Herkunft des Proteins ist bisher noch nicht eindeutig geklärt; an verschiedenen Stellen in den Thrombozyten wurde CD40L bisher nachgewiesen, so zum Beispiel im Zytoplasma, in den α -Granula und auf deren Membran. Als gebundener Ligand auf Plättchen, CD4⁺T-Zellen, stimulierten Mastzellen und Basophilen hat er eine zentrale Funktion in der spezifischen Immunabwehr.

Er verbindet die Plättchenfunktion, im Sinne der angeborenen Immunabwehr, mit der spezifischen, indem er die Interaktion zwischen den beteiligten Zellen, wie zum Beispiel zwischen B- und T-Zellen, Monozyten, Plättchen und Endothelzellen vermittelt.

Es wurde untersucht, ob auch Eap die CD40L-Expression auf der Plättchenmembran induzieren kann. Nach fünfminütiger Inkubation der Thrombozyten mit Eap, wurden die Proben mit jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$ des monoklonalen Antikörpers anti-CD40L-Pe versetzt und so für 15 min ruhig stehen gelassen. In der Abbildung III.9 zeigt sich, dass Eap mit steigender Konzentration eine vermehrte Bindung des Antikörpers anti-CD40L-Pe induziert.

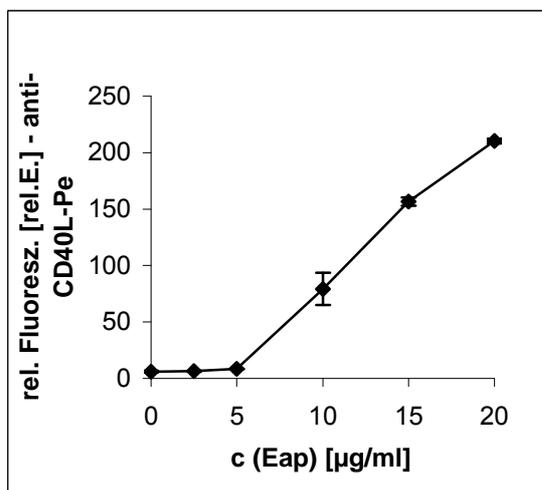


Abb. III.9: Eap-induzierte Bindung des monoklonalen Antikörpers anti-CD40L-Pe an humane Thrombozyten.

Nach fünfminütiger Inkubation der Thrombozyten (PRP, 50.000 Tz/ μl) mit Eap wurden die Proben mit jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD40L-Pe versetzt, für 15 min ruhig stehend inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten der linearen Mediane \pm S.D. (n=3).

III.1.8 Eap-induzierte prokoagulante Aktivität humaner Thrombozyten

Die Membran der Blutplättchen besitzt in der äußeren und in der inneren Lipidschicht eine spezifische Zusammensetzung an verschiedenen Phospholipiden. In ruhenden Thrombozyten ist im inneren Blatt vermehrt Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) eingelagert. Mit der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einem „Flip-Flop“-Effekt, der den PS-Anteil in der äußeren Lipidschicht schlagartig erhöht. Die negativ geladenen Phosphatgruppen des PS verleihen der Plättchenoberfläche eine stärkere negative Gesamtladung und vermitteln die Bindung der Gerinnungsfaktoren an der Plättchenoberfläche. Diese Bindungsstellen sind somit nicht nur für eine ausreichende Thrombinbildung essenziell, sondern gleichzeitig auch für die Lokalisierung des Gerinnungsprozesses an den betreffenden Zelloberflächen. Dadurch wird eine überschießende und disseminierte Blutgerinnung verhindert. Neben der Bindung an PS ist eine zusätzliche Bindung der Gerinnungsfaktoren an Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche notwendig, welche allerdings größtenteils noch nicht bekannt sind.

Annexin-V-FITC, FVIIa-FITC, FVIII-FITC und FXIII-FITC binden sehr gut an diesen negativ geladenen Phosphatresten und dienen somit dem Nachweis der prokoagulanten Plättchenoberfläche.

In diesen Versuchen wurde untersucht, ob auch Eap die Bindung von Annexin-V-FITC, FVIIa-FITC, FVIII-FITC und FXIII-FITC induzieren kann. Dafür wurden GFP mit H/T-Puffer (+ 6 mM CaCl_2) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt und drei verschiedene Ansätze davon mit den FITC-konjugierten Gerinnungsfaktoren versetzt ([FVIIa-FITC] = 50 $\mu\text{g/ml}$; [FVIII-FITC] = 20 $\mu\text{g/ml}$; [FXIII-FITC] = 200 $\mu\text{g/ml}$). Dann wurden Aliquots von je 100 μl aus den GFP-Ansätzen unter massivem Schütteln für 20 min mit Eap inkubiert.

Für die Proben mit dem Annexin-V-FITC-Zusatz galten dieselben Versuchsbedingungen, allerdings wurden die Thrombozyten hier erst nach der Eap-Inkubation für 15 min mit dem Annexin-V-FITC (2 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert.

Sowohl die Bindung von Annexin-V-FITC, als auch die der Gerinnungsfaktoren nahm mit steigender Konzentration an Eap zu. Dabei lagen die maximalen Fluoreszenzsignale von FVIIa-FITC und FVIII-FITC bei 80-90 und die von FXIII-FITC bei über 300 linearen, relativen Einheiten. Die markierten Thrombozyten erreichten bei den höchsten Eap-Konzentrationen einen prozentualen Anteil von über 65% an Annexin-V-FITC-positiven Events (Abb. III.10a) - d)).

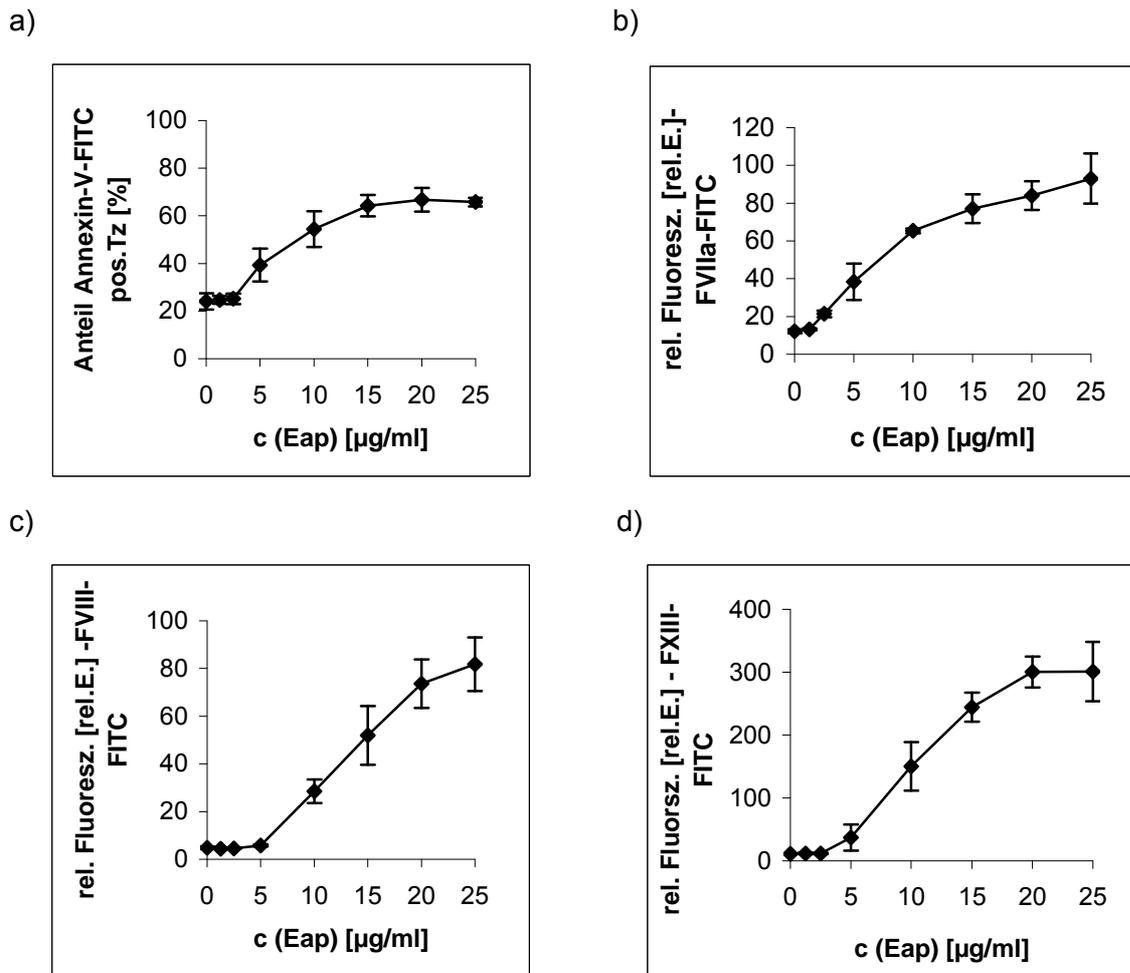


Abb. III.10a) - d): Eap induziert die Bindung von Annexin-V-FITC (a), FVIIa-FITC (b), FVIII-FITC (c) und FXIII-FITC (d) an humane Thrombozyten.

GFP (25.000 Tz/µl) wurden mit 6 mM CaCl₂ und mit Eap (1,25-25 µg/ml) unter massivem Schütteln für 20 min inkubiert. FVIIa-FITC (50 µg/ml), FVIII-FITC (20 µg/ml) und FXIII-FITC (200 µg/ml) wurden bereits den GFP-Ansätzen vor der Eap-Inkubation hinzugefügt. Annexin-V-FITC (2 µg/ml) wurde den entsprechenden Proben erst nach der Eap-Inkubation hinzugefügt, um diese dann für 15 min damit zu inkubieren. Im Folgenden wurden alle Proben durchflusszytometrisch analysiert. (a) Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte der jeweiligen prozentualen Anteile Annexin-V-FITC-positiver Thrombozyten +/- S.D. von n=3 Versuchsreihen. (b-d) Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

III.1.9 Mikropartikelbildung

Werden Thrombozyten durch sehr starke Agonisten, wie zum Beispiel durch eine Kombination von Thrombin und Kollagen, massiv aktiviert, erhöht dies die prokoagulante Aktivität, indem kleine Membranvesikel von den Thrombozyten abgeschnürt werden. Dabei wird die Oberfläche stark vergrößert, so dass mehr prokoagulante Komplexe und Gerinnungsfaktoren daran binden können und somit mehr Thrombin produziert wird.

Der Rezeptor CD42a kommt sehr spezifisch nur auf Thrombozyten, deren Mikropartikeln und auf Endothelzellen vor. Somit können die Mikropartikel mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers anti-CD42a-FITC und anhand ihrer Größe qualitativ und quantitativ von Fremdpartikeln und Thrombozyten differenziert werden.

Für diesen Versuch wurden GFP mit H/T-Puffer (+6 mM CaCl_2) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt und 20 min unter massivem Schütteln mit Eap (1,25-25 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD42a-FITC versetzt und für 15 min bei leichtem Schwenken inkubiert. Nach der durchflusszytometrischen Messung konnten die intakten Zellen und die gebildeten Mikropartikel anhand der FSC-Signalsstärke in jeweils ein „Gate“ eingegrenzt und voneinander differenziert werden; auch der jeweils prozentuale Anteil war damit zu berechnen.

Die Abbildung III.11 zeigt den Anteil der Mikropartikel an den anti-CD42a-FITC-positiven Events in %. Die Zahl der Mikropartikel blieb auf dem Niveau des Basiswerts, auch mit steigender Konzentration an Eap. Das heißt, Eap konnte nicht mehr Mikropartikel erzeugen, als auch schon ohne Agonist vorhanden waren, welches einen Anteil von 5% der anti-CD42a-FITC-positiven Events ausmachte.

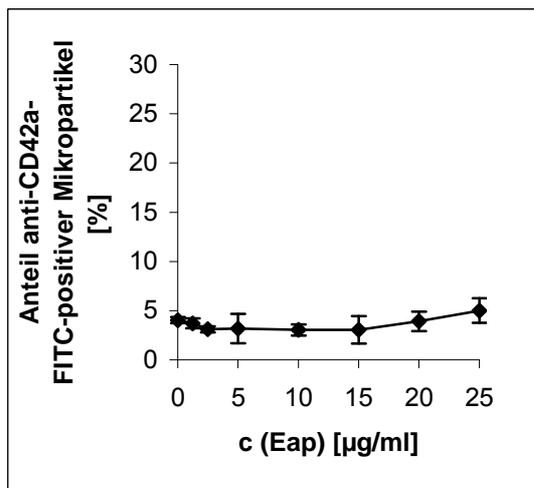


Abb. III.11: Mikropartikelbildung nach Inkubation humaner Thrombozyten mit Eap.

GFP wurden mit H/T-Puffer (+ 6 mM CaCl_2) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt und für 20 min mit Eap und im Folgenden für 15 min mit anti-CD42a-FITC (5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Werte stellen die Mittelwerte der Mikropartikel-Anteile an den anti-CD42a-FITC-positiven Events +/- S.D. in % dar. (n=3)

III.2 Einfluss von Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

Antikoagulanzen sind wichtige Therapeutika zur Behandlung oder Prophylaxe von Gerinnungsstörungen und thrombo-embolischen Erkrankungen.

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob gängige Antikoagulanzen einen Effekt auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten haben. In die Blutabnahmeröhrchen wurde jeweils ein Gerinnungshemmer vorgelegt, bevor das Blut den

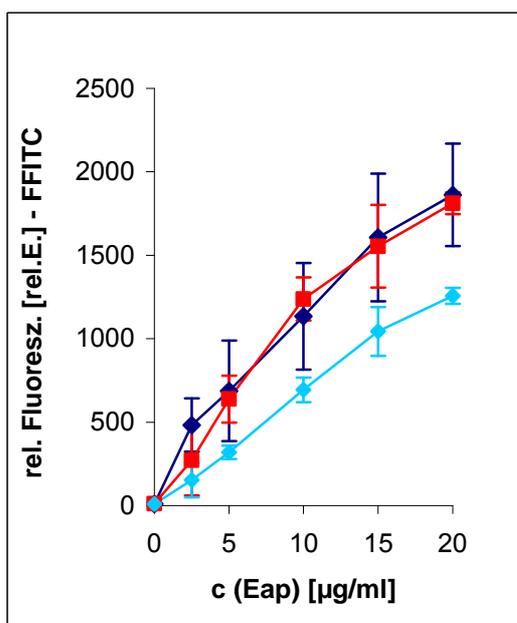
Spendern abgenommen wurde. Im Folgenden wurden die Thrombozyten abzentrifugiert, im PRP (50.000 Tz/ μ l) mit Fibrinogen-FITC versetzt, dann wie üblich mit Eap inkubiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Der Vergleich der Antikoagulanzen in den Abbildungen III.12a) + b) zeigt, dass die Gerinnungshemmer einen sehr stark unterschiedlichen Einfluss auf die Eap-induzierte Fibrinogenbindung hatten. Die Citratreihe diente dabei als Referenz und Kontrolle, und die anderen Antikoagulanzen wurden damit verglichen.

Hirudin (5 U/ml) wies im Vergleich zu Citrat (110 mM) keinen hemmenden Effekt auf. EDTA (1,6 mg/ml) und Melagatran (1,5 μ M) hemmten die Fibrinogenbindung nur geringfügig.

Dagegen hemmten das unfraktionierte Heparin (UFH) (5 I.E./ml) und das niedermolekulare Heparin (NMH) (20 U/ml) die Plättchenaktivierung auf Ebene der Fibrinogenbindung vollständig.

a)



b)

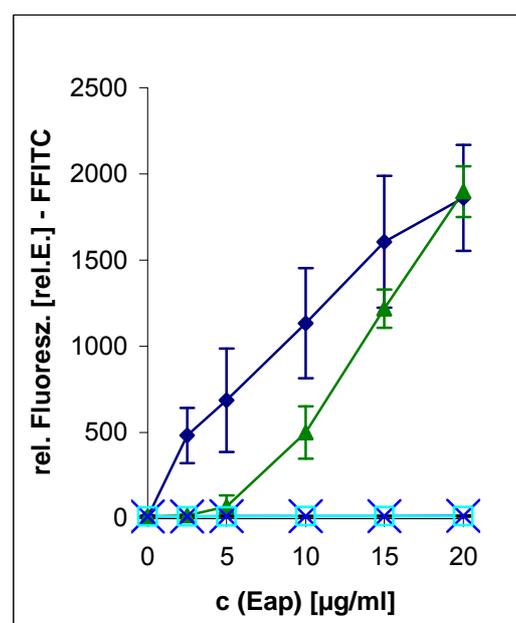


Abb. III.12a) + b): Einfluss verschiedener Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC-Bindung an humane Thrombozyten.

Die Antikoagulanzen wurden in die Blutabnehmeröhrchen vorgelegt, bevor den Spendern das Blut abgenommen wurde. Im Folgenden wurden die Thrombozyten (PRP+ Fibrinogen-FITC, 50.000 Tz/ μ l) für 5 min mit Eap (2,5-20 μ g/ml) inkubiert, fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane \pm S.D. (n=3).

◆ = 110 mM Citrat, ■ = 5 U/ml Hirudin, ◆ = 1,5 μ M Melagatran, ▲ = 1,6 mg/ml EDTA
 X = 5 I.E./ml UFH, □ = 20 U/ml NMH

Beim Vergleich der Maximalwerte stellte sich heraus, dass Melagatran eine signifikante Hemmung der Fibrinogenbindung bewirken konnte (** $p < 0,01$). Außerdem hemmten unfraktioniertes und niedermolekulares Heparin die Eap-induzierte Fibrinogenbindung signifikant bis auf das Niveau der Fibrinogenbindung an unstimulierte Thrombozyten (***) ($p < 0,001$) (Abb. III.13).

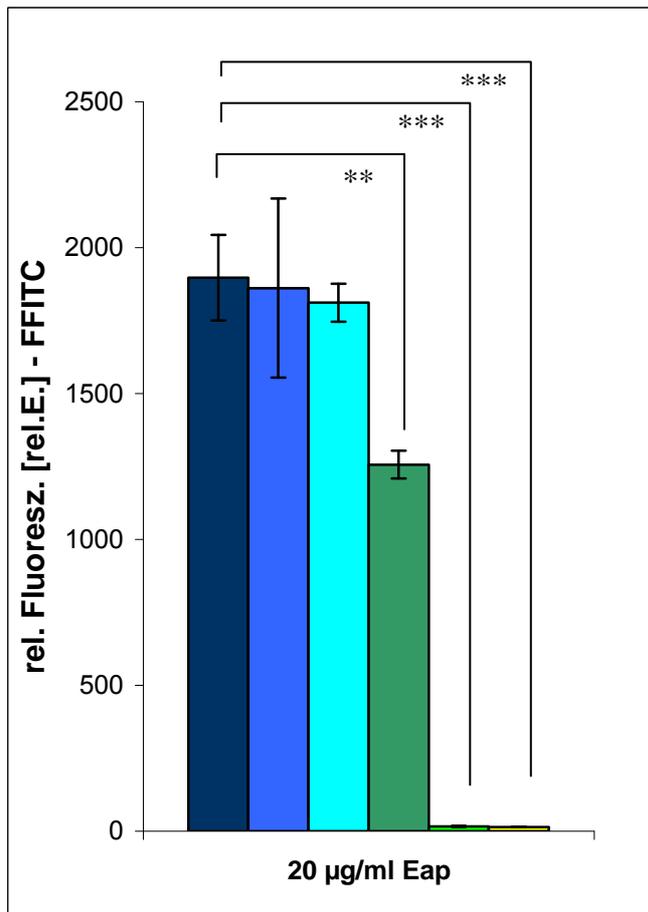


Abb. III.13: Vergleich des Einflusses verschiedener Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC-Bindung an humane Thrombozyten.

Die Antikoagulanzen wurden in die Blutabnehmeröhrchen vorgelegt bevor den Spendern das Blut abgenommen wurde. Im Folgenden wurden die Thrombozyten (PRP + Fibrinogen-FITC, 50.000 Tz/ μ l) 5 min mit Eap (2,5-20 μ g/ml) inkubiert, fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Eine signifikante Hemmung der Eap-induzierten Fibrinogenbindung konnte sowohl durch Melagatran (** $p < 0,01$), als auch durch UFH und NMH (***) ($p < 0,001$) erreicht werden. Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

- = 1,6 mg/ml EDTA ■ = 110 mM Citrat ■ = 5 U/ml Hirudin
- = 1,5 μ M Melagatran ■ = 5 I.E./ml UFH ■ = 20 U/ml NMH

III.3 Einfluss von thiolreaktiven Substanzen auf die Eap-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten

In diesen Versuchen wurden Substanzen getestet, die mit freien Thiolgruppen auf der Oberfläche von Zellen oder auch mit thiolreaktiven Enzymen interagieren. Getestet wurden hier 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic-acid) (DTNB), Para-Chloromercuriphenylsulfonat (pCMPS), Glutathion (GSH), Gliotoxin, Phenylarsinoxid (PAO) und Bacitracin.

III.3.1 Einfluss von DTNB und pCMPS auf die Eap-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten

DTNB und pCMPS sind Reagenzien, die die Zellmembran nicht permeieren und mit freien Thiolgruppen auf der Zelloberfläche interagieren. Solche sind auch auf der extrazellulären Domäne des aktivierten GPIIb/IIIa vorhanden, welcher für die Plättchenaggregation der wichtigste Rezeptor ist.

Für die folgenden Versuche wurden die Thrombozyten gleichzeitig mit Eap und DTNB bzw. pCMPS inkubiert.

III.3.1.a Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

Das PRP (50.000 Tz/ μ l) wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und von diesem Ansatz wurden jeweils 100 μ l mit Eap (1,25-20 μ g/ml) und DTNB (2-7,5 mM) inkubiert.

Die Messergebnisse in Abbildung III.14 zeigen, dass DTNB mit steigenden Konzentrationen die Bindung von Fibrinogen-FITC hemmte. Die Bindung von Fibrinogen-FITC, induziert durch 20 μ g/ml Eap, konnte durch alle angewandten Konzentrationen an DTNB (2-7,5 mM) signifikant gehemmt werden (***) $p < 0,001$).

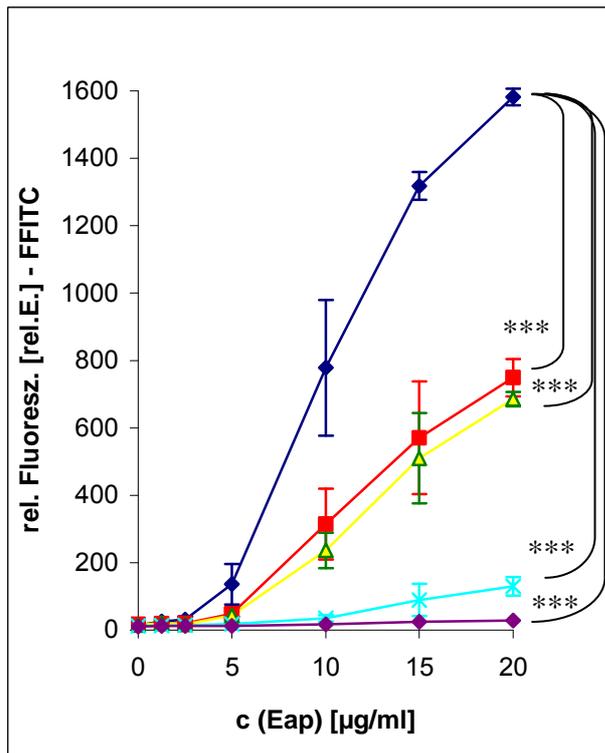


Abb. III.14: Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC-Bindung an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl) wurde in Anwesenheit von 150 µg/ml Fibrinogen-FITC gleichzeitig mit Eap (1,25-20 µg/ml) und DTNB (2-7,5 mM) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die Bindung von Fibrinogen-FITC, induziert durch 20 µg/ml Eap, konnte durch alle angewandten Konzentrationen an DTNB (2-7,5 mM) signifikant gehemmt werden (***) ($p < 0,001$). Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

◆ = 0 mM ■ = 2 mM ▲ = 2,5 mM
 × = 5 mM ◆ = 7,5 mM DTNB

III.3.1.b Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten

DTNB wurde auch hinsichtlich seines Einflusses auf die Bindung des Antikörpers anti-CD62P-FITC untersucht. Dieser Antikörper ist ein Marker für die Sekretion der α -Granula im Rahmen der Plättchenaktivierung und bindet an CD62P, welches mit der Sekretion an die Oberfläche der Plättchen transloziert wird. Thrombozyten im PRP (50.000 Tz/µl) wurden mit Eap (5-20 µg/ml) und DTNB (2-7,5 mM) für 5 min inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit anti-CD62P-FITC. Mit den Konzentrationen 5 mM und 7,5 mM konnte DTNB die Bindung von anti-CD62P-FITC - induziert durch 20 µg/ml Eap - signifikant hemmen (** $p < 0,01$) (Abb. III.15).

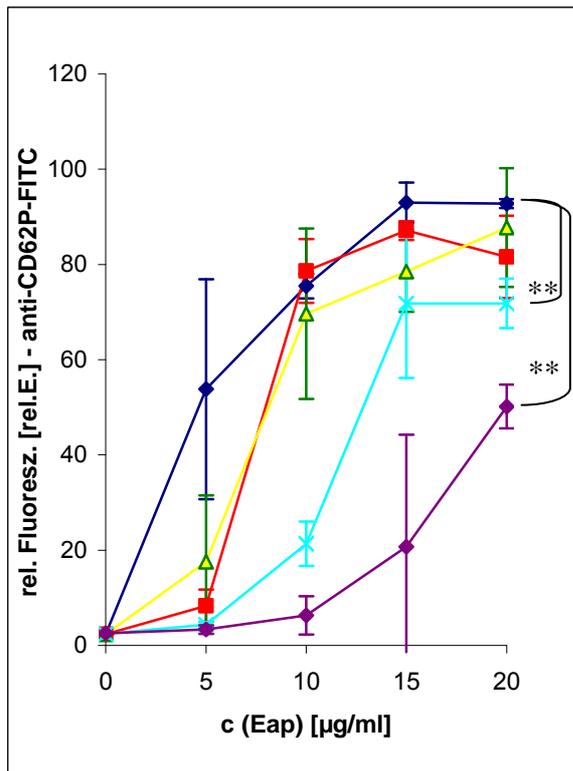


Abb. III.15: Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl) wurde mit Eap (5-20 µg/ml) und DTNB (2-7,5 mM) für 5 min inkubiert, fixiert und gewaschen. Danach wurden 5 µg/ml anti-CD62P-FITC hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation und erneutem Waschen wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Mit 5 mM und 7,5 mM DTNB konnte die Bindung von anti-CD62P-FITC - induziert durch 20 µg/ml Eap - signifikant gehemmt werden (** p < 0,01). Die dargestellten Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

◆ = 0 mM ■ = 2 mM ▲ = 2,5 mM
 × = 5 mM ◆ = 7,5 mM DTNB

III.3.1.c Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

Für diesen Versuch wurden Thrombozyten im PRP (50.000 Tz/µl) mit Fibrinogen-FITC versetzt. Es folgte die Inkubation der Plättchen mit Eap (5-20 µg/ml) und pCMPS (25-200 µM) mit nachfolgender Fixierung und Messung im Durchflusszytometer.

Die Messergebnisse zeigen, dass Konzentrationen von 50 µM und 200 µM pCMPS eine signifikante Hemmung der Fibrinogenbindung - induziert durch 20 µg/ml Eap - hervorriefen (* p < 0,05) (Abb. III.16).

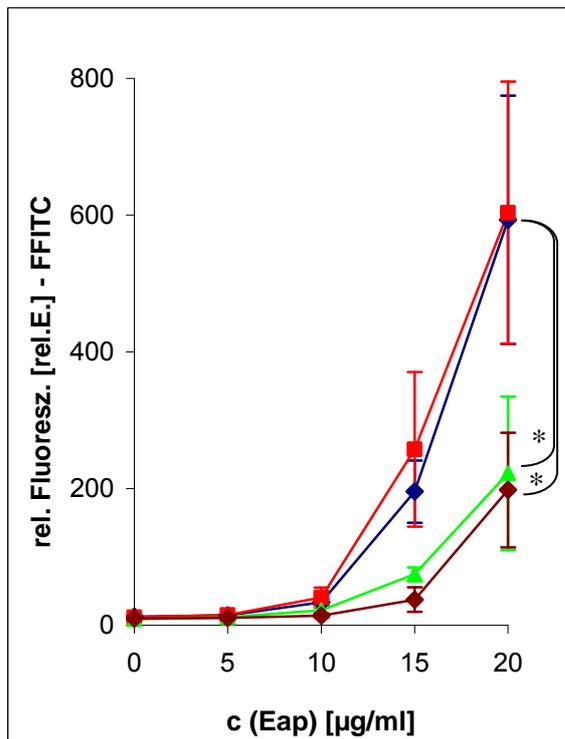


Abb. III.16: Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl), versetzt mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC, wurde zeitgleich mit Eap (5-20 µg/ml) und pCMPS (25-200 µM) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. 50 µM und 200 µM pCMPS konnten eine signifikante Hemmung der Fibrinogenbindung - induziert durch 20 µg/ml Eap - hervorrufen (* p < 0,05). Die ermittelten Werte stellen die Mittelwerte der linearen Mediane +/- S.D. (n=3) dar.

◆ = 0 µM ■ = 25 µM ▲ = 50 µM
 ◆ = 200 µM pCMPS

III.3.1.d Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten

In diesem Versuch wurde anhand der CD62P-Expression auf der Thrombozytenoberfläche getestet, ob pCMPS nicht nur die Bindung von Fibrinogen-FITC, sondern auch die Sekretion der α -Granula hemmt.

Das eingestellte PRP (50.000 Tz/µl) wurde zunächst mit Eap (5-25 µg/ml) und pCMPS (25-200 µM) inkubiert. Nach der Aktivierungsphase wurde den Probenröhrchen jeweils 5 µg/ml anti-CD62P-FITC hinzugefügt.

Die Abbildung III.17 zeigt, dass die Expression von CD62P - induziert durch 25 µg/ml Eap - signifikant durch 75 µM, 100 µM und 200 µM pCMPS gehemmt werden konnte (** p < 0,01).

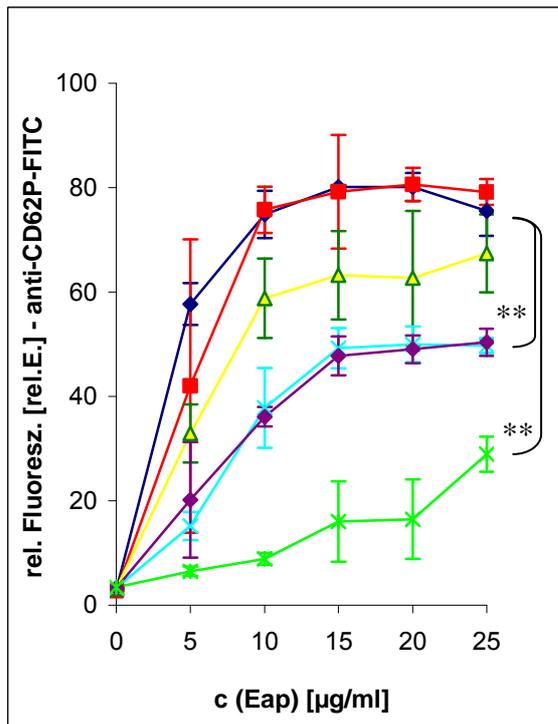


Abb. III.17: Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl) wurde gleichzeitig für 5 min mit Eap (5-25 µg/ml) und pCMPS (25-200 µM) inkubiert, fixiert, gewaschen und danach für 1h unter leichtem Schwenken mit jeweils 5 µg/ml anti-CD62P-FITC inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die Expression von CD62P - induziert durch 25 µg/ml Eap - konnte durch 75 µM, 100 µM und 200 µM pCMPS signifikant gehemmt werden (** p < 0,01). Die ermittelten Werte stellen die Mittelwerte der linearen Mediane +/- S.D. (n=3) dar.

◆ = 0 µM ■ = 25 µM ▲ = 50 µM
 × = 75 µM ◆ = 100 µM × = 200 µM pCMPS

III.3.2 Einfluss von GSH auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

GSH ist eines der wichtigsten Antioxidanzien im Körper und alle Zellen sind fähig, diesen Stoff zu synthetisieren. Seine Funktion als Antioxidanz verdankt es seinen freien Thiolgruppen, indem es Elektronen auf freie Radikale (reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) überträgt und diese somit unschädlich macht. Dabei wird GSH oxidiert und geht durch Ausbildung einer Disulfidbrücke von seiner monomeren (GSH) in die dimere Form (GSSG) über. Dieser Vorgang ist reversibel und die Glutathion-Reduktase kann das GSH unter Verbrauch von NADPH wiederherstellen.

In der Blutgerinnung hat das GSH eine Funktion als physiologischer Inhibitor, bzw. Regulator der Thrombozytenaktivität.

Dem PRP-Ansatz (50.000 Tz/µl) wurde 150 µg/ml Fibrinogen-FITC hinzugefügt und Aliquots von 100 µl dieses Ansatzes wurden jeweils gleichzeitig mit Eap (1,25-25 µg/ml) und GSH (5-50 µM) inkubiert.

Wie in Abbildung III.18 gezeigt, veränderte GSH die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten nicht signifikant.

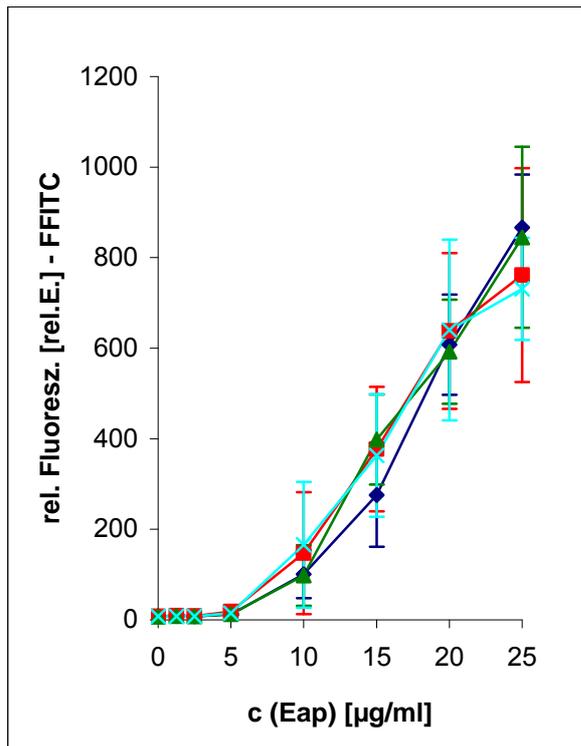


Abb. III.18: Einfluss von Glutathion auf die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC-Bindung an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl), versetzt mit 150µg/ml Fibrinogen-FITC, wurde gleichzeitig für 5 min mit Eap (1,25-25 µg/ml) und Glutathion (5-50 µM) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

♦ = 0 µM ■ = 5 µM ▲ = 10 µM
 × = 50 µM Glutathion

III.3.3 Einfluss von Gliotoxin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

Dieses potente Mykotoxin wird in erster Linie von *Aspergillus fumigatus*, aber auch von anderen Schimmelpilzen gebildet. Es wirkt zytotoxisch, immunsuppressiv und ist außerdem ein Antagonist des PAF, der in Fibroblasten, Endothelzellen, Leuko-, Mono- und Thrombozyten gebildet wird. Gliotoxin inhibiert eine Vielzahl von Wirtsproteinen, indem es mit Hilfe seiner intramolekularen Disulfidbrücke gemischte Disulfide mit diesen bildet.

Bei diesem Versuch wurden jeweils 100 µl des PRP-Ansatzes (50.000 Tz/µl), versetzt mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC, für 5 min mit Eap (5-25 µg/ml) und Gliotoxin (0,25-2 µM) inkubiert, fixiert und gemessen.

Die Abbildung III.19 zeigt, dass ab 0,25 µM Gliotoxin eine signifikante Hemmung der Bindung von Fibrinogen-FITC - induziert durch 25 µg/ml Eap - an Thrombozyten hervorgerufen wurde (** p < 0,01).

Allerdings konnte Gliotoxin die Eap-induzierte Fibrinogenbindung, im Gegensatz zu DTNB, nicht vollständig hemmen. Um das zu erreichen, lägen die Konzentrationen des Mykotoxins im zytotoxischen Bereich, so dass die Thrombozyten eher abgetötet würden, als dass eine Inhibition der Aktivierung auf Ebene der Fibrinogenbindung erfolgte.

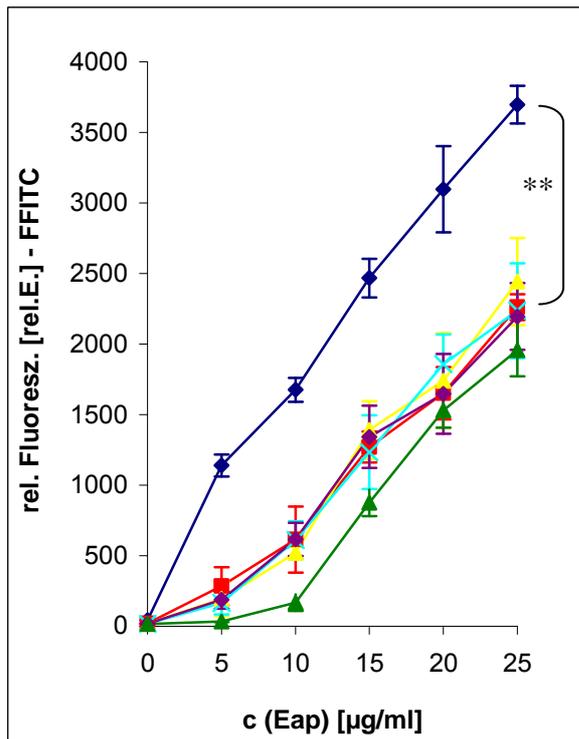


Abb. III.19: Einfluss von Gliotoxin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl), versetzt mit Fibrinogen-FITC, wurde für 5 min gleichzeitig mit Eap (5-25 µg/ml) und Gliotoxin (0,25-2 µM) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Ab einer Konzentration von 0,25 µM konnte Gliotoxin eine signifikante Hemmung der Eap-induzierten (25 µg/ml) Fibrinogenbindung an Thrombozyten vermitteln (** p < 0,01). Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

◆ = 0 nM ■ = 250 nM ▲ = 500 nM
 × = 750 nM ◆ = 1 µM ▲ = 2 µM Gliotoxin

III.3.4 Einfluss von Phenylarsinoxid auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

PAO hat die Eigenschaft, Tyrosin-Phosphatasen zu hemmen. Diese vermitteln wie Enzymgekoppelte Rezeptoren eine Signaltransduktion und können auch als Transmembranrezeptoren fungieren. Mit Proteinen, welche zahlreiche und dicht aneinandergereihte benachbarte Thiolgruppen enthalten, bildet PAO einen stabilen, heterozyklischen Ring.

Jeweils 100 µl des PRP (50.000 Tz/µl), versetzt mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC, wurden gleichzeitig mit PAO (25-200 nM) und Eap (5-20 µg/ml) inkubiert. Die Messung im Durchflusszytometer ergab, dass die Fibrinogenbindung - induziert durch 20 µg/ml Eap - mit Konzentrationen von 100 nM und 200 nM PAO signifikant gehemmt wurde (* p < 0,05) (Abb. III.20).

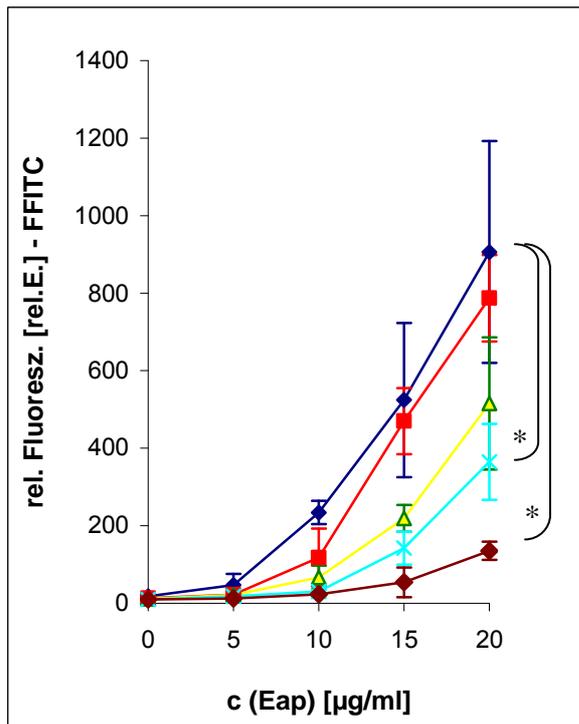


Abb. III.20: Einfluss von PAO auf die Eap-induzierte Fibrinogen-FITC-Bindung an Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl) wurde mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit PAO (25-200 nM) und Eap (5-20 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die Fibrinogenbindung - induziert durch 20 µg/ml Eap - konnte mit 100 nM und 200 nM PAO signifikant gehemmt werden (* $p < 0,05$). Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

◆ = 0 nM ■ = 25 nM ▲ = 50 nM

× = 100 nM ◆ = 200 nM PAO

III.3.5 Einfluss von Bacitracin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

Bacitracin, ein Polypeptid-Antibiotikum, welches aufgrund seiner starken Nephrotoxizität nur noch zur äußerlichen Behandlung zugelassen ist, hemmt spezifisch die Protein Disulfid Isomerase (PDI). Dieses Enzym befindet sich auch auf der Oberfläche der Blutplättchen und katalysiert unter anderem den Disulfid-Austausch am GPIIb/IIIa-Rezeptor, welcher für die Plättchenaggregation essenziell ist.

In diesem Versuch wurde Bacitracin (1,25-10 mM) zusammen mit Eap (1,25-20 µg/ml) in die Ansatzröhrchen vorgelegt, um dann jeweils 100 µl des PRP-Ansatzes (50.000 Tz/µl), versetzt mit Fibrinogen-FITC, für 5 min damit zu inkubieren.

Die Fibrinogenbindung - induziert durch 20 µg/ml Eap - konnte durch 1,25 mM Bacitracin (* $p < 0,05$) und durch die folgenden Konzentrationen (2,5-10 mM Bacitracin) signifikant gehemmt werden (***) ($p < 0,001$) (Abb. III.21).

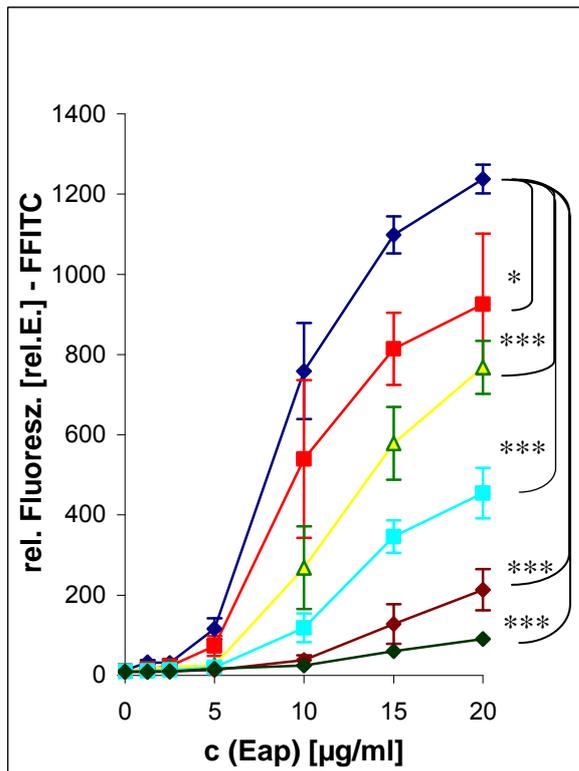


Abb. III.21: Einfluss von Bacitracin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.

PRP (50.000 Tz/µl), versetzt mit Fibrinogen-FITC, wurde gleichzeitig für 5 min mit Eap (1,25-20 µg/ml) und Bacitracin (1,25-10 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte stellen die Mittelwerte der linearen Mediane +/- S.D. (n=3) dar.

* p < 0,05, *** p < 0,001

◆ = 0 mM ■ = 1,25 mM ▲ = 2,5 mM

■ = 5 mM ◆ = 7,5 mM

◆ = 10 mM Bacitracin

III.4 Vergleich der Agonist-induzierten Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger

Wie die folgenden Versuchsergebnisse belegen, induziert Eap die Bindung von FITC-konjugiertem Fibrinogen auch an Thrombozyten verschiedener Haussäugetiere. Für diese Versuche wurden Thrombozyten im PRP (50.000 Tz/µl) von jeweils drei Hunden, Schafen, Schweinen, Rindern, Pferden und Ratten untersucht. Der PRP-Ansatz wurde ebenfalls auf 50.000 Tz/µl eingestellt und mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC versetzt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit mit Eap (2,5-20 µg/ml) wurden die Proben fixiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Die Abbildung III.22 zeigt, dass die Fibrinogenbindung in Abhängigkeit von der Konzentration an Eap ansteigt, wobei die Zunahme der Fibrinogenbindung speziesspezifisch sehr unterschiedlich ist. An den Plättchen der Ratte konnte die stärkste Fibrinogenbindung induziert werden, während diese an den Thrombozyten von Schweinen und Hunden eher schwach ausfiel. Bei Mensch und Pferd war die Fibrinogenbindung an den Thrombozyten gut ausgeprägt. Die Thrombozyten der Wiederkäuer reagierten mit einer mäßigen Fibrinogenbindung auf die Inkubation mit Eap.

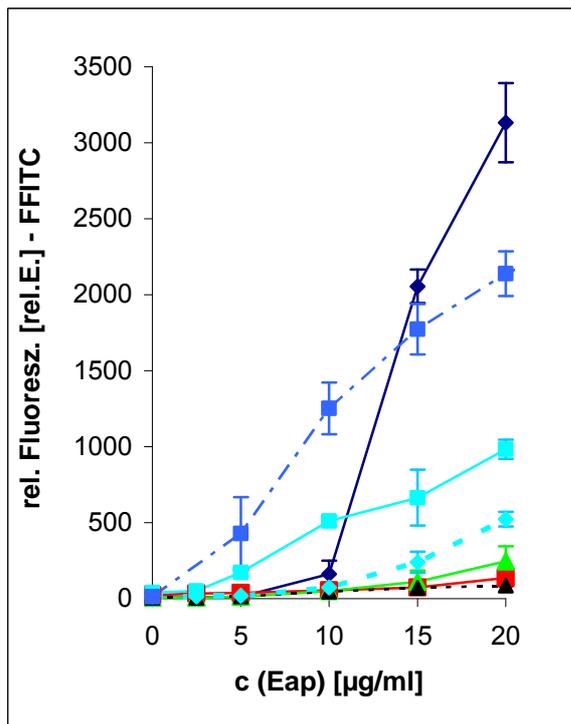


Abb. III.22: Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger.

PRP (50.000 Tz/µl) der verschiedenen Spezies wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und danach mit Eap (2,5-20 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/-S.D. (n=3).

◆ = Ratte ■ = Mensch □ = Pferd ◇ = Rind
 ▲ = Schaf ■ = Hund ▲ = Schwein

Im folgenden Diagramm wird die Bindungsstärke des Fibrinogen-FITC an Thrombozyten der verschiedenen Spezies miteinander verglichen. Es werden einheitlich die Signalwerte verglichen, die durch die Maximalkonzentration an Eap (20 µg/ml) induziert wurden.

Die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC war an den Thrombozyten der verschiedenen Tierarten unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Thrombozyten der Ratte wiesen eine signifikant höhere Bindung auf gegenüber den Thrombozyten des Menschen (* $p < 0,05$) und den Thrombozyten der anderen getesteten Tierarten (***) $p < 0,001$) (Abb. III.23).

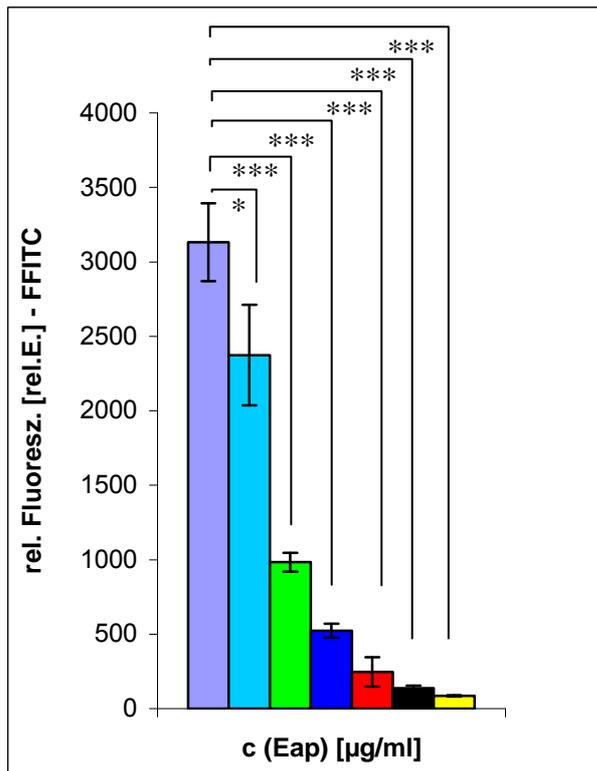


Abb. III.23: Vergleich der Eap-induzierten Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger.

PRP (50.000 Tz/ μ l) der verschiedenen Spezies, versetzt mit Fibrinogen-FITC, wurde mit 20 μ g/ml Eap inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert. Die Thrombozyten der Ratte wiesen eine signifikant höhere Bindung auf gegenüber den Thrombozyten des Menschen (* $p < 0,05$) und den Thrombozyten der anderen getesteten Tierarten (***) $p < 0,001$). Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

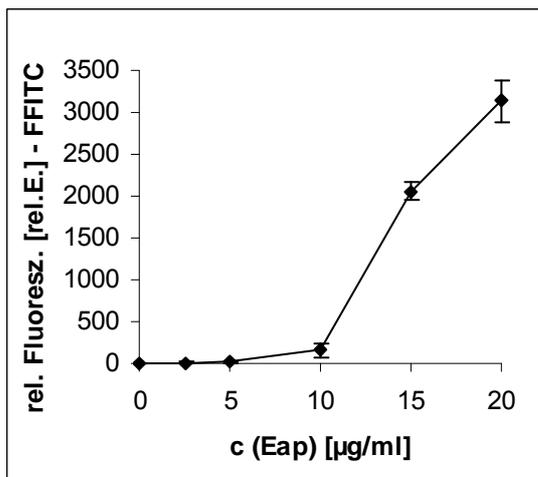
■ = Ratte ■ = Mensch ■ = Pferd ■ = Rind ■ = Schaf ■ = Hund ■ = Schwein

Im Folgenden soll bei Ratten, Pferden, Rindern und Hunden die Intensität der Eap-induzierten Fibrinogenbindung verglichen werden mit der durch Thrombin, ADP und Kollagen hervorgerufenen. PRP der verschiedenen Spezies wurde dazu ebenfalls auf 50.000 Tz/ μ l eingestellt und mit 150 μ g/ml Fibrinogen-FITC versetzt, für die Thrombinreihe zusätzlich mit 1,2 mM GPRP. Die durchflusszytometrische Messung der Bindung von Fibrinogen-FITC an den Thrombozyten infolge der Inkubation mit Eap, Thrombin, ADP oder Kollagen ergab eine speziesspezifisch unterschiedliche Intensität.

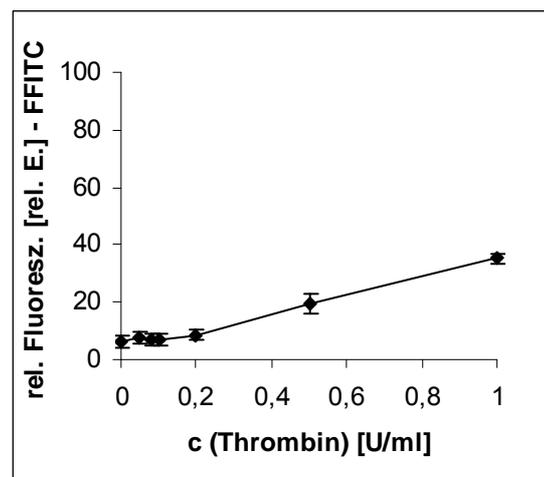
III.4.1 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten der Ratte

An Thrombozyten der Ratte wurde ebenfalls die stärkste Fibrinogenbindung durch Eap hervorgerufen. Wie in den Abbildungen III.24a) - e) dargestellt, erreichte die durch (a) Eap induzierte Bindungsintensität an Rattenthrombozyten das 30-fache der Bindung von Fibrinogen-FITC, die durch (b) Thrombin, (c) ADP oder (d) Kollagen induziert wurde, und war signifikant stärker (***) $p < 0,001$).

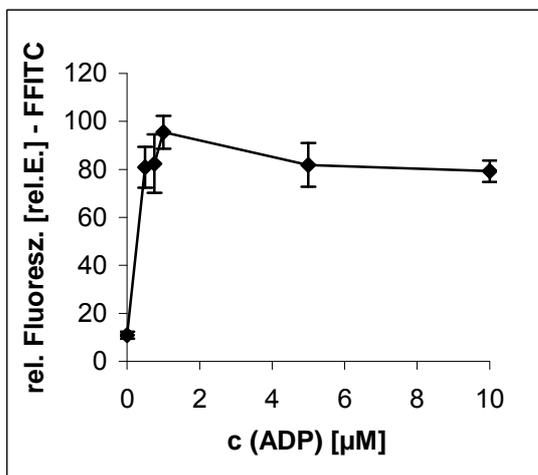
a)



b)



c)



d)

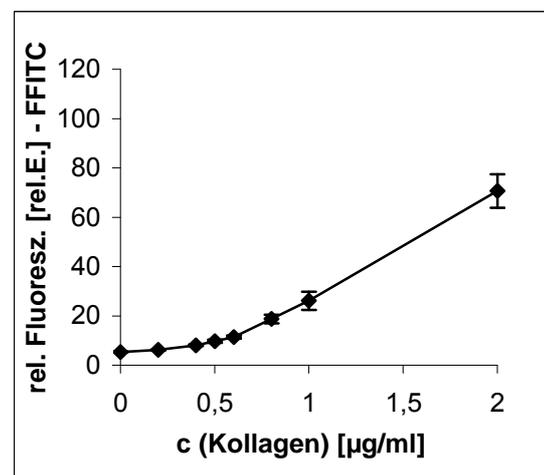


Abb. III.24a) - d): Bindung von Fibrinogen-FITC an Rattenthrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

PRP (50.000 Tz/µl) der Ratte wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit (a) Eap, (b) Thrombin, (c) ADP und (d) Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die ermittelten Werte stellen jeweils die Mittelwerte der linearen Mediane +/- S.D. (n=3) dar.

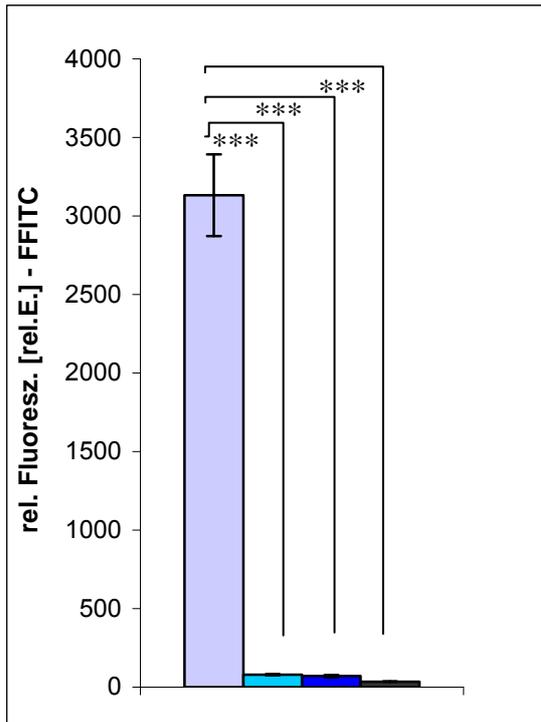


Abb. III.24e): Vergleichende Darstellung der Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten der Ratte induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

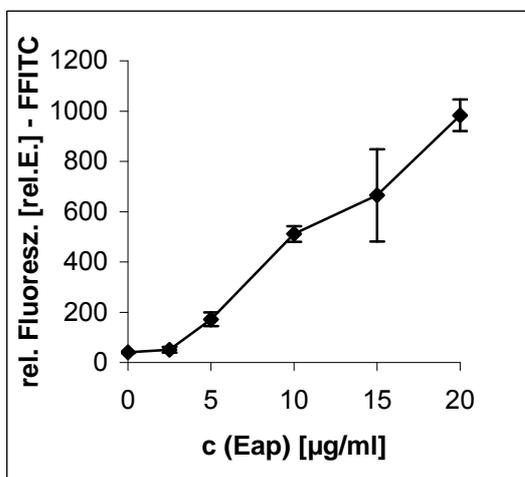
PRP (50.000 Tz/µl) der Ratte wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit Eap, Thrombin, ADP und Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Rattenthrombozyten war signifikant stärker als die, die durch ADP, Kollagen oder Thrombin hervorgerufen wurde (***) p < 0,001). Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

■ = 20 µg/ml Eap ■ = 2 µg/ml Kollagen
 ■ = 2 µM ADP ■ = 1 U/ml Thrombin

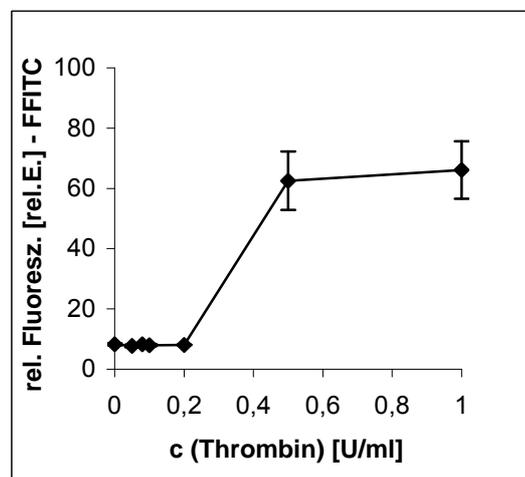
III.4.2 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an equine Thrombozyten

Beim Pferd war die Fibrinogenbindung am stärksten ausgeprägt, wenn sie durch Eap (a) induziert wurde, mit Signalwerten von über 900 relativen Einheiten. ADP (c), Kollagen (d) und Thrombin (b) induzierten lediglich Signalwerte von 100 relativen Einheiten und weniger (Abb. III.25a) - d)).

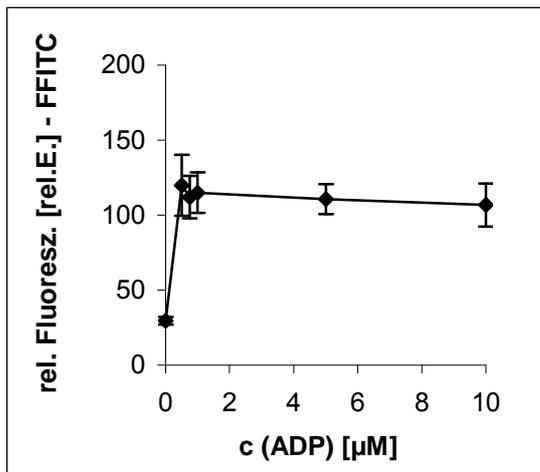
a)



b)



c)



d)

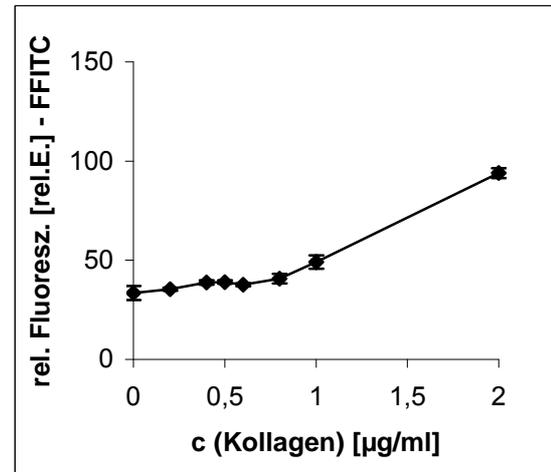


Abb. III.25a) - d): Bindung von Fibrinogen-FITC an equine Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

PRP (50.000 Tz/µl) vom Pferd wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit (a) Eap, (b) Thrombin, (c) ADP bzw. (d) Kollagen inkubiert. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte stellen die Mittelwerte der linearen Medianen +/- S.D. (n=3) dar.

Weiterhin ergab der Vergleich der Fibrinogenbindung an Pferdethrombozyten, dass Eap eine signifikant stärkere Bindung gegenüber ADP, Kollagen und Thrombin induzierte (***) p < 0,001) (Abb. III.25e)).

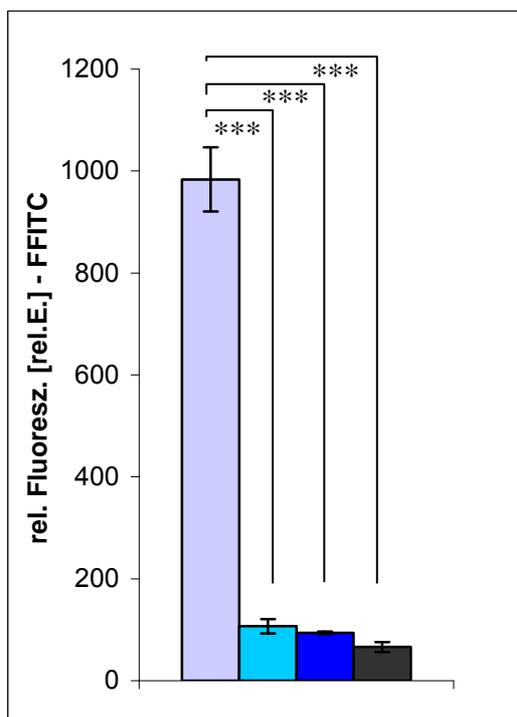


Abb. III.25e): Vergleichende Darstellung der Bindung von Fibrinogen-FITC an equine Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

PRP (50.000 Tz/µl) vom Pferd wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit Eap, Thrombin, ADP und Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Eap induzierte eine signifikant stärkere Fibrinogenbindung an Pferdethrombozyten als ADP, Kollagen und Thrombin (***) p < 0,001).

Die ermittelten Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

■ = 20 µg/ml Eap ■ = 2 µg/ml Kollagen
■ = 2 µM ADP ■ = 1 U/ml Thrombin

III.4.3 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an bovine Thrombozyten

Auch bovine Plättchen reagierten auf (a) Eap mit der stärksten Bindung von Fibrinogen-FITC, verglichen mit den anderen Agonisten. Es ergaben sich Fluoreszenzsignalwerte von über 500 relativen Einheiten. Währenddessen reagierten sie nur sehr träge mit einer Fibrinogenbindung auf die Inkubation mit (b) Thrombin, (c) ADP und nur geringfügig mehr auf die Inkubation mit (d) Kollagen (Abb. III.26a) - d)).

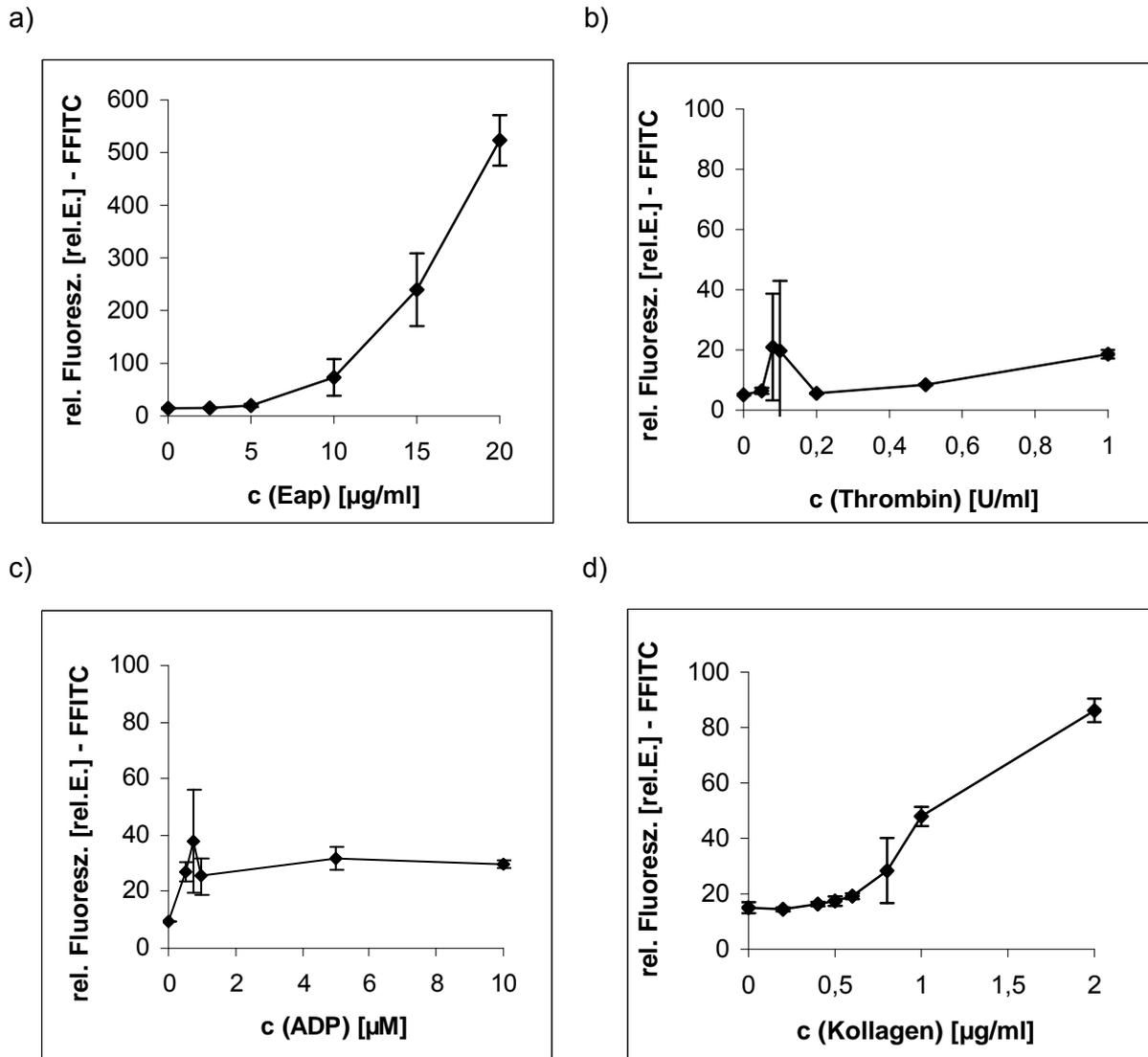


Abb. III.26a) - d): Bindung von Fibrinogen-FITC an bovine Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen. PRP (50.000 Tz/ μl) vom Rind wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit (a) Eap, (b) Thrombin, (c) ADP und (d) Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte stellen die Mittelwerte der linearen Medianen \pm S.D. (n=3) dar.

Die Abb. III.26.e) zeigt, dass die Bindung von Fibrinogen-FITC signifikant stärker durch Eap induziert wurde als durch Kollagen, ADP oder Thrombin (***) ($p < 0,001$).

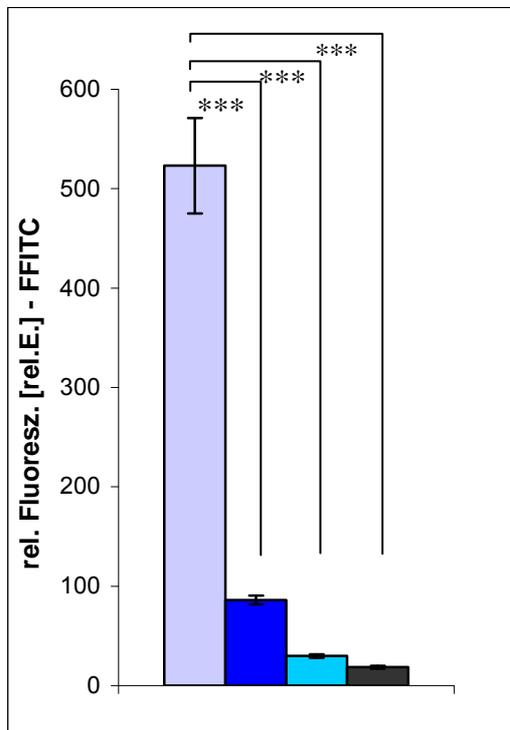


Abb. III.26e): Vergleichende Darstellung der Bindung von Fibrinogen-FITC an bovine Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

PRP (50.000 Tz/µl) vom Rind wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit Eap, Thrombin, ADP und Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Bindung von Fibrinogen-FITC wurde signifikant stärker durch Eap induziert als durch Kollagen, ADP oder Thrombin (***) ($p < 0,001$).

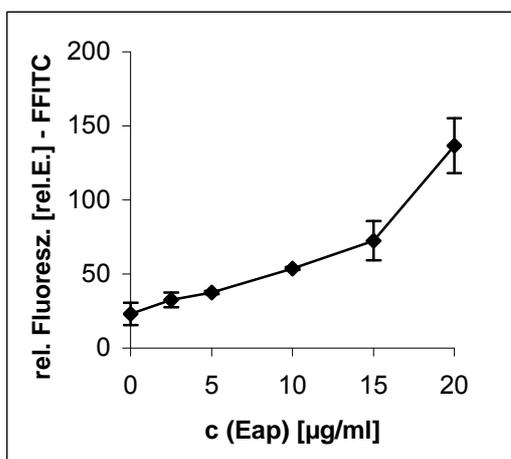
Die ermittelten Werte entsprechen den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

■ = 20 µg/ml Eap ■ = 2 µg/ml Kollagen
 ■ = 2 µM ADP ■ = 1 U/ml Thrombin

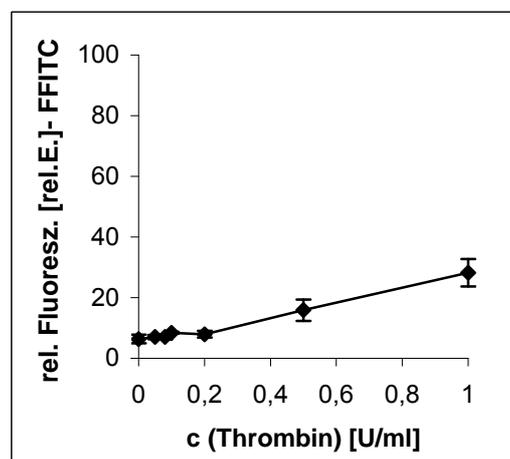
III.4.4 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Hundes

An den Thrombozyten des Hundes fiel die durch Kollagen induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC am stärksten aus, während ADP und Eap nur eine mittlere Bindungsstärke hervorriefen, gefolgt von einer nur sehr schwachen Bindung induziert durch Thrombin (Abb. III.27a) - d)).

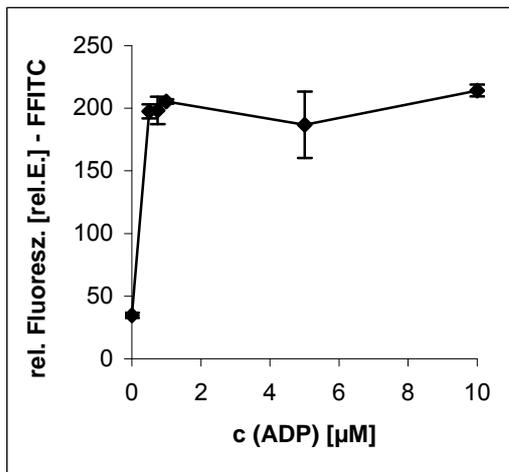
a)



b)



c)



d)

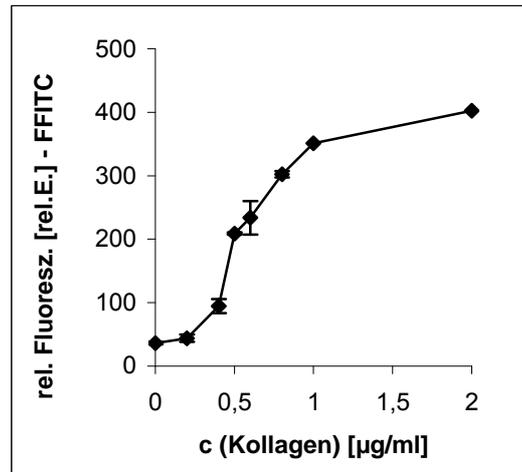


Abb. III.27a) - d): Bindung von Fibrinogen-FITC an Hundethrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

PRP (50.000 Tz/µl) vom Hund wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit (a) Eap, (b) Thrombin, (c) ADP und (d) Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelten Werte stellen die Mittelwerte der linearen Mediane +/- S.D. (n=3) dar.

Der Vergleich der verschiedenen Bindungsintensitäten induziert durch die jeweiligen Agonisten ergab außerdem, dass die Eap-induzierte Fibrinogenbindung signifikant geringer war (** p < 0,01) als die durch Kollagen und ADP hervorgerufene, jedoch auch signifikant stärker als die durch Thrombin induzierte (***) p < 0,001) (Abb. III.27e).

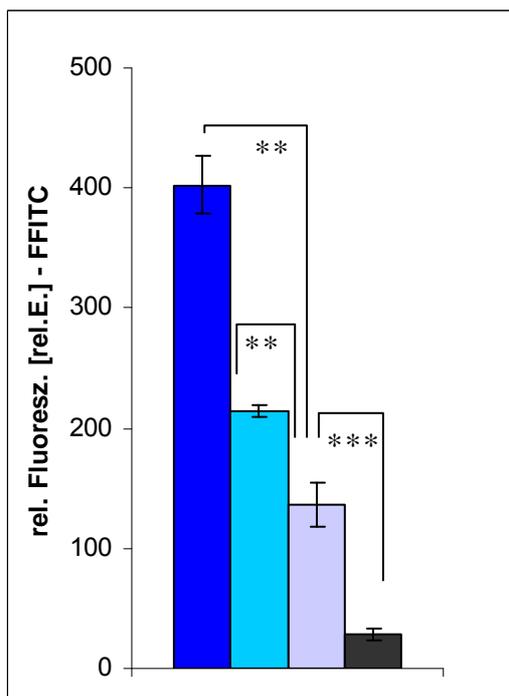


Abb. III.27e): Vergleichende Darstellung der Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Hundes induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen.

PRP (50.000 Tz/µl) vom Hund wurde mit Fibrinogen-FITC versetzt und für 5 min mit Eap, Thrombin, ADP und Kollagen inkubiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Eap-induzierte Fibrinogenbindung war signifikant geringer als die durch Kollagen und ADP (** p < 0,01), aber auch signifikant stärker als die durch Thrombin (***) p < 0,001).

Die ermittelten Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten der linearen Mediane +/- S.D. (n=3).

■ = 20 µg/ml Eap ■ = 2 µg/ml Kollagen

■ = 2 µM ADP ■ = 1 U/ml Thrombin

IV. Diskussion

Eap gehört zu der Gruppe der SERAMs („Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules“). Zusammen mit den MSCRAMMs (u. a. FnBPA, FnBPB, ClfA und ClfB) werden die SERAMs auch als Staphylokokken-Adhäsine bezeichnet (Patti, 1994). Letztere sind kovalent an die Bakterienoberfläche gebunden; das Eap bindet unter anderem an eine neutrale Phosphatase (NPase) auf der Bakterienoberfläche. Die fast nicht zu sättigende Bindungskapazität der Bakterienoberfläche spricht dafür, dass die Bindung von Eap nicht nur an spezifische Rezeptoren erfolgt.

Seine ungewöhnlich vielseitige Bindungsbereitschaft an Plasma- und Matrixproteine verdankt das Bakterienprotein seinen Eap-Domänen, auch „tandem repeats“ genannt. Diese Bindungsflexibilität ist eine der wichtigsten Eigenschaften von *S. aureus*, denn die Interaktions- und Adhäsionsfähigkeit am Wirtsgewebe ist der erste Schritt für eine erfolgreiche Infektion und die oben genannte Invasion des Bakteriums eine Möglichkeit, den Abwehrmechanismen des Körpers zu entkommen (Hansen et al., 2006).

Eap bindet an eine Vielzahl von Plasma- und Matrixproteinen, wie z.B. Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, TSP-1, Prothrombin und Kollagen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch Eap, so wie andere Staphylokokken-Adhäsine (z. B. die FnBPs), Plättchen aktivieren kann, bzw. welchen Einfluss es auf die verschiedenen Plättchenfunktionen hat.

IV.1 Einfluss von Eap auf humane Thrombozyten

IV.1.1 Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen an humane Thrombozyten

Eine Aktivierung der Thrombozyten ist durch verschiedene Merkmale charakterisiert, wie die Expression von bestimmten Proteinen und die Ansammlung von prokoagulantem Komplexen an der Plättchenoberfläche, sowie die Bindung von Adhäsionsproteinen (siehe I.2).

Der TF auf den Fibroblasten wird bei einer Verletzung des Endothels freigelegt oder auf Endothelzellen und Monozyten infolge einer Entzündung exprimiert (Bogdanov, 2003; Celi, 1994). Der TF/FVIIa-Komplex stößt im Folgenden die Aktivierungskaskade der Gerinnungsfaktoren an, mit der Bildung von Thrombin als stärkster und wichtigster Plättchenagonist als Folge (Hoffman und Monroe, 2001). Mit der Plättchenaktivierung geht auch die Sekretion der α -Granula und der dichten Granula einher, aus denen unter anderem Plättchenagonisten freigesetzt werden, z. B. aus den dichten Granula ADP, Serotonin und TxA_2 (Jurk und Kehrel, 2005).

Diese Agonisten und auch die Bindung von Kollagen an GPVI induzieren über die an die Rezeptoren gekoppelten G_q -Proteine, die Aktivierung der PLC β mit folgender IP $_3$ -induzierter Freisetzung von Ca^{2+} aus dem „dense tubular system“ (DTS). Der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg und die Aktivierung der Proteinkinase C durch DAG führt zur Aktivierung und Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors (inside-out-signaling). Diese Konformationsänderung ist notwendig, um den GPIIb/IIIa-Rezeptor in einen Zustand höherer Affinität für die Liganden zu überführen, der auf ruhenden Plättchen nur eine sehr niedrige Affinität für diese aufweist. An die aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren bindet dann zum Beispiel Fibrinogen, welches als Brückenmolekül bei der Aggregatbildung der Plättchen fungiert (Offermanns, 2006).

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass auch das Staphylokokken-Adhäsin Eap ein Plättchenaktivator ist. Während die Plättchen mit Eap inkubiert wurden, induzierte es die Bindung von Fibrinogen-FITC an deren Oberfläche. Die Abbildung III.1 zeigt, dass die Bindungskapazität mit Zunahme der Konzentration an Eap anstieg.

Der Vergleich der Bindungsintensitäten von Fibrinogen-FITC an Blutplättchen induziert durch Eap nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigt, dass die Bindung dieses FITC-konjugierten Proteins nicht nur mit dem Anstieg der Eap-Konzentration zunahm, sondern auch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Eap (Abb. III.2).

Ein Vergleich der Eap-induzierten Aktivierung der Plättchen in GFP und im PRP (Abb. III.3) zeigte, dass die Bindung von Fibrinogen-FITC an aktivierten Plättchen in GFP bei gleichen Eap-Konzentrationen und gleicher Inkubationszeit bis zu dreimal stärker ausgeprägt war.

Man kann vermuten, dass die bei der Gelfiltration abgetrennten Plasmabestandteile im PRP möglicherweise einen hemmenden Einfluss auf die Interaktion zwischen Eap und den Plättchen hatten. Kompetitiv könnte es zum Beispiel zu einer Interaktion zwischen Eap und den Plasmaproteinen gekommen sein, wie Fibrinogen, Fibronectin und Prothrombin, an die Eap ja auch bindet (Palma et al., 1999). Andererseits könnte das Plasmafibrinogen kompetitiv zu dem Fibrinogen-FITC an den GPIIb/IIIa-Rezeptoren der Plättchen gebunden haben, so dass letzteres zum Teil verdrängt wurde und somit Fluoreszenzsignale von geringerem Ausmaß von den Plättchen ausgingen.

Der Vergleich der Fibrinogenbindungsintensitäten, die durch verschiedene Agonisten induziert wurden, hier durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen (Abb. III.4a) - e)), zeigt, dass Eap die Thrombozyten stärker aktivierte als Thrombin, welches der stärkste physiologische Plättchenagonist ist (Coughlin, 2000).

Über die möglichen Gründe bleibt nur zu spekulieren. Da Thrombin zum Beispiel bei zu langer Lagerung bei Raumtemperatur instabil wird und seine Aktivität verlieren kann, könnte

die geringe gemessene Aktivität eventuell auf eine nicht optimale Versuchsdurchführung zurückzuführen sein.

Möglicherweise induzierte Eap die Plättchenaktivierung aber auch parallel über mehrere unterschiedliche Mechanismen, so dass Eap bei der gleichen Aktivierungszeit von 5 min eine stärkere Stimulation der Thrombozyten im Vergleich zu den anderen Agonisten bewirkte.

Dass das Staphylokokken-Protein Eap die Fibrinogenbindung an Thrombozyten induzierte, konnte ebenso in einem anderen Assay, und zwar mit Hilfe der Aggregometrie, belegt werden.

Die Abbildungen III.5a) - e) zeigen, dass Eap eine Zunahme der Lichttransmission schon ab einer Konzentration von 0,5 µg/ml induzieren konnte. Eine signifikante Fibrinogen-FITC-Bindung konnte im Durchflusszytometer dagegen erst mit 5 µg/ml Eap beobachtet werden (Abb. III.2). Eine maximale Aggregation wurde im Aggregometer schon ab einer Konzentration von 2,5 µg/ml Eap hervorgerufen (Abb. III.5b)), während diese Konzentration bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen lediglich eine geringe Fibrinogen-FITC-Bindung auslösen konnte (Abb. III.2).

Dies könnte daran liegen, dass bei der Aggregometrie weit höhere Thrombozytenkonzentrationen eingesetzt wurden (300.000 Tz/µl) als bei der Durchflusszytometrie (50.000 Tz/µl), so dass hier durch Degranulation eine weitaus größere Menge an Granulainhaltsstoffen freigesetzt werden konnte. Die aus aktivierten Thrombozyten freigesetzten Agonisten, wie TxA₂, und die Gerinnungsfaktoren, oder das auf der Plättchenoberfläche sekundär gebildete Thrombin könnten als solches schon eine Verstärkung der initialen Aktivierung durch Eap bewirken (Jurk und Kehrel, 2008). Darüber hinaus wurden die Thrombozyten bei der Aggregometrie zusätzlich zur Behandlung mit Eap durch Rühren stimuliert. Da Thrombozyten auch durch Scherkräfte aktiviert werden können, stellte dieses Rühren einen zusätzlichen Stimulus dar, welcher die Thrombozyten zwar nicht alleine aktivieren konnte, jedoch eventuell dazu in der Lage war, die Aktivierung durch Eap weiter zu verstärken.

IV.1.2 Sekretion der α -Granula induziert durch Eap

Auch die Sekretion der α -Granula ist ein sicheres Indiz für die Aktivierung der Thrombozyten. Nachweisbar ist die Sekretion der α -Granula durch Markierung des ursprünglich granulamembranständigen P-Selektins (CD62P), welches mit der Membranfusion auf die Plättchenoberfläche transloziert wird (Rendu und Brohard-Bohn, 2001). Für die Markierung wurde hier der monoklonale Antikörper anti-CD62P-FITC verwendet. Die Abbildung III.6 zeigt, dass die Bindung des Antikörpers mit dem Anstieg der Eap-Konzentration zunahm. Daraus lässt sich schließen, dass mit steigender Eap-Konzentration mehr α -Granula sezerniert und somit auch mehr Granula-Inhaltsstoffe freigesetzt wurden.

Wie bereits in Kapitel I.3.1 beschrieben, besitzen die Thrombozyten die Fähigkeit, mit Leukozyten und Endothelzellen zu interagieren, so dass sie auch auf immunologische Prozesse Einfluss nehmen (Frenette et al., 2000).

Das P-Selektin, welches mit der Sekretion der α -Granula auf die Membranoberfläche transloziert wird, ist ein essenzieller Bestandteil dieser Interaktionen. Ebenso wird es aktivierungsbedingt aus den Weibel-Palade-Körperchen freigesetzt und auf die Endothelzellmembran transloziert (Celi et al., 1994).

Den entsprechenden Liganden, das PSGL-1 (P-Selectin Glykoprotein Ligand-1) tragen Monozyten und PMNs (Chen und Geng, 2006). Frenette et al. (2000) haben nachgewiesen, dass PSGL-1 auch auf Thrombozyten und auf aktivierten Thrombozyten verstärkt exprimiert wird. Allgemein entstehen durch die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 heterotypische Aggregate aus Plättchen und Leukozyten (Kim et al., 1998). Auch das Rollen der Plättchen und Leukozyten am aktivierten Endothel wird über diese Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 auf den jeweiligen Zellen vermittelt. Dabei wird das Rollen der Leukozyten am Endothel unter Bedingungen hoher Scherkräfte primär über die P-Selektin-PSGL-1-Verbindung in den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten vermittelt, welches eine lockere Adhäsion der Leukozyten und Plättchen an das Endothel, bzw. der Leukozyten an den Plättchen vermittelt (Ostrovsky et al., 1998).

Wie in Kapitel I.5.3 beschrieben wurde, und wie auch aus den hier dargestellten Ergebnissen hervorgeht, beeinflusst Eap die immunologischen Vorgänge auf unterschiedliche Weise, das heißt unter anderem auch indirekt über die Plättchenaktivierung:

Einerseits initiiert Eap die Interaktion zwischen Leukozyten, Thrombozyten und dem Endothel, indem es die Plättchen aktiviert und damit die Expression von P-Selektin auf den Thrombozyten induziert. Das möglicherweise bei der Eap-induzierten Plättchenaktivierung sekundär entstandene Thrombin aktiviert die Endothelzellen mit deren P-Selektin- und

Adhäsionsmolekül-Expression als Folge, so dass die Migration der Leukozyten bei einer Entzündung ins umliegende Gewebe gefördert würde (Celi et al., 1994).

Andererseits blockiert Eap aber auch die Extravasation der Leukozyten ins entzündete Gewebe, indem es an ICAM-1 bindet und somit die feste Bindung zwischen den leukozytären β_2 -Integrinen und dem endothelialen ICAM-1 verhindert (Chavakis et al., 2002). Die Leukozytentransmigration über das Endothel wird durch Eap nur am aktivierten Endothel gehemmt und ist allein von ICAM-1 abhängig. ICAM-1 hat zudem eine zentrale Funktion bei der Interaktion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC), wovon die T-Zellproliferation abhängig ist (Haggar et al., 2004). Die Publikation von Van Seventer et al. (1990) bestärkt die Aussage von Haggar et al., da laut deren Ergebnissen die Interaktion zwischen ICAM-1 auf APCs und LFA-1 auf T-Zellen ein physiologisch essenzieller Co-Stimulus für die T-Zellproliferation ist.

Haggar et al. berichteten 2005, dass Eap die T-Zellproliferation moduliert. In niedrigen Konzentrationen stimuliert es die Th₂-Zellproliferation und damit die humorale Immunantwort, während hohe Konzentrationen an Eap die Th₁-Zellproliferation und damit die zelluläre Immunantwort hemmen. Somit ergänzen sich seine Ergebnisse mit denen von Chavakis et al. (2005), Haggar et al. (2004) und Van Seventer et al. (1990), dass Eap über die Bindung an ICAM-1 auf Immunzellen diese Vorgänge modulieren könnte (siehe IV.1.4).

Das bei einer Sepsis ins Blut freigesetzte Eap schränkt, der oben genannten Literatur zufolge, die zelluläre Abwehr stark ein. Diese ist allerdings der wichtigste Mechanismus, um Keime aus dem Körper zu eliminieren. So wird die Entstehung von chronischen Infektionen, wie Arthritis, Abszessbildung oder Osteomyelitis begünstigt (Haggar et al., 2004).

Andererseits bedeutet die Blockade der Leukozytentransmigration durch Eap einen Vorteil bei Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose. Xie et al. konnten mit ihren Ergebnissen 2006 zeigen, dass Eap die Transmigration von Neutrophilen über ihr β_2 -Integrin und das ICAM-1 der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen einer experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) im Tiermodell hemmt. Auf diese Weise konnte die Zugabe von Eap die Entstehung einer EAE verhindern und die klinischen Symptome bei einer bestehenden EAE fast vollständig umkehren. Auch nach Absetzen des Eaps blieb dieser hemmende Effekt erhalten.

Diese Erkenntnisse sind laut Xie et al. eventuell auf die Autoimmunerkrankung der Multiplen Sklerose übertragbar, wo autoreaktive Lymphozyten ins ZNS-Gewebe migrieren und dort gegen antigene Strukturen der Myelinscheide Antikörper bilden, die dadurch zerstört wird.

Ein weiterer Aspekt der Auswirkungen der Eap-bedingten Plättchenaktivierung kommt hinzu. Allgemein sind Thrombozyten außer an der Hämostase auch noch an anderen Prozessen beteiligt, die auf eine Verletzung folgen, wie Entzündungsprozesse, antimikrobielle Abwehr

und die Wundheilung. Aus den aktivierten Plättchen werden dabei Chemokine freigesetzt, die Leukozyten anlocken und aktivieren, und Wachstumsfaktoren, die chemoattraktiv und stimulierend auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Keratinozyten wirken (Klinger et al., 2003). So wird die Wundheilung einerseits mit der Thrombozytenaktivierung durch Eap stimuliert und andererseits wiederum durch seinen anti-angiogenetischen Effekt ausgebremst. Letzteres noch zusätzlich durch die Blockade der ICAM-1-abhängigen Transmigration der Leukozyten, die durch ihre Freisetzung inflammatorischer Zytokine einen Entzündungsprozess mit folgender Regeneration in Gang setzen würden. Der anti-angiogenetische Effekt wird durch die Hemmung der Phosphorylierung der Kinasen ERK-1/ERK-2 auf der Ebene von Ras vermittelt, die allgemein in Zellen Bestandteil des MAP-Kinase-Signalweges sind (Sobke et al., 2006). Somit wird die Proliferation der an der Wundheilung beteiligten Zellen gehemmt und kann eine Neovaskularisierung mit folgender Regeneration des Wundgewebes nicht stattfinden. Zudem interagiert Eap mit dem $\alpha_v\beta_1$ -Integrin auf den Endothelzellen, welches deren Adhäsion an den Proteinen der extrazellulären Matrix bei der Neovaskularisierung vermitteln würde (Athanasopoulos et al, 2006).

IV.1.3 Sekretion der „dense bodies“ induziert durch Eap

Die dichten Granula („dense bodies“) der Plättchen enthalten kleine Moleküle, die die Hämostase verstärken.

Hochkonzentriert werden die Adenin- und Guaninnukleotide ADP, ATP, GDP und GTP in ihnen gespeichert. Serotonin und Histamin werden durch Endozytose aufgenommen und in den dichten Granula gespeichert. Auch Medikamente, wie Mepacrin und Chloroquin, beides Antiprotozoika, werden in den „dense bodies“ gespeichert (Rendu und Brohard-Bohn, 2001).

Auch anhand der Sekretion der „dense bodies“ kann die Aktivierung der Plättchen festgemacht werden, da auch die Granulamembran charakteristische Proteine enthält, die mit der Granulasekretion und Fusion der Membranen an die Plättchenoberfläche transloziert werden, unter anderem das Granulophysin (CD63) (Nishibori et al., 1993).

In dieser Arbeit wurden die Eap-behandelten Plättchen mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD63-FITC inkubiert, und nach erfolgter Sekretion der dichten Granula und Expression des CD63 auf der Thrombozytenoberfläche hätte dieser an CD63 binden müssen.

Die Abbildung III.7 zeigt allerdings, dass Eap die Bindung von anti-CD63-FITC nicht induzieren konnte. Auch eine Mepacrinfreisetzung der Eap-behandelten Thrombozyten

konnte nicht festgestellt werden (Abb. III.8). Eap scheint somit die Sekretion der „dense bodies“ nicht, oder nur in so geringem Maße, induzieren zu können, dass sie im Durchflusszytometer nicht detektierbar war.

Harrison und Cramer (1993) beschrieben in ihrem Artikel, dass der Inhalt der Granula in unterschiedlichen Raten und nicht grundsätzlich parallel und unter gleichen Bedingungen der Thrombozytenaktivierung freigesetzt wird; während die Sekretion der α -Granula schon bei der Plättchenaktivierung durch schwächere Agonisten induziert wird - unabhängig von der Sekretion der „dense bodies“ - müssen für die Sekretion der Lysosomen schon stärkere Agonisten einwirken.

So könnten mögliche Gründe für die fehlende CD63-Expression auf der Plättchenoberfläche die folgenden sein:

Der von Harrison und Cramer (1993) erwähnte unterschiedliche Einfluss von stärkeren und schwächeren Agonisten auf die Plättchensekretion könnte durchaus auch auf Eap zutreffen. Insgesamt kann man also sagen, dass den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge Eap im Vergleich zu Thrombin, ADP oder Kollagen zwar eine stärkere Fibrinogenbindung hervorrief (vgl. Abb. III.4a) - e)), dagegen aber die Sekretion der Granula scheinbar weniger stark induzierte (vgl. Abb.4 in Art. von Rendu und Brohard-Bohn, 2001 mit Abb. III.6 – III.8).

Dies lässt die Vermutung zu, dass Eap die Thrombozyten über andere Mechanismen aktiviert, so dass die verschiedenen Aktivierungsmerkmale, zum Beispiel im Vergleich zu Thrombin, in so unterschiedlichem Maße ausfallen.

Außerdem kommt die Tatsache hinzu, dass die α -Granula einen sehr viel größeren Anteil (9-15%) am gesamten Thrombozytenvolumen haben als die dichten Granula (0,3-1,2%) (Morgenstern, 1999).

Wenn Eap nun die Granulasekretion in sehr viel geringerem Maße induziert als zum Beispiel Thrombin, werden allgemein weniger Granula und im Verhältnis noch viel weniger oder gar keine „dense bodies“ freigesetzt, so dass dann auch entsprechend wenig oder kein CD63 auf der Plättchenoberfläche exprimiert wird, während eine Expression von CD62P zwar auch verringert, aber immer noch messbar ist.

Die nicht vorhandene Sekretion der „dense bodies“ belegt soweit auch, dass bei der Plättchenaktivierung durch Eap allein keine sekundäre Verstärkung durch ADP und Serotonin möglich war. Diese konnte im Fall von Eap somit nur über das auf der prokoagulanten Plättchenoberfläche gebildete Thrombin und das sekundär freigesetzte TxA_2 verstärkt werden (Jurk und Kehrel, 2008).

IV.1.4 Eap-induzierte Expression von CD40L auf der Oberfläche humaner Thrombozyten

Mit dem Ergebnis dieser Arbeit konnte belegt werden, dass Eap die Expression des CD40L auf Thrombozyten induzierte; auch hier nahm die Bindungsintensität mit steigender Eap-Konzentration zu (Abb. III.9).

Das heißt, eine Aktivierung der Thrombozyten durch Eap könnte möglicherweise die im Folgenden beschriebenen Interaktionen sowohl zwischen Plättchen und immunologischen Zellen, als auch zwischen Plättchen und Endothelzellen induzieren.

Der CD40-Ligand (CD154 oder CD40L) ist ein Transmembranprotein, welches zunächst auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen, Mastzellen und Basophilen und dann auch auf Thrombozyten nachgewiesen werden konnte; strukturell ist der CD40-Ligand verwandt mit dem Zytokin TNF α (Henn et al, 1998). Der entsprechende Rezeptor CD40 gehört zur TNF-Rezeptorfamilie und ist charakteristischerweise auf B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, CD8⁺-T-Zellen und nicht zuletzt auch auf den Plättchen exprimiert (Henn et al., 1998; Kehrel und Jurk, 2004).

Die CD40L- und CD40-tragenden Zellen interagieren über diese Verbindung miteinander. So wäre es durchaus möglich, dass infolge der Eap-induzierten CD40L-Expression Assoziate aus Thrombozyten und Leukozyten entstehen könnten, was Gegenstand zukünftiger Studien sein sollte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ligation des endothelialen CD40 mit CD40L auf Plättchen unter anderem die Expression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 auf kultivierten Umbilikalvenenzellen induzierte, und sie somit in den Zustand versetzt, Leukozyten für die Transmigration binden zu können (Karmann et al., 1995).

E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 sind Adhäsionsmoleküle, welche die Bindung von Neutrophilen, Monozyten und im späteren Verlauf auch von Lymphozyten an die entzündete Gefäßwand vermitteln, was wiederum durch die Bindung von Eap an ICAM-1 blockiert wird (Chavakis et al., 2002).

Werden Thrombozyten an den Strukturen von beschädigtem Endothel aktiviert, so exprimieren sie innerhalb von Sekunden CD40L auf ihrer Oberfläche und verlinken so das hämostatische System mit dem Abwehrsystem. Durch Interaktion des thrombozytären CD40L mit CD40 der Endothelzellen werden diese aktiviert und setzen infolge dessen verschiedene Chemokine frei, wodurch Neutrophile angelockt (durch IL-8) und Monozyten rekrutiert und aktiviert werden (durch MCP-1). Auch die Leukozyten setzen wiederum Zytokine frei, welche die Entzündungsreaktion, verstärken (Henn et al., 1998).

CD40L übernimmt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Funktion des humoralen Abwehrsystems. Mit Hilfe von CD40L initiieren Thrombozyten die Reifung der dendritischen

Zellen, verstärken die zytotoxische Immunantwort der CD8⁺-T-Zellen und bewirken an B-Zellen den Isotyp-Switch, also den Wechsel von der IgM- zur IgG-Produktion, wodurch die Antikörper eine höhere Affinität zu Antigenen bekommen.

CD40L wird auch auf Th₂-Zellen expremiert. Allerdings ist die Dauer zwischen Aktivierungsstimulus und CD40L Expression auf der T-Zelloberfläche deutlich länger als die der Plättchen, die es innerhalb von wenigen Sekunden nach der initialen Aktivierung exprimieren. So können Thrombozyten CD40L-abhängig die Effekte auf die Immunzellen in sehr viel kürzerer Zeit induzieren als Th₂-Zellen.

Nach einiger Zeit wird der CD40-Ligand von Thrombozyten abgespalten und gelangt als lösliches CD40L (soluble oder sCD40L) in die Zirkulation; Thrombozyten gelten hier als Hauptquelle des sCD40L. Dieses kann im Gegensatz zu CD40L auf der Plättchenoberfläche keine Entzündungsreaktion der Endothelzellen induzieren, stabilisiert aber als GPIIb/IIIa-Ligand arterielle Thromben (Hundelshausen und Weber, 2007). An den Plättchen bewirkt sCD40L ein „outside-in-signaling“ mit deren Aktivierung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoff- und Nitrogenspezies. Somit verstärkt das von den Plättchen abgespaltene sCD40L durch Aktivierung weiterer Thrombozyten die Aggregation, bzw. Adhäsion von sowohl Plättchen untereinander, von Plättchen und Leukozyten, als auch von Plättchen und Endothelzellen; dabei finden die Interaktionen über CD40-CD40L, P-Selektin-PSGL-1 und CD40L-GPIIb/IIIa statt (Chakrabarti et al., 2005). An T-Zellen gebundener CD40L kann ebenfalls Plättchen aktivieren, die dadurch Chemokine wie RANTES freisetzen und die T-Zellrekrutierung damit verstärken, und somit indirekt auch die Entzündungsreaktion (Hundelshausen und Weber, 2007).

IV.1.5 Eap induziert eine prokoagulante Oberfläche auf humanen Thrombozyten

Ein weiteres Zeichen der Plättchenaktivierung ist die prokoagulante Thrombozytenoberfläche. Diese konnte durch die Inkubation humaner Thrombozyten mit Eap induziert werden und war anhand der Bindung von Annexin-V-FITC an Plättchen messbar (Abb. III.10a)). Die Bindungsstärke nahm auch hier mit der Konzentration an Eap zu.

Die Membran der Thrombozyten ist, wie die von anderen Säugerzellen, eine Lipiddoppelmembran und besitzt eine spezifische Anordnung und Zusammensetzung an Phospholipiden. Im ruhenden Zustand sind in die äußere Lipidschicht vor allem Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM), beides Cholinophospholipide, eingelagert, während in der ans Zytoplasma grenzenden Schicht hauptsächlich negativ geladenes Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) vorhanden sind. Dieses

Ungleichgewicht wird durch Ca^{2+} - und ATP-abhängige Enzyme aufrechterhalten: die Aminophospholipid Translokase, auch „Flippase“ genannt, transferiert PE und PS von der äußeren zur inneren Schicht. Ein zweites Enzym, die „Floppase“ transferiert ebenfalls PE und PS von der äußeren zur inneren Lipidschicht und die Cholinophospholipide von der inneren zur äußeren Schicht (Shapira et al., 2000).

Werden die Thrombozyten aktiviert, kommt es zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg (Klages et al., 1999), so dass die Ca^{2+} -abhängige „Scramblase“ eine rapide Umlagerung des negativ geladenen PS und PE zur äußeren Lipidschicht induziert (Keuren et al., 2005), auch „Flip-Flop-Effekt“ genannt (Jurk und Kehrel, 2005).

Das hier verwendete Annexin-V-FITC diente dem Nachweis der prokoagulanten Oberfläche mit negativ geladenem PS und PE. Es bindet über Ca^{2+} mit sehr hoher Affinität vor allem an das PS, so dass die Bindungsintensität, bzw. die Fluoreszenzstärke als indirektes Maß für die PS-Expression in der äußeren Lipidschicht der Thrombozytenmembran angenommen werden kann (Shapira et al., 2000).

Diese Expression der negativ geladenen Phospholipide ist für die strukturierte Anordnung von prokoagulatorischen Komplexen und somit für eine effiziente Thrombinentstehung essentiell, jedoch allein nicht ausreichend. Die Gerinnungsfaktoren müssen zusätzlich an oberflächenassoziierte Proteinrezeptoren binden. Durch die Bindung der Gerinnungsfaktoren und prokoagulatorischen Komplexe an das negativ geladene PS und an die Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche in Abhängigkeit von Ca^{2+} (Bom und Bertina, 1990) wird so auch gewährleistet, dass der Gerinnungsvorgang auf die Plättchenoberfläche lokalisiert und somit auf ein kleines Gebiet begrenzt wird (Hoffman und Monroe, 2001).

Das heißt, auch die hier gezeigte Eap-induzierte Bindung von Gerinnungsfaktoren kann als Maßstab für die PS-Expression und für die Expression der jeweiligen Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran gewertet werden (Abb. III.10b - d)). Getestet wurde hier der rekombinante Faktor VIIa (rFVIIa) (b), FVIII (c) und FXIII (d), für die hier durchgeführten Versuche alle mit FITC konjugiert. Die Bindungsintensität nahm auch hier in Abhängigkeit von der Eap-Konzentration zu. Das heißt, je mehr PS durch den Einfluss von Eap auf der Plättchenoberfläche präsentiert wurde, desto mehr Annexin-V-FITC, bzw. mehr von den Gerinnungsfaktoren konnten daran binden, was für einen stärkeren prokoagulantem Zustand und eine höhere negative Gesamtladung steht (Shapira et al., 2000).

Hoffman veröffentlichte in seinem Artikel (2003) über das zellbasierte Hämostasemodell und die Rolle des FVIIa als Medikament für Hämophiliepatienten, dass FVIIa mit der prokoagulantem Oberfläche der Plättchen eine leichte Bindung eingeht, wo der Gerinnungsfaktor die Entstehung von FXa mit Bildung des Prothrombinasekomplexes induziert, woraufhin die Thrombinbildung folgt.

FVIII bildet mit vWF einen Komplex und ist so in der Zirkulation vor proteolytischer Spaltung, z.B. durch Protein C, geschützt. Zweitens wird so die vorzeitige Bindung an FIXa und an die Phospholipide der Membran verhindert, allerdings ist FVIII nicht vor der Thrombinspaltung geschützt. Die Spaltung des Komplexes durch Thrombin resultiert in einer Affinitätsabnahme zu vWF, während die zur prokoagulanten Plättchenoberfläche zunimmt. An diese bindet dann FVIIIa (aktiviert durch Thrombin), bzw. unter physiologischen Bedingungen im Tenase-Komplex mit FIXa. Dieser aktiviert wiederum FX mit der Bildung des Prothrombinasekomplexes (Ahmad et al., 2000).

Diese prokoagulatorische Aktivität der Plättchenoberfläche wird noch verstärkt, wenn von den Plättchen Mikrovesikel, auch „Mikropartikel“ genannt, durch einen exozytotischen Knospungsprozess abgeschnürt werden.

Eap konnte die Bildung von Mikropartikeln nicht induzieren (Abb. III.11), möglicherweise mit demselben Hintergrund wie bei der Granulasekretion, wo bereits die Vermutung gestellt wurde, dass Eap die Thrombozyten über andere Mechanismen aktiviert, so dass gewisse Plättchenfunktionen nicht induziert werden, wie zum Beispiel hier die Mikropartikel-Bildung.

Diese haben einen Durchmesser von etwa 0,1 μm und exprimieren, wie die Thrombozyten auch, vermehrt negativ geladenes PS auf der Außenseite der Membran, so dass auch auf den Mikropartikeln eine strukturierte Anordnung der Gerinnungsfaktoren und -komplexe entsteht (Holme et al., 1997). Das heißt, mit der Mikropartikel-Bildung wird die für das Blut und die Gerinnungsfaktoren zur Verfügung stehende prokoagulante Oberfläche stark vergrößert; eine entsprechend stärkere Thrombinbildung ist die Folge.

Damit es zur Mikropartikel-Bildung kommt, bedarf es einer Aktivierung der Thrombozyten durch sehr starke Agonisten oder durch eine Kombination von ihnen, wie Thrombin plus Kollagen (Nieuwland et al., 2000). Auch durch hohen Scherstress können Thrombozyten aktiviert und die Mikropartikel-Bildung induziert werden. Derartige Bedingungen herrschen in arteriosklerotisch verengten Gefäßen (Holme et al., 1997).

IV.1.6 Einfluss verschiedener Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten

Die Abbildungen III.12a) + b) und III.13 zeigen den Vergleich der Einflüsse verschiedener Antikoagulanzen auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Blutplättchen des Menschen. Hirudin und K^+ -EDTA hatten keinen Einfluss auf die Eap-induzierte Aktivierung der Plättchen im Vergleich zu Citrat.

Das niedermolekulare und das unfraktionierte Heparin dagegen konnten diese komplett blockieren. Melagatran hatte nur eine partielle Hemmwirkung.

K^+ -EDTA ist ein Chelator. EDTA bildet mit Ca^{2+} unlösliche Komplexe. Ca^{2+} ist allerdings für den Hämostaseprozess essentiell. So ist die Bindung der Gerinnungsfaktoren an das PS der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche und deren Aktivierung abhängig von Ca^{2+} (Bom und Bertina, 1990). Ist dieses mit EDTA oder Citrat im Plasma komplexiert, steht es somit der Hämostase nicht zur Verfügung, so dass diese nicht stattfinden kann.

Das Hirudin ist ein Polypeptid und spezifischer Thrombin-Inhibitor, der natürlicherweise von dem Blutegel *Hirudo medicinalis* beim Blutsaugen freigesetzt wird und auch aus diesem für medizinische Zwecke isoliert wurde und heutzutage rekombinant hergestellt wird. Es bindet mit sehr hoher Spezifität und Affinität an Thrombin. Hirudin besteht aus einer kompakten, gewundenen N-terminalen Domäne und einem einsträngigen carboxyterminalen Ende. Die carboxyterminale Domäne bindet an die Fibrinogenbindungsstelle (anionische Bindungsstelle) des Thrombins und inhibiert so die Interaktion mit Fibrinogen. Die N-terminale Domäne des Hirudins bindet dagegen an das katalytisch aktive Zentrum und an die apolare Bindungsstelle des Thrombins (Chang, 1990). So inhibiert die N-terminale Domäne durch Bindung an das aktive Zentrum alle enzymatischen Funktionen des α -Thrombins. Die C-terminale Domäne des Hirudins dagegen inhibiert alle Funktionen, die durch die anionische Bindungsstelle des α -Thrombins vermittelt werden, wie die proteolytische Spaltung des Fibrinogens zu Fibrin, die Interaktion mit Thrombomodulin, wodurch auch die Aktivierung des Protein C gehemmt wird, ebenso die der Plättchen, der Endothelzellen und der Gerinnungsfaktoren (Schmitz, Rothe, Dodt, 1991).

Thrombin besitzt eine zentrale Funktion im Hämostaseprozess, vor allem indem es das lösliche Fibrinogen, welches die Plättchen reversibel miteinander verbindet, zu Fibrin spaltet, so dass die Plättchen irreversibel aneinander aggregieren. Außerdem verstärkt es die eigene Bildung über ein positives Feedback durch Aktivierung der Gerinnungsfaktoren V, VIII, und XI. Es aktiviert auch FXIII, der das Fibrin, bzw. den Thrombus durch Querverbindungen stabilisiert (Narayanan, 1999). Auf dem Fibrin reduziert es dann die fibrinolytische Aktivität, indem es den Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse Inhibitor aktiviert (Von dem Borne et al.,

1997). Über die Aktivierung der „protease-activated-receptors“ (PAR-1 und PAR-4) ist Thrombin für die primäre Hämostase von Bedeutung, mit dem Formwandel der Plättchen, der Granulasekretion und der Fibrinogenbindung als Folge (Furie et al., 2001). Am Endothel induziert das Thrombin die Translokation des P-Selektins an die Zelloberfläche, welches das Rollen der Leukozyten am Endothel vermittelt (Dore et al., 1993).

Melagatran ist ebenfalls ein direkter Thrombininhibitor, der direkt und kompetitiv an das katalytisch aktive Zentrum des α -Thrombins bindet. Es bindet selektiv an α -Thrombin. Die einzige Serinprotease, die außerdem noch durch Melagatran gehemmt wird, ist Trypsin. Zudem gibt es noch den Unterschied zwischen den reversiblen und irreversiblen Thrombininhibitoren. Die Reversiblen, wie Melagatran, binden vorübergehend an Thrombin, so dass dieses nach der Dissoziation wieder in den Hämostaseprozess integriert werden kann, während die irreversiblen einen bleibenden Komplex mit Thrombin bilden, wie zum Beispiel Hirudin, mit erhöhter Blutungsneigung als Folge bei gleicher antikoagulatorischer Effektivität (White, 2005).

Unfraktioniertes (UFH) und niedermolekulares Heparin (NMH) sind indirekte Thrombininhibitoren, vermittelt durch die Bindung an Antithrombin (ATIII), ein körpereigenes Glykoprotein und Thrombininhibitor. Genauso wie die indirekten FXa-Inhibitoren vermitteln sie ihren antikoagulatorischen Effekt, indem sie durch die Bindung an ATIII und Thrombin einen ternären Komplex bilden. Das heißt, dass ihre antikoagulatorische Wirkung vom ATIII-Plasmalevel abhängt. Im Gegensatz dazu wirken direkte Thrombininhibitoren, wie Melagatran unabhängig von ATIII und anderen Co-Faktoren. Sie besitzen die Fähigkeit, sowohl thrombus-gebundenes als auch im Plasma gelöstes α -Thrombin zu hemmen (Mattsson et al., 2005). Letzteres ist besonders wichtig, da das in Thromben enthaltene α -Thrombin kontinuierlich die Entstehung von neuem Thrombin vermittelt, was zu rezidivierenden thrombo-embolischen Komplikationen führen kann. Somit bieten die direkten Thrombininhibitoren einen großen Vorteil gegenüber den indirekten, da sie beide Formen des α -Thrombins hemmen (Mutch et al., 2001).

Heparine gehören zur Familie der Glykosaminoglykane, bilden lange Polysaccharidketten und schwanken in ihrem Molekulargewicht zwischen 3.000 - 40.000 Da; zu den Glykosaminoglykanen gehören auch die Heparansulfate. Niedermolekulares Heparin wird durch Depolymerisation aus dem unfraktionierten Heparin hergestellt, womit das NMH ein Molekulargewicht von 4.000 - 5.000 Da erreicht. Im Heparinmolekül variiert der Sulfatierungsgrad, indem sich stark sulfatierte mit weniger sulfatierten Sequenzen abwechseln, zum Beispiel die ATIII- oder Pentasaccharidbindungsstelle mit einem hohen Sulfatierungsgrad (Linhardt und Gunay, 1999).

Im Wesentlichen ist die Pentasaccharidstruktur mit Iduron-, Glukuronsäure und N-acetyliertem Glukosamin für die anti-thrombotische Wirkung verantwortlich. Als

Substituenten sind an den Ringen vor allem die N-Acetylreste, Stickstoff- und Sauerstoffsulfat vorhanden, die eine stark negative Ladung erzeugen. Mit diesen negativen Gruppen kann sich Heparin sehr gut an die positiv geladenen Lysinreste des ATIII anlagern. Durch die gleichzeitige Bindung von ATIII und Thrombin an Heparin werden der Inhibitor und die Serinprotease räumlich dicht zusammengelagert, wobei ATIII durch die Bindung an Heparin eine Konformationsänderung durchläuft, mit der Aktivierung des ATIII als Folge. So entsteht ein ternärer Komplex, der seinerseits dann Serinproteasen, wie Thrombin, FIX und FX inhibiert.

Die Hemmung der Gerinnungsfaktoren durch ATIII erfolgt unter physiologischen Bedingungen sehr langsam und kann durch die Kopplung an Heparin um etwa das 1000-fache beschleunigt werden (Olson und Björk, 1991).

Ausgehend von den Versuchsergebnissen des Einflusses verschiedener Antikoaganzien auf die Eap-induzierte Fibrinogenbindung, gibt es verschiedene Schlussfolgerungen.

Da der Komplexbildner EDTA die Aktivierung der Thrombozyten durch Eap, hier im Sinne der Fibrinogenbindung, nicht hemmen konnte (Abb. III.12a + b)), kann man sagen, dass die Aktivierung unabhängig vom plasmatischem Ca^{2+} stattfinden muss.

Angesichts der Tatsache, dass Hirudin und Melagatran die Aktivierung nicht hemmen konnten, muss es außer der Thrombin-induzierten Aktivierung auch noch andere Mechanismen geben. Denn das sekundär auf der Thrombozytenoberfläche produzierte Thrombin wurde durch diese Thrombininhibitoren abgefangen (Abb. III.12a + b)), aber dennoch war die Aktivierung der Plättchen durch Eap nur sehr eingeschränkt zu hemmen.

Die Heparine bilden hier die Ausnahme und hemmen die Aktivierung der Thrombozyten durch Eap komplett (Abb. III.12b)).

Eap besitzt eine kationische Struktur. Die oben beschriebene Struktur der Heparine, deren negative Sulfatgruppen mit den positiven Gruppen des Antithrombins interagieren, spricht dafür, dass das ebenfalls positiv geladene Eap mit den Heparinsulfatgruppen interagieren könnte. Chavakis et al. beobachteten bereits eine Blockierung der Bindung von Eap an Proteine der extrazellulären Matrix (Chavakis et al., 2002). Die Bindung von Eap an Heparine ist deshalb vermutlich wichtig für die Adhäsion von *S. aureus* sowohl an Wirtsgewebe als auch an Thrombozyten. Die beobachtete Inhibition der Eap-induzierten Thrombozytenaktivierung beruht deshalb vermutlich auf einer Komplexbildung von Eap mit den exogen zugefügten löslichen Heparinen. Die positiven Effekte von Heparinen bei der Behandlung einer DIC im Laufe einer *S. aureus* Septikämie könnten so eventuell auch zum Teil auf die Inhibition der Eap-induzierten Plättchenaktivierung zurückzuführen sein (Gomes und Gomes, 2010).

IV.1.7 Einfluss thiolreaktiver Substanzen auf die Eap-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten

In den Abbildungen III.14 und III.16 wird deutlich, dass sowohl DTNB als auch pCMPS mit steigender Konzentration die Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten verstärkt hemmen konnten. Mit der höchsten Konzentration (7,5 mM) konnte DTNB die Fibrinogenbindung komplett hemmen. Bei den gewählten Konzentrationen an pCMPS fiel die Hemmwirkung etwas geringer aus, wobei eine signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 50 μ M vorhanden war. Die Fibrinogenbindung an Thrombozyten erfolgt hauptsächlich über das GPIIb/IIIa, welcher im Zuge einer Plättchenaktivierung eine Konformationsänderung durchläuft und so in einen Zustand höherer Affinität versetzt wird (Jurk und Kehrel, 2005).

Für eine feste Bindung ist zunächst ein erster lockerer Kontakt des Liganden mit dem Rezeptor notwendig, der dann eine Konformationsänderung und damit eine stark erhöhte Affinität für den Liganden induziert. An dieser Konformationsänderung sind vor allem Disulfidbrücken beteiligt, die einerseits den Liganden-Rezeptor-Komplex und andererseits die hochaffine Konformation des Integrins stabilisieren (Gofer-Dadosh et al., 1997).

Durch die Blockade von extrazellulären Thiolen konnten Lahav et al. die GPIIb/IIIa-vermittelte Adhäsion von Thrombozyten hemmen, was deutlich macht, dass die Adhäsion der Plättchen von den oberflächlich expositionierten Sulfhydrylgruppen abhängig ist. Die Adhäsion der Plättchen an das Endothel und an subendotheliale Strukturen ist für die Hämostase- und Entzündungsprozesse essentiell und konnte die Abhängigkeit von expositionierten Sulfhydrylgruppen im Allgemeinen für die GPIa/IIa und GPIIb/IIIa-Rezeptoren bewiesen werden (Lahav et al., 2000).

Solche Thiolblocker sind zum Beispiel DTNB und pCMPS, welche die Zellmembran nicht durchdringen und nur mit Thiolen auf der Zelloberfläche interagieren. Sie binden kompetitiv zum Adhäsionssubstrat, bzw. zum Liganden an Ectosulfhydrylgruppen. Somit wird die für eine feste Ligandenbindung essentielle Stabilisierung der affinen Konformation durch Disulfidbrücken verhindert (Lahav et al., 2002). Auch die in den Abbildungen III.14 und III.16 gezeigte Inhibition der Eap-induzierten Fibrinogen-Bindung an Plättchen könnte durch eine Blockade der freien Thiole des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa erklärt werden.

Im Gegensatz zur festen Adhäsion findet die erste Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor mit der Stimulation der Plättchen als Folge unabhängig von freien Thiolgruppen auf der Rezeptoroberfläche statt. Denn in den Versuchen von Lahav et al. (2002) konnte die Agonist-induzierte α -Granula-Sekretion mit dem P-Selektin-Transfer auf die Zelloberfläche kaum durch pCMPS oder DTNB beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass auch die Eap-induzierte P-Selektin-Expression auf der Plättchenoberfläche signifikant durch DTNB und pCMPS gehemmt wurde (Abb. III.15 und III.17). Nicht nur die Eap-induzierte Fibrinogenbindung, sondern auch die Degranulation scheint von freien extrazellulären Thiolen abhängig zu sein. Da Eap selbst keine Cysteinreste besitzt, sind diese freien Thiole höchstwahrscheinlich auf der Oberfläche der Thrombozyten zu vermuten. Auch die bereits erwähnte Komplexbindung mit Heparinen könnte durch eine Bindung an die Sulfatgruppen dieser Moleküle zustande kommen.

Allgemein besitzt ein beträchtlicher Anteil von Proteinen (ca. 10%), die in Säugetierzellen synthetisiert werden, Disulfidbrücken. Die strukturellen dienen der Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur. Die funktionalen Disulfidbrücken stellen die zweite Art dar, die sich wiederum in katalytische und allosterische unterteilen lassen. Indem die funktionalen Disulfidbrücken einen Redoxreaktionszyklus durchlaufen, triggern sie die Funktion und Struktur von Proteinen (Schmidt et al., 2006).

Katalytische Disulfidbrücken befinden sich im aktiven Zentrum von Oxidoreduktasen. Indem sie einen Redoxreaktionszyklus durchlaufen, vermitteln sie den Thiol-Disulfid-Austausch mit anderen Proteinen und deren Strukturumwandlung als Folge. So werden bei der Oxidation zwei Thiolgruppen an einem Protein zu einem Disulfid bzw. einer Disulfidbrücke zusammengeführt, während die katalytischen Disulfidbrücken selbst zu zwei Thiolgruppen reduziert werden; bei der Reduktion der Disulfidbrücken verläuft es umgekehrt. Dagegen kontrollieren die allosterischen Disulfidbrücken die Funktion der Proteine auf nicht-enzymatische Weise. Mit ihrer Reduktion bzw. Oxidation wird nicht die Umwandlung anderer Proteine katalysiert, sondern die Konformationsänderung der Proteine getriggert, in denen sich die Disulfidbrücken selbst befinden; aber auch hier kommt es durch die Konformationsänderung zu einer Funktionsänderung des entsprechenden Proteins (Chen und Hogg, 2006).

Da Thiole und Disulfidbrücken also allgemein in Proteinen vorkommen, wäre es durchaus möglich, dass Eap auch mit solchen interagieren könnte, die sich auf thrombozytären Membranproteinen oder -rezeptoren befinden. Eine daraus möglicherweise folgende Konformationsänderung an diesen könnte eventuell eine Aktivierung der Plättchen auslösen. So wäre es durchaus denkbar, dass DTNB und pCMPS eine mögliche Interaktion von Eap mit den freien Thiolen auf den Membranproteinen oder -rezeptoren blockieren.

Eine mögliche Konformationsänderung eines solchen Rezeptors durch die Eap-Thiol-Interaktion, eine möglicherweise darauffolgende Signaltransduktion ins Zellplasma und die Induktion der intrazellulären Vorgänge, wie der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg, der Formwandel, die Granulasekretion und das „inside-out-signaling“ mit zum Beispiel der Aktivierung des

GPIIb/IIIa-Rezeptors und der Fibrinogenbindung würden durch die Thiolblocker folglich ebenfalls unterbunden.

Es wurden noch weitere thiolreaktive Substanzen daraufhin getestet, ob sie einen Einfluss auf die durch Eap hervorgerufene Plättchenaktivierung haben.

Die Abbildung III.18 zeigt, dass GSH keinen Effekt auf die Bindung von Fibrinogen-FITC hatte, die durch Eap induziert wurde.

GSH ist die am häufigsten natürlich vorkommende thiolhaltige Substanz im Körper und wird in seiner reduzierten Form (GSH) aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin synthetisiert. Seine Funktion besteht physiologischerweise darin, den Körper vor oxidativem Stress zu schützen, indem es Radikale, die bei vielen Reaktionen im Körper entstehen, durch Reduktion unschädlich macht. Selbst wird es dabei zu einem Glutathion-Disulfid oxidiert und dann durch die Glutathion-Reduktase wieder in die reduzierte Form überführt (Inoue et al., 1987). Deshalb spielt GSH auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Disulfidbrücken, welche in einem oxidativen Milieu zu Thiolgruppen oxidiert würden.

Von Pacchiarini et al. (1996) wurde berichtet, dass die reduzierte Form von GSH einen regulierenden Effekt auf die Plättchenreaktivität haben soll. GSH ist selbst in hohen Konzentrationen in Thrombozyten vorhanden (3-5 mM).

Mit der Aktivierung der Plättchen wird das GSH aus diesen freigesetzt und verhindert eine übermäßige Reaktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species), da es als Substrat der Glutathion-Peroxidase fungiert und auch selbst antioxidative Eigenschaften besitzt.

Verschiedene Zellen in der Zirkulation und in der Gefäßwand können ROS (O_2^- , H_2O_2 und OH^\cdot) synthetisieren, wie die Endothelzellen, die glatten Muskelzellen und Fibroblasten, Monozyten und neutrophile Granulozyten. Unter anderem wird durch die enzymatische Aktivität der Superoxiddismutase, der Katalase und der Glutathion-Peroxidase in Kooperation mit GSH, und durch das Stickstoffmonoxid deren Aktivität in der Zirkulation reguliert. In erhöhter Konzentration trägt O_2^- dazu bei, dass die Reaktionsschwelle der Plättchen gesenkt wird, so dass diese leichter durch Thrombin, Kollagen oder ADP aktiviert werden können, vielleicht sogar spontan aggregieren (Krötz et al., 2004).

Bei der Aktivierung der Thrombozyten durch primäre Agonisten, wie Thrombin, setzen auch die Plättchen selbst reaktive Sauerstoffspezies zusammen mit anderen sekundären Agonisten frei (TxA_2 , ADP z.B.), so dass der Aktivierungsvorgang verstärkt wird (Wachowicz et al., 2002). Die verantwortlichen Enzyme für die Synthese in den Thrombozyten sind unter anderem die NAD(P)H-Oxidase, die Cyclooxygenase-1, Xanthine Oxidase und die mitochondriale Atmungskette; zudem trägt auch der Arachidonsäuremetabolismus zur ROS-Produktion bei (Krötz et al., 2004).

Diese durch ROS vermittelte Verstärkung der Plättchenaktivierung kann durch GSH gehemmt werden, mit unter anderem verminderter Aggregation als Folge. Zudem erwähnen Pacchiarini et al. (1996) auch, dass die Stärke des Agonisten eine Rolle spielt, da die hemmende Wirkung von GSH bei stärkeren Agonisten geringer ausfällt.

Da aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervorgeht, dass Eap verglichen mit ADP ein stärkerer Agonist ist, könnte dies ein Grund für den fehlenden Einfluss von GSH auf die Eap-induzierte Fibrinogenbindung an Plättchen sein (vgl. Abb. III.4a) - e)). Auch die durch Kollagen induzierte Plättchenaggregation konnte bei Pacchiarini et al. (1996) nicht durch GSH gehemmt werden. Andererseits wäre denkbar, dass Eap aufgrund eines anderen Aktivierungsmechanismus gar nicht die Freisetzung von ROS induziert. Somit hätte GSH auch keinen Angriffspunkt, um auf die durch Eap induzierte Thrombozytenaktivierung bzw. die sekundäre Verstärkung vermindernd einzuwirken.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivierung der Thrombozyten durch Eap getestet. Gliotoxin ist ein Gift, das als Stoffwechselprodukt von einigen *Aspergillus*- und *Penicillium*-Spezies, von *Gliocladium*, *Thermoascus* und *Candida* spp. produziert wird. Es gehört zur Klasse der Epipolythiodioxopiperazine, die charakteristischerweise eine Disulfidbrücke in ihrem Piperazindionring besitzen, welche für die biologische Aktivität des Gliotoxins essenziell ist. Der Pilzmetabolit besitzt antibakterielle und antivirale Eigenschaften. Eine chemotherapeutische Nutzung kommt jedoch aufgrund seiner starken Zytotoxizität nicht in Frage. Die Zytotoxizität wirkt sich vor allem auf das hämatopoietische System aus, unter anderem mit Hemmung der T- und B-Zellproliferation (Waring und Beaver, 1996).

Green et al. (2000) beschrieben, dass Gliotoxin die freien Thiolgruppen bzw. die Cysteinreste am Ryanodinrezeptor der Skelettmuskulatur oxidiert, wodurch die rezeptorgekoppelten Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden und vermehrt Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma freigesetzt wird.

Da diese Bildung gemischter Disulfide mit einer Reihe von Wirtsproteinen beschrieben ist, könnte Gliotoxin die Eap-induzierte Fibrinogenbindung durch eine Bindung an freie Thiole auf der Thrombozytenoberfläche hemmen. Außerdem wurde von Sakai und Watanuki 1987 berichtet, dass der Kulturüberstand von *Aspergillus fumigatus* eine stark hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaktivität hat, wobei sich Gliotoxin als die wirksame Komponente herausstellte. Es konnte gezeigt werden, dass es die Aggregation der Plättchen hemmt, die durch ADP, Kollagen oder Arachidonsäure induziert wurde. Auch hier wurde postuliert, dass Gliotoxin mit Hilfe seiner Disulfidbrücke mit Thiolgruppen auf den Thrombozyten interagiert, die dort sehr zahlreich vorhanden sind. Außerdem wurde gezeigt, dass Gliotoxin über die

Interaktion mit den oberflächlichen Thiolgruppen als Membranstabilisator wirkt, so dass eine Aggregation verhindert wird (Sakai und Watanuki, 1987).

Gliotoxin konnte, wie in der Abbildung III.19 deutlich wird, die Aktivierung der Thrombozyten durch Eap nicht vollständig hemmen. Über die möglichen Gründe bleibt nur zu spekulieren. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass Gliotoxin auch mit den Thiolgruppen der Plasmaproteine interagiert. Disulfidbrücken sind zum Beispiel in den Plasmaproteinen TSP-1, vWF, Plasmin (Hogg, P. J. 2003), in Fibrinogen (Zhang und Redman, 1994) und in Fibronectin (Wagner u. Hynes, 1979) vorhanden. Auf diese Weise wäre es möglich, dass die Konzentration an reduziertem Gliotoxin verringert ist, und so die hemmende Wirkung des Gliotoxin gemindert würde.

Die Tatsache, dass die Plasmaproteine ebenfalls Disulfidbrücken enthalten, könnte auch eine mögliche Ursache dafür sein, dass die Aktivierung der Thrombozyten im Plasma geringer ausfiel als bei gelfiltrierten Plättchen (Abb. III.3).

Mit PAO konnte dagegen in den hier durchgeführten Versuchen (Abb. III.20) eine sehr gute Hemmung der durch Eap induzierten Fibrinogenbindung erzielt werden.

Diese Substanz ist ein Tyrosin-Phosphorylierungshemmer und die kovalente Bindung von PAO an vicinale Cysteinylreste, die sich im katalytischen Zentrum der Phospho-Tyrosinphosphatasen befinden, führt zur Inaktivierung dieses Enzyms. PAO bindet auch an andere Phosphatasen, in deren Struktur sich vicinale Thiole befinden. PAO induziert relativ willkürlich Querverbindungen zwischen den vicinalen Thiolen bzw. Cysteinylresten von verschiedenen Proteinen, so dass es eher als sulfhydrylspezifisches und weniger als receptorspezifisches Reagenz anzusehen ist (Gerhard et al., 2003).

Der hemmende Einfluss von PAO auf die Plättchenstimulation durch Eap könnte also dadurch bedingt sein, dass PAO an die Thiolgruppen auf den betreffenden Rezeptor- oder Membranproteinen bindet und somit die für eine Plättchenaktivierung vermutlich notwendige Interaktion zwischen Eap und den freien, vicinalen Thiolgruppen blockiert. Auch hier hatte die Konzentration der thiolreaktiven Substanz einen deutlich sichtbaren Einfluss; je höher die Konzentration, desto mehr vicinale Thiole könnten durch PAO kompetitiv zu Eap gebunden werden, so dass die Aktivierung der Thrombozyten konzentrationsabhängig stärker gehemmt würde.

Auch dieses Ergebnis und die genannte Literatur bekräftigen die Annahme, dass Eap die Thrombozyten über eine Interaktion mit freien, vicinalen Thiolgruppen von Membran- oder Rezeptorproteinen aktivieren könnte.

Mit der Beschreibung der Funktion von verschiedenen Disulfidbrücken in Proteinen wurde erwähnt, dass die Disulfidbrücken einen Redoxreaktionszyklus durchlaufen. Der Redoxstatus der Disulfidbrücken bzw. die Umwandlung von einem Isomer zum anderen, wird durch die

auf verschiedenen Zellen exprimierte Protein Disulfid Isomerase (PDI) kontrolliert, das ist auch auf den Thrombozyten der Fall (Lahav et al., 2000).

Der durch die PDI vermittelte Disulfidaustausch - induziert durch den Ligandenkontakt mit dem Rezeptor - überführt den Rezeptor aus einem inaktiven in einen aktiven Status mit entsprechender Affinitätsverstärkung für den Liganden (Ahamed et al., 2006). Lahav et al. belegten die Abhängigkeit vom Disulfidaustausch bei der GPIIb/IIIa- und GPIa/IIa-vermittelten Adhäsion bzw. Aggregation, indem sie den membran-impermeablen PDI-Hemmer Bacitracin einsetzten. Bacitracin konnte ebenfalls die Aggregation der Thrombozyten hemmen, wenn sie zum Beispiel durch ADP, Kollagen oder Thrombin aktiviert wurden. Dies macht deutlich, dass die PDI auch den Disulfidaustausch am GPIIb/IIIa-Rezeptor vermittelt. Diese PDI-Aktivität auf Zelloberflächen wird im Allgemeinen beschrieben, nicht nur spezifisch für diesen Rezeptor, sondern auch für andere (Lahav et al., 2002).

In Abb. III.21 wird deutlich, dass die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten auch durch Bacitracin inhibiert werden konnte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Eap-induzierte Fibrinogenbindung an Plättchen nicht nur auf die Interaktion mit freien und vicinalen Thiolgruppen angewiesen ist, sondern genauso wie die von Lahav et al. getesteten Agonisten, auf die katalytische Aktivität der PDI. Diese vermittelt den Disulfidaustausch an dem betreffenden Rezeptorprotein, wodurch die Bindung des Liganden am Rezeptor stabilisiert wird, wie zum Beispiel die Bindung von Fibrinogen am GPIIb/IIIa-Rezeptor der Plättchen (Lahav et al., 2002). Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Eap-induzierte Plättchenaktivierung oder nur die Fibrinogenbindung durch Bacitracin blockiert werden kann, müsste der Einfluss des PDI-Inhibitors auf andere Aktivierungsmarker wie zum Beispiel CD62P-Expression untersucht werden.

Bisher konnte kein Rezeptor definiert werden, mit dem Eap möglicherweise interagiert. Es liegt allerdings nahe, zu recherchieren, ob dieses Staphylokokken-Adhäsins möglicherweise ähnliche Mechanismen der Bindung und Plättchenaktivierung aufweist wie die anderen Adhäsionsproteine von *S. aureus*. Sowohl die SERAMs als auch die MSCRAMMs besitzen die Eigenschaft, an Wirtsproteine zu binden und vermitteln so die Adhäsion von *S. aureus* an diese oder an die Wirtszellen. Die zu den MSCRAMMs gehörenden FnBPs vermitteln die Bindung von *S. aureus* an Fibronectin; spezifisch an Fibrinogen binden das FnBPA und die ClfA und B (Chavakis et al., 2005). Mit Hilfe dieser MSCRAMMs ist es *S. aureus* möglich, an diese Plasmaproteine zu binden und sie als Brücke für die Bindung an den Thrombozyten zu nutzen. Für eine Aktivierung der Thrombozyten sind jedoch zwei Mechanismen erforderlich: Außer der Ligandenbindung an GPIIb/IIIa sind zusätzlich spezifische IgGs notwendig, welche

die FnBPs bzw. die Clfs erkennen und die Verbindung zwischen diesen und dem Plättchen-FcγRIIA herstellen.

In einer tabellarischen Aufstellung verschiedener *S. aureus*- und Streptokokken-Stämme wird deutlich, dass dieser Mechanismus der Brückenbildung durch Fibrinogen und durch IgG eine weit verbreitete Taktik der Bakterien ist, um an Plättchen zu binden und diese zu aktivieren (Fitzgerald et al., 2006).

Auf diese Weise würde Eap möglicherweise nicht nur die Plättchen aktivieren, sondern auch *S. aureus* in deren direkte Nähe bringen, bzw. die Adhäsion von *S. aureus* an Plättchen vermitteln, indem Eap gleichzeitig an *S. aureus* - über eine neutrale Phosphatase und andere Strukturen - an dessen Zelloberfläche und an den Plättchen bindet (Flock und Flock, 2001).

Um zu überprüfen, ob die Eap-induzierte Aktivierung der Plättchen ebenfalls über den FcγRIIA vermittelt wird, müsste man die Thrombozyten mit einem monoklonalen Antikörper inkubieren, der spezifisch gegen diesen Rezeptor gerichtet ist; dies ist der Antikörper anti-FcγRII mAk IV.3 (Gibbins et al., 1996). Wenn die Eap-induzierte Stimulation der Thrombozyten durch diesen Antikörper gehemmt werden kann, wäre bewiesen, dass der FcγRIIA bei der Eap-induzierten Aktivierung eine wesentliche Rolle spielt. Dieses Ergebnis würde allerdings noch nicht ausschließen, dass auch andere Mechanismen beteiligt sein könnten.

Zudem erforschten Bowles Goldsmith et al. (1997) an Maus-FcγRIIA die Bindungsregion, an welche die Fc-Region des IgG bindet. Sie fanden heraus, dass zwei der Fc-Rezeptorregionen der IgG-Domäne eine starke Neigung besitzen, Immunkomplexe zu binden. Diese Regionen sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Ob diese für eine mögliche Interaktion mit Eap auf dem FcγRIIA der Plättchen zur Verfügung steht, könnte ein weiteres Objekt zukünftiger Forschung sein.

Andererseits wäre es auch möglich, dass die Plättchenaktivierung durch Eap, wie auch bei den MSCRAMMs, in Abhängigkeit von IgG stattfindet. Die Bindung von IgG an FcγRIIA auf Plättchen ist bewiesen (Fitzgerald et al., 2005), ebenso, dass Eap ein immunstimulierendes Agens ist, welches die Antikörperbildung induziert (Haggar et al., 2003).

Die Hypothese, dass Eap über den FcγRIIA die Aktivierung der Plättchen induziert, würde auch der vorher angestellten Vermutung, dass Eap die Thrombozyten über einen thrombin-unabhängigen Mechanismus aktiviert, nicht widersprechen.

Bisher gibt es nur Spekulationen über mögliche Mechanismen, beteiligte Rezeptoren und Co-Faktoren, die zum einen auf den Ergebnissen dieser Arbeit beruhen und zum anderen in Anlehnung an die Erkenntnisse anderer Forscher postuliert wurden, zum Beispiel, dass MSCRAMMs, die ebenfalls zu den Adhäsionsproteinen gehören, auch die Eigenschaft

besitzen, an Thrombozyten zu binden und diese zu aktivieren, und dass diese Taktik der Interaktion im Reich der Bakterien sehr weit verbreitet ist (Fitzgerald et al., 2006).

Welche Faktoren und Rezeptoren tatsächlich bei der Eap-induzierten Thrombozytenaktivierung beteiligt sind, wie möglicherweise Wirts- bzw. Plasmaproteine, Immunglobuline oder auch Fc γ als potentieller Rezeptor, ist das zukünftige Forschungsziel unserer Arbeitsgruppe bezüglich des Staphylokokken-Adhäsins Eap.

IV.2 Vergleich der Agonist-induzierten Aktivierung von Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger

Um zu untersuchen, ob und wie Eap die Funktion der Thrombozyten verschiedener Tierarten beeinflusst, wurden im Anschluss noch Versuche mit Blut von Pferden, Hunden, Rindern, Schafen, Schweinen und Ratten durchgeführt; zusätzlich wurden hier die Ergebnisse dargestellt, die sich bei Pferden, Hunden, Rindern und Ratten infolge einer Inkubation der Thrombozyten mit ADP, Thrombin und Kollagen ergaben.

Gleich am Anfang dieses Kapitels soll klar betont werden, dass ausschließlich das Blut von Individuen verwendet wurde, denen im Rahmen von labordiagnostischen Untersuchungen oder im Rahmen von Versuchsvorhaben anderer Forschungsgruppen Blut abgenommen werden musste. Diesen Tieren wurde dann lediglich 10 ml Citratblut zusätzlich abgenommen. Durch die Blutabnahme für diese Versuche sind den Tieren also keine zusätzlichen oder unnötigen Schmerzen, Leiden oder Schäden entstanden.

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Eap fiel bei den verschiedenen Tierarten sehr unterschiedlich aus (Abb. III.22 und Abb. III.23), einerseits möglicherweise durch tierspezifisch unterschiedliche Reaktivitäten andererseits auch durch mögliche Artefakte.

Am reaktivsten waren die Thrombozyten der Ratte, die ab einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Eap durch die Bindung von Fibrinogen-FITC Signalwerte von 2000 bis 3000 relativen Einheiten erreichten, gefolgt von den Thrombozyten des Menschen. Die Thrombozyten der Pferde erreichten durch die Bindung von Fibrinogen-FITC noch ca. 1000 relative Einheiten. Dafür nahm die Fibrinogenbindung bei Mensch und Pferd bereits ab 5 $\mu\text{g/ml}$ Eap zu. Die Rinderthrombozyten erreichten bei maximaler Konzentration an Eap (20 $\mu\text{g/ml}$) noch Werte von ca. 600 relativen Einheiten, während die Plättchen von Schafen, Hunden und Schweinen das Fibrinogen-FITC nur in dem Maße banden, dass die Fluoreszenz kaum über den Basiswert hinausreichte, der bei 0 $\mu\text{g/ml}$ Eap gemessen wurde.

Allgemein besitzen die Thrombozyten der genannten Spezies ähnliche metabolische Prozesse und Mechanismen der Aktivierung, jedoch kommt es vermutlich durch unterschiedliche Ausprägungen dieser Prozesse und Signalwege zu tierartspezifischen Reaktivitäten der Thrombozyten auf die verschiedenen Agonisten. Die Plättchen von Ruminanten sind zum Beispiel sehr träge in ihrer Reaktivität, während die Plättchen von Fleischfressern und Pferden sehr reaktiv sind. Ein tierartlich großer Unterschied besteht zum Beispiel in der TxA_2 -Produktion: Bei Menschen und Hunden ist der Arachidonsäuremetabolismus stark ausgeprägt, bei Pferden eher mittelmäßig. Die Thrombozyten von Wiederkäuern und Schweinen dagegen synthetisieren sehr wenig TxA_2 (Meyers et al., 1980).

Bezüglich Eap als Agonist für Thrombozyten gibt es bisher noch keine vergleichbaren Ergebnisse. Dies ist bisher die erste wissenschaftliche Arbeit, in der der Einfluss von Eap zunächst auf die Funktionen humaner Thrombozyten und dann auch auf die Fibrinogen-FITC-Bindung an Thrombozyten verschiedener Tierarten untersucht wurde. So ist es allenfalls möglich, über die möglichen Ursachen der unterschiedlichen thrombozytären Reaktivität der getesteten Tierarten gegenüber diesem Protein zu spekulieren.

Ginge man einerseits weiter von der in IV.1.7 genannten Möglichkeit aus, dass Eap, ähnlich wie die FnBPs und Clfs, die Thrombozyten in Abhängigkeit von einem IgG aktiviert, könnte man eventuell vermuten, dass es bei häufigerem Kontakt mit *S. aureus* bzw. mit Eap zu einer verstärkten Antikörperbildung kommt, was dann bei einer Sepsis infolge einer Infektion mit *S. aureus* durch die Kombination des Eaps mit den gebildeten Antikörpern zu einer Stimulation der Plättchen führen könnte. Und je ausgeprägter die Antikörperbildung vorab ausfiel, desto stärker würde die Plättchenaktivierung im Nachhinein ausfallen.

So reagieren Ratten möglicherweise aufgrund eines häufigeren und intensiveren Antigenkontaktes mit einer stärkeren Antikörperbildung und infolgedessen auch mit verstärkter Thrombozytenaktivierung durch Eap. Möglicherweise haben Ratten aber auch nur mehr Fc-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Denn man sollte annehmen, dass der immunstimulierende Kontakt mit *S. aureus* bei den anderen Säugern auch nicht soviel seltener ist. Hier werden also wahrscheinlich noch andere Kriterien eine Rolle spielen. Das soll bei den einzelnen Tierarten aber noch weiter erörtert werden.

Unklar ist allerdings, warum die Rattenplättchen bis 10 $\mu\text{g/ml}$ Eap einen kaum messbaren Anstieg in der Fibrinogenbindung zeigten und die Fibrinogenbindung ab einer Eap-Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ so stark ausfiel. Da die Tiere mit Isofluran narkotisiert waren, hatte möglicherweise auch das Narkosemittel einen hemmenden Einfluss auf die Reaktivität der Thrombozyten. Die Meinungen über den Einfluss von Isofluran auf die Plättchenfunktion sind kontrovers; einige Autoren, wie zum Beispiel Miyashita und Kuro (1998), beschreiben

einen hemmenden Einfluss, andere wiederum behaupten, der Einfluss von Isofluran wäre zu vernachlässigen (u. a. De Rossi et al., 2001).

Ohne Narkose hätte man allerdings auch kein Blut bekommen können, welches für diese Untersuchungen geeignet gewesen wäre, da die Plättchen durch die Aufregung der nicht narkotisierten Tiere schon voraktiviert gewesen wären. Schlussendlich spielte bei der Wahl der Entnahmemethode natürlich auch der tierschutzrechtliche Aspekt eine wichtige Rolle, und es wurde immer die Methode gewählt, die das jeweilige Tier am geringsten und vor allem nicht zusätzlich beeinträchtigte.

Andererseits wird die Reaktivität der Rattenthrombozyten gegenüber verschiedenen Agonisten generell als sehr unterschiedlich beschrieben; infolge einer ADP-Inkubation aggregieren sie sehr gut, während sie auf Kollagen oder Thrombin kaum reagieren (Takahashi, 1999). Diese Verhältnisse wurden mit den Versuchsergebnissen dieser Arbeit bestätigt (Abb. III.24a) - e)). Hier erreichte die maximale Fibrinogenbindung induziert durch (c) ADP zwar auch nicht viel höhere Werte als durch (b) Thrombin oder (d) Kollagen, aber bei ADP war eine maximale Fibrinogenbindung schon bei geringen Konzentrationen zu beobachten, während die Kurven von Kollagen und Thrombin nur langsam mit zunehmender Agonisten-Konzentration anstiegen; zudem könnte sich auch hier der hemmende Effekt des Narkosemittels bemerkbar machen. Im Gegensatz zu den genannten Agonisten konnte Eap eine bis zu 30-fach stärkere Fibrinogen-FITC-Bindung induzieren. Auch dies lässt eine Vermutung zu, dass Eap die Plättchen über einen Mechanismus aktiviert, der von dem Narkosemittel möglicherweise unbeeinflusst bleibt.

Die Thrombozyten der Pferde reagierten mit einer guten Fibrinogenbindung auf die Agonisten Thrombin (b), ADP (c) und Kollagen (d) (Abb. III.25a) - e)). Auch hier konnte Eap (a) eine 10-fach stärkere Bindung von Fibrinogen-FITC an den Plättchen hervorrufen im Gegensatz zu den anderen Agonisten; auch hier gilt die Vermutung, dass ein anderer oder zusätzlicher Aktivierungsmechanismus eine mögliche Ursache sein könnte.

Allgemein scheinen die equinen Plättchen *in vivo* hochreaktiv zu sein, so dass Pferde sehr leicht thrombo-embolische Komplikationen entwickeln, wie es bei einer Kolik möglich ist (Weiss et al., 1999).

Auch im Rahmen einer Endotoxämie besitzen Pferde eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten mit folgender mikrovaskulärer Thrombose, die zur Pathogenese einer Hufrehe beiträgt (Jarvis und Evans, 1996; Weiss et al., 1996).

Diese hohe Reaktivität könnte auch eine Ursache dafür sein, dass die Pferdethrombozyten so stark auf Eap reagierten. Genauso wie Endotoxine könnte Eap durch Antikörper opsoniert werden, die vorab durch eine Immunstimulation gebildet wurden und in Kombination mit diesen die Plättchenaktivierung auslösen.

Die Thrombozyten von Rindern und Schafen zeigten nur eine geringe Zunahme der Bindung von Fibrinogen-FITC infolge der Inkubation mit (b) Thrombin, (c) ADP und (d) Kollagen; dagegen fiel die (a) Eap-induzierte Bindung des Fibrinogens deutlich höher aus (Abb. III.26a) - e), Abb. III.22 und Abb. III.23). Allgemein waren die Plättchen von Wiederkäuern weniger reaktiv gegenüber Thrombin oder ADP. Das Fehlen des „open canalicular systems“ (OCS), welches als Membranreservoir zur Oberflächenvergrößerung und Ausbreitung der Plättchenoberfläche beiträgt, ist einer der Hauptgründe dafür, dass die bovinen Plättchen sich nicht ausbreiten können und eine reduzierte Adhäsivität besitzen (Cheryk et al., 1997). Zudem findet eine Reorganisation des Cytoskeletts infolge einer Aktivierung der Thrombozyten in sehr viel geringerem Ausmaß statt als zum Beispiel beim Menschen, was ebenfalls zu der verminderten Ausbreitung beiträgt (Grouse et al., 1990).

Die Reaktion der Wiederkäuerplättchen auf Eap fiel geringer aus als die Reaktion der Pferde-, Menschen- oder Rattenthrombozyten. Dennoch war diese stärker als die Reaktion auf Thrombin, ADP oder Kollagen. Dies könnte ebenfalls damit zusammenhängen, dass Eap die Plättchen über einen anderen oder auch zusätzlichen Mechanismus aktiviert.

Cheryk et al. (1997) sieht die zuvor benannte geringe Reaktivität als Grund für die bei Wiederkäuern selten vorkommenden thrombo-embolischen Komplikationen. Wenn diese doch mal auftreten, passiert das grundsätzlich im Zusammenhang mit einer Entzündung oder erblich bedingt (Cheryk et al., 1997).

Die Thrombozyten von Hunden und Schweinen zeigten keine nennenswerte Zunahme in der Fibrinogenbindung infolge der Inkubation mit Eap (Abb. III.22 und III.27a)). Möglicherweise hatte beim Hund auch wieder das Narkosemittel einen hemmenden Einfluss auf die Reaktivität.

Die Reaktivität von Hundethrombozyten wird eigentlich als recht gut beschrieben, und ihre Reaktion auf ADP und Kollagen ist ähnlich der menschlicher Thrombozyten (Weiss, 1999). In den Ergebnissen dieser Arbeit war die Fibrinogenbindung an den Hundethrombozyten, induziert durch (c) ADP, (b) Thrombin und (a) Eap, nicht so stark ausgeprägt wie beim Menschen (vgl. Abb. III.22, III.27a) - e) und Abb. III.4a) - e)). Allerdings waren die Hunde mit Ketamin und Xylazin für weitergehende Untersuchungen und Operationen narkotisiert. Ketamin ist dafür bekannt, dass es die Aggregation der Thrombozyten hemmt, indem es die an den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren induzierte GTPase-Aktivität und somit die PLC β -Aktivierung und IP $_3$ -Synthese unterdrückt, die einen intrazellulären Ca $^{2+}$ -Anstieg zur Folge hätte. Auch die Kollagen-induzierte Aggregation konnte durch Ketamin gehemmt werden (Nakagawa et al., 2002). Diese Studie wurde allerdings mit humanen Thrombozyten durchgeführt; möglicherweise gibt es bei den intrazellulären Prozessen aber noch Unterschiede zu den verschiedenen Tierarten, da die Inkubation mit Kollagen in den hier dargestellten Ergebnissen (Abb. III.27d) + e)) eine recht gute Fibrinogenbindung induzierte.

Andererseits wäre diese vielleicht auch ohne den Einfluss des Ketamins noch stärker ausgefallen.

Die Thrombozytenreaktivität des Schweins fiel eher mäßig aus. Auf die Inkubation mit Eap erfolgte gar keine Reaktion (Abb. III.22 und III.23). Meyers et al. (1980) beschrieben, dass die Thrombozyten von Schweinen unter Einwirkung von Arachidonsäure nicht aggregieren und infolge einer Thrombineinwirkung kein TxA_2 bilden.

Allerdings kommt hinzu, dass das Blut, welches für diese Arbeit getestet wurde, vom Schlachthof bezogen wurde. Das heißt, die Tiere wurden einige Sekunden vor dem Entbluten elektrisch betäubt, so dass ein epileptiformer Zustand induziert wurde, bevor der Ausblutungsvorgang stattfand; möglicherweise könnte dies durchaus auch einen Einfluss auf die thrombozytäre Reaktivität gehabt haben. Außerdem gab es keinen näher gelegenen Schlachthof als Hamm, von dem das Blut von Schweinen hätte bezogen werden können, so dass die Thrombozyten durch den Transport (ca. 1 Stunde) von Hamm zum Labor in Münster möglicherweise auch schon zu alt gewesen sind, als dass man noch eine Aktivierung hätte induzieren können.

Auch die Thrombozyten von Katzen sollten getestet werden, ob sie auf das Staphylokokkenprotein reagieren. Wie allerdings in Kapitel 1.1 und 1.2 beschrieben sind die Thrombozyten der Katzen hochreaktiv und neigen in Citrat-antikoaguliertem Blut zu Spontanaggregationen. Zudem haben sich die Katzen aufgrund der Blutentnahme sehr aufgeregt, so dass die Thrombozyten schon voraktiviert und damit unbrauchbar für diese Versuche waren. Man hätte natürlich Blut von narkotisierten Katzen nehmen können, allerdings wäre dann auch wieder der negative Ketamin-Effekt vorhanden gewesen (s. o.). Die Ergebnisse der Katzenplättchen wurden hier also nicht mit in die Auswertung genommen.

Was die Reaktivität der Tierthrombozyten betrifft, konnten einige Punkte noch nicht geklärt werden. Dies bedarf daher weiterer und ausführlicher Untersuchungen. Einschränkungen ergaben sich hier aus den zum Teil schwierigen Umständen, die Thrombozyten der verschiedenen Tierarten zu bekommen. Denn um dem tierschutzrechtlichen Aspekt Rechnung zu tragen, wurde nur das Blut von Tieren verwendet, denen zu anderen Zwecken sowieso Blut abgenommen werden musste, bzw. ein Venenkatheter gelegt wurde.

Zudem sind die Erkenntnisse in der Hämostasieforschung der Humanmedizin ausgereifter, so dass es sinnvoll erschien, die Versuche mit einer Substanz von unbekannter Wirkung zunächst an humanen Plättchen durchzuführen und im Nachhinein die Wirkung des Eaps ebenfalls an den Plättchen der verschiedenen Tierarten zu überprüfen und die erlangten Ergebnisse aus den Versuchen mit den humanen Plättchen mit denen der Tierthrombozyten zu vergleichen.

Nichts desto trotz konnte gezeigt werden, dass neben den Thrombozyten des Menschen auch die Plättchen anderer Säuger durch Eap zur Fibrinogenbindung angeregt werden können. Ob auch andere Aktivierungsmarker durch Eap beeinflusst werden, und ob die Aktivierung ähnlich wie beim Menschen durch Heparine und Thiolblocker zu hemmen ist, ist in weiterführenden Studien zu klären.

V. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Eap Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger aktiviert. Dies wurde durch spezifische Bindungsproteine deutlich gemacht, die an Rezeptoren oder Strukturen der Plättchen binden, die charakteristischerweise infolge einer Aktivierung an deren Oberfläche exprimiert werden.

Bezüglich des genauen Mechanismus, über den Eap die Thrombozyten aktiviert, und was sinnvolle Erkenntnisse für die klinische Anwendung betrifft, ergeben sich aus den vorliegenden Versuchsergebnissen neue Fragen und Anhaltspunkte für zukünftige Forschungsvorhaben.

Da Eap die Adhäsion und Invasion von *S. aureus* in Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen vermittelt, wäre es interessant zu überprüfen, ob das auch für Thrombozyten zutrifft. Dies wäre sowohl durchflusszytometrisch als auch durch Fluoreszenzmikroskopie zu erfassen.

Wie bereits beschrieben, beeinflusst Eap die innate Immunabwehr scheinbar auf zweierlei Weise, einerseits durch Blockade der Leukozytentransmigration, und andererseits stimuliert es das Immunsystem, indem mit der Eap-induzierten Plättchenaktivierung sowohl CD40L als auch CD62P auf der Plättchenoberfläche exprimiert wird. Normalerweise erfolgt daraufhin eine Assoziatbildung von Thrombozyten und Leukozyten über die CD62P-PSGL-1-Verbindung und über die CD40L-CD40-Verbindung. Ob das auch bei der Eap-induzierten Plättchenaktivierung erfolgt, könnte mit einem Versuch im Vollblut festgestellt werden, wo Eap durch die Aktivierung der Plättchen möglicherweise eine Assoziatbildung von Plättchen und Leukozyten induziert.

Ebenfalls könnte mit Antikörpern gegen CD40L im Vollblut überprüft werden, ob durch die CD40L-Expression auf Eap-behandelten Plättchen die Th₂-Zellproliferation stimuliert wird, bzw. durch die Antikörper gehemmt werden kann.

Mit dem Wissen, dass die MSCRAMMs (FnBP, Clf) von *S. aureus* Thrombozyten über den FcγRIIA-Rezeptor aktivieren, und dass die Aktivierung der Plättchen über diesen Rezeptor eine weit verbreitete Taktik im Reich der Bakterien ist, liegt es nahe, zu testen, ob das auch für Eap zutrifft. Kann ein spezifischer Antikörper gegen FcγRIIA die Aktivierung der Plättchen verhindern, so wäre bewiesen, dass auch Eap die Plättchen über diesen Rezeptor aktiviert. Je nachdem, wie stark die Hemmung ausfallen würde, könnte man daraus auch schließen, ob die Aktivierung der Plättchen durch Eap vor allem von diesem Rezeptor abhängt, oder ob noch andere Mechanismen eine Rolle spielen.

Aus den Versuchen mit den Thiolblockern pCMPS und DTNB geht hervor, dass die Eap-induzierte Aktivierung der Thrombozyten von oberflächlich frei zugänglichen Thiolgruppen

abhängig ist. Daraus folgt die Annahme, dass Eap möglicherweise mit Sulfatgruppen interagiert.

Es wäre somit auch noch interessant, zu überprüfen, ob Eap tatsächlich, wie bereits angenommen, über die Interaktion mit den Sulfatgruppen des Heparins mit diesem Komplexe bildet. Dies könnte man zum Beispiel mit dem ELISA-Prinzip testen, indem man über eine Schicht von fixierten Heparinmolekülen eine Lösung mit Eap-Molekülen laufen lässt, in der die Eap-Moleküle mit einem Substrat gekoppelt sind, welches durch ein Enzym zu einem Farbstoff umgesetzt wird. Um herauszufinden, ob Eap spezifisch an die Sulfatgruppen des Heparins bindet, könnte man bei gleichem Versuchsaufbau vor der Eap-Lösung noch eine Lösung mit einem Thiolblocker wie pCMPS oder DTNB über die Heparinschicht laufen lassen. Bindet Eap dann nicht mehr, wäre damit die spezifische Bindung an die Sulfatgruppen des Heparins bewiesen.

Sollte dies tatsächlich so der Fall sein, könnte man mit gleichem Versuchsaufbau noch weitere Substanzen, die Sulfatgruppen enthalten, auf ihre Komplexbildung mit Eap testen und untersuchen, welche Wirkung sie auf die Eap-induzierten Effekte hätten. Natürlich wäre weiterhin interessant, welche therapeutische Wirkung diese *in vitro* getesteten Substanzen dann *in vivo* bei sepsisinduzierten Komplikationen entfalten, zum Beispiel bei entzündlichen und hämostatischen Folgereaktionen, sofern man sie hinsichtlich einer möglichen Toxizität einsetzen kann.

Da nur das niedermolekulare und unfraktionierte Heparin unter den Gerinnungshemmern eine vollständige Hemmung verursachte, nicht aber die anderen Thrombininhibitoren wie Melagatran oder Hirudin, kann man davon ausgehen, dass Eap die Plättchen unabhängig von Thrombin aktiviert. Dennoch wurde nachgewiesen, dass Eap eine prokoagulante Plättchenoberfläche induziert, so dass davon auszugehen ist, dass auf dieser sekundär Thrombin gebildet wird. Ein weiterer möglicher Nachweis für diese Thrombinbildung könnte mit Hilfe eines Thrombinbildungs-Assay geführt werden.

Neben neuen Erkenntnissen für klinische Aspekte könnte Eap auch Vorteile für die Diagnostik einbringen. Da Eap nur durch *S. aureus* exprimiert wird, bietet eine für das entsprechende Gen spezifisch entwickelte PCR-Diagnostik eine 100% Sensitivität, Spezifität und zudem Ergebnisse in kürzester Zeit. Dies sind alles Vorteile, die die herkömmlichen Methoden nicht bieten können, da sie auf den phenotypischen, biochemischen und immunologischen Eigenschaften des Bakteriums beruhen.

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse verlangen somit danach, dass die genannten und weitere Details erforscht werden, um neue Strategien im Kampf gegen eine sepsisinduzierte Hämostase und vielleicht sogar auch gegen andere Krankheiten zu finden.

VI. Zusammenfassung

Thrombozyten nehmen eine ganz zentrale Position in der Blutgerinnung ein. Einerseits setzen sie infolge ihrer Aktivierung selbst Substanzen frei, die für den Hämostaseprozess sehr wichtig sind und diesen sekundär verstärken, z. B. Adhäsionsproteine, Gerinnungsfaktoren und Agonisten wie ADP oder TxA₂. Andererseits stellen sie mit ihrer Zelloberfläche eine geeignete Reaktionsfläche für die Abläufe der Blutgerinnung dar und kontrollieren auf diese Weise sogar den Gerinnungsprozess, so dass dieser ausschließlich an den Ort der Verletzung lokalisiert wird. Diese Kontrollfunktion erreichen die Thrombozyten, indem sie die Gerinnungsfaktoren an ihrer Oberfläche binden. Zudem setzen sie neben den gerinnungsfördernden Proteinen auch gerinnungshemmende Substanzen frei, wie TFPI, Plasminogen, Protein C und Protein S.

Zusätzlich zu ihrer zentralen Rolle in der Blutgerinnung besitzen die Thrombozyten wichtige Funktionen in der innate Immunabwehr. Zum Beispiel besitzen sie „toll-like-receptors“, Fc- und Komplementrezeptoren auf der Zelloberfläche, an die Pathogene binden und somit die Thrombozyten aktivieren. Infolge der Aktivierung setzen die Plättchen unter anderem antimikrobielle Proteine und reaktive Sauerstoffspezies frei. Mit der Plättchenaktivierung wird natürlich auch die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt, so dass die Pathogene im Folgenden durch Sequestration in den gebildeten Thromben aus der Zirkulation isoliert werden.

Neben antimikrobiellen Proteinen und reaktiven Sauerstoffspezies setzen aktivierte Plättchen auch Zytokine, Chemokine und vasoaktive Substanzen frei, wodurch die Aktivierung und Chemoattraktion der Zellen verstärkt wird, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Sehr viele Keime und deren Proteine besitzen die Fähigkeit, Thrombozyten zu aktivieren. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit der Einfluss des „Extracellular Adherence Protein“ (Eap) - gebildet von *S. aureus* - auf die Plättchenfunktion untersucht. Wie zahlreiche andere Proteine von *S. aureus* gehört Eap zu den Adhäsionsproteinen, welche die Bindung dieses Bakteriums an Wirtsstrukturen und -zellen ermöglichen, also den ersten essenziellen Schritt für eine erfolgreiche Infektion des Wirtsgewebes. Zudem wird die Zellinvasion von *S. aureus*, zum Beispiel in Epithel- und Endothelzellen, maßgeblich durch Eap vermittelt. Neben der Vermittlung der Zellinvasion moduliert Eap auch Entzündungsprozesse, indem es an ICAM-1 bindet und so die feste Bindung der Leukozyten an das Endothel und deren Transmigration ins entzündete Gewebe verhindert. Dieses kann bei Autoimmunerkrankungen jedoch durchaus Vorteile mit sich bringen, wie anhand einer experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis bewiesen wurde, deren Pathomechanismus mit dem der Multiplen Sklerose verglichen werden kann. Neben der Blockade der Leukozytentransmigration verschiebt Eap durch Modulation der Proliferation verschiedener

T-Zellpopulationen das Gleichgewicht zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort hin zur humoralen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das im Rahmen einer Sepsis in der Blutbahn vorkommende Eap die Thrombozytenfunktion beeinflusst. Einerseits wurde die Bindung von Fibrinogen-FITC stärker induziert, als es nach einer Inkubation mit Thrombin, Kollagen oder ADP der Fall war. Dagegen fiel allerdings die Sekretion der α -Granula eher mäßig aus. Die Degranulation der „dense bodies“ konnte gar nicht durch Eap hervorgerufen werden. Die Eap-induzierte Plättchenaktivierung wurde somit nicht durch die Agonisten aus den dichten Granula sekundär verstärkt. Auch aggregierte Eap humane Thrombozyten. Rückschließend aus diesen Ergebnissen werden die verschiedenen Aktivierungsparameter scheinbar unterschiedlich stark durch Eap beeinflusst.

Eap moduliert das Immunsystem auf zwei verschiedene Weisen, einerseits wird die innate Immunabwehr über die P-Selektin-PSGL-1-Verbindung zwischen Thrombozyten und Leukozyten stimuliert und die Transmigration der Leukozyten ins entzündete Gewebe durch Bindung von Eap an ICAM-1 gehemmt.

Andererseits exprimieren die Plättchen infolge einer starken Aktivierung CD40L auf ihrer Oberfläche, wodurch die Stimulation der CD40-tragenden Immun- und Endothelzellen induziert wird; auch Eap konnte die CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche hervorrufen. Ob die CD40L-Expression auch zur Stimulation der T-Zellproliferation beiträgt, wie es von Hagggar et al. (2005) beschrieben wurde, bleibt hier nur zu vermuten. Möglicherweise induziert Eap über die CD40L-CD40-Verbindung und die P-Selektin-PSGL-1-Verbindung auch die Bildung von Plättchen-Leukozytenassoziaten.

Der Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch die Bindung von Annexin-V-FITC, FVIIa-FITC, FVIII-FITC und FXIII-FITC lässt den Rückschluss zu, dass die Anordnung der prokoagulant Komplexe mit einer effizienten Thrombinbildung auf dieser Oberfläche durch Eap induziert wurde.

Allerdings lässt sich aus den Ergebnissen der Antikoagulanzenversuche schließen, dass die Aktivierung, hier in Form der Fibrinogenbindung gemessen, unabhängig von sekundär gebildetem Thrombin und von Ca^{2+} stattfinden muss, da weder direkte Thrombininhibitoren noch Komplexbildner die Eap-induzierte Fibrinogenbindung an Plättchen hemmen konnten. Lediglich die Heparine konnten eine vollständige Hemmung bewirken.

Außerdem wurden Versuche mit thiolreaktiven Substanzen durchgeführt, die bereits eine Hemmung der Plättchenaktivierung bewirkt hatten, die durch andere Agonisten induziert wurde.

Es wurde deutlich, dass Eap die Thrombozyten in Abhängigkeit von oberflächlich frei zugänglichen Thiolgruppen aktiviert, da Thiolblocker, wie pCMPS und DTNB, sowohl die Fibrinogenbindung als auch die CD62P-Expression induziert durch Eap hemmen konnten.

Im Gegensatz dazu können diese Thiolblocker bei der Plättchenaktivierung durch andere Agonisten, wie zum Beispiel Thrombin, nur die Fibrinogenbindung und Plättchenaggregation, nicht aber die Degranulation der Plättchen hemmen.

Auch andere thiolreaktive Substanzen, wie Gliotoxin und PAO, hemmten die Eap-induzierte Fibrinogenbindung an Thrombozyten.

Die Protein Disulfid Isomerase (PDI) spielt bei der integrinvermittelten Adhäsion bzw. bei der Fibrinogenbindung eine entscheidende Rolle. Als solches moduliert sie den Redoxstatus von allosterischen Disulfidbrücken durch einen Disulfidaustausch, wodurch eine Konformationsänderung des Rezeptors nach Kontakt mit einem Agonisten induziert wird. Dadurch erreicht der Rezeptor eine stärkere Affinität für den Liganden, hier Fibrinogen. Der PDI-Hemmer Bacitracin konnte laut anderer Autoren die Agonisten-induzierte Fibrinogenbindung verhindern. Das gleiche erreichte Bacitracin bei der Eap-induzierten Aktivierung der Plättchen.

Aufgrund der Erkenntnis, dass Eap mit freien Thiolgruppen interagiert, ließ sich auch eine mögliche Erklärung für die Heparinwirkung finden. Vermutlich spielt gar nicht so sehr die antithrombotische Wirkung der Heparine eine entscheidende Rolle, sondern vielmehr deren molekulare Struktur mit den zahlreichen Sulfatgruppen, mit denen Eap möglicherweise interagieren und so mit den Heparinmolekülen Komplexe bilden könnte.

Neben der Untersuchung des Einflusses von Eap auf humane Thrombozyten wurde auch der Effekt von Eap auf Thrombozyten verschiedener Tierarten untersucht. Infolge einer Inkubation mit Eap ergaben sich sehr unterschiedliche Reaktionen bei den einzelnen Tierarten. Dies ist sicherlich zum Teil durch eine tierartspezifisch unterschiedliche Reaktivität der Plättchen begründet, wie zum Beispiel bei Pferden, die besonders im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen, wie bei einer Hufrehe oder Kolik, eine erhöhte Neigung zu thrombo-embolischen Komplikationen haben.

Die Wiederkäuer besitzen dagegen eine sehr geringe Neigung zu derartigen Komplikationen. Das wurde auch in den Versuchsergebnissen dieser Arbeit deutlich und spiegelte sich in einer geringeren Reaktivität der Thrombozyten gegenüber verschiedenen Agonisten wider.

Was Eap betrifft, ist der bisher noch nicht geklärte Aktivierungsmechanismus natürlich von entscheidender Bedeutung. Hier wurde vermutet, dass Immunglobuline möglicherweise, ähnlich wie bei anderen Staphylokokken-Adhäsionsproteinen, eine Schlüsselrolle spielen könnten, so dass die Thrombozyten der Ratte möglicherweise aufgrund einer stärkeren

Antikörperproduktion, verglichen mit den anderen Tierarten und dem Menschen, in so viel stärkerem Maße aktiviert werden.

Es bedarf noch einiger Untersuchungen, bis der genaue Mechanismus der Eap-induzierten Plättchenaktivierung geklärt werden kann. Die bisher erlangten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung der Blutplättchen durch Rezeptoren oder Strukturen vermittelt wird, die oberflächlich frei zugängliche Thiolgruppen besitzen. Zudem ist bewiesen, dass MSCRAMMs, wie die fibrinogen- und fibrinonectinbindenden Proteine (FnBPs) und die Clumping Faktoren A und B (ClfA u. B), Plättchen über den FcγRIIA-Rezeptor aktivieren. Ebenso wie die Staphylokokken nutzen auch andere Bakterien wie *Sc. pyogenes* oder *Sc. sanguis* diesen Rezeptor, um die Thrombozyten mit entsprechenden oberflächlich exprimierten Proteinen zu aktivieren. Es läge also nahe zu überprüfen, ob auch Eap diesen Aktivierungsweg nutzt. Ob auf diesem Rezeptor oberflächlich Thiolgruppen frei zugänglich sind, wird in der derzeitigen verfügbaren Literatur nicht genannt. Zudem könnten bei diesem Mechanismus tatsächlich IgGs eine vermittelnde Rolle spielen, ähnlich wie bei den anderen Adhäsionsproteinen von *S. aureus*, da der FcγRIIA-Rezeptor gleichzeitig auch der IgG-Rezeptor ist.

Im Rahmen einer Sepsis ist Eap in der gesamten Blutbahn verteilt und kann durch seine Fähigkeit, die Plättchen zu aktivieren, zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung führen. Erstens wird dadurch natürlich der Transport von Medikamenten, Nähr- und Abfallstoffen über die Blutbahn beeinträchtigt. Zweitens würde das bedeuten, dass die Keime in den Thromben vor Medikamenten und dem Immunsystem geschützt sind. Noch prekärer erscheint die Situation, wenn man bedenkt, dass gerade *S. aureus* immer mehr Resistenzen gegen sehr viele Antibiotika entwickelt, und wie schwer und folgenreich eine Sepsis mit *S. aureus* verlaufen kann (z. B. mit der Entwicklung einer Infektiösen Endokarditis und folgenden Herzklappeninsuffizienzen als bleibender Schaden).

Angesichts dieser Tatsachen wird deutlich, wie wichtig die Suche nach neuen Therapieansätzen gegen eine Sepsis ist. Neben der Bekämpfung der Bakterien sollte auch die Prophylaxe/Behandlung gegen eine Plättchenaktivierung, bzw. gegen eine DIC, frühzeitig mit in die Therapiepläne einbezogen werden.

Kann der Aktivierungsmechanismus, der durch Eap an Plättchen induziert wird, in Zukunft geklärt werden, würde man damit auch ein besseres Verständnis für die intrazellulären Signalwege der Thrombozyten gewinnen. Indem man mehr über diese intrazellulären Prozesse und die Pathogenese von Komplikationen in Verbindung mit einer Sepsis erfährt, wird man auch Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten finden können.

VII. Summary

Platelets are the central and main mediators of haemostasis. On the one hand, they release substances in response to their activation, which are essential for the coagulation process, like adhesive proteins and coagulation factors, as well as agonists like ADP or TxA₂ reinforcing the activation of the thrombocytes. On the other hand, they present a suitable surface for the coagulation process, where coagulation factors and agonists can bind. By binding these, the thrombocytes localize the coagulation to the place of injury, controlling this process and preventing an excessive coagulation in the vessel system.

Additionally, they control the coagulation process by releasing inhibiting substances like TFPI, plasminogen, protein C and protein S.

In addition to their central role in the coagulation process, they also possess abilities to communicate with cells of the innate and the specific immune defence system and with pathogens. For example, they have “toll-like-receptors”, Fc- and complement receptors on their cell surface by which pathogens get in contact with the thrombocytes and activate them. In response to their activation they release microbicidal proteins and reactive oxygen species to fight pathogens. Following the thrombocytic activation and secretion the pathogens are sequestered in a thrombus being eliminated from the circulation system.

Beside microbicidal proteins and reactive oxygen species, thrombocytes also release cytokines, chemokines and vasoactive substances. By secreting these substances, thrombocytes activate cells of the innate immune defence system such as leukocytes. Since the activation and transmigration of leukocytes to inflamed tissue is essential for the inflammation process, thrombocytes thereby deliver an important contribution and reinforcement to the innate immune response.

With the knowledge that many germs and associated proteins are able to activate thrombocytes, the experiments for this scientific work were focussed on the “extracellular adherence protein” (Eap) – synthesized by *S. aureus* - and its effects on platelet function.

As several other proteins released by *S. aureus* Eap belongs to the group of adhesion proteins. It enables this bacterium to bind to host tissues and cells, which is the first and essential step for a successful infection of host tissues. Beside the bacterial adhesion to host tissues it is also evident that invasion of *S. aureus* into endothelial and epithelial cells is mainly mediated by Eap. In addition, Eap is capable of modulating inflammation processes. By binding to ICAM-1, Eap inhibits the binding of leukocytes to these endothelial receptor and thereby the transmigration of leukocytes to the inflamed tissue. Beside the negative effect of this blockage, this can be a benefit in case of autoimmune neuroinflammatory disorders such as multiple sclerosis, where the pathomechanism of multiple sclerosis is inhibited by blocking the leukocytic transmigration.

Another effect of Eap on the immune system is that it modulates the proliferation of distinct T-cell-populations in the way that the balance between cellular and humoral immune response is shifted towards the humoral defence.

In this work it is shown that Eap can modulate platelet functions. It activates platelets, which can be characterized by fibrinogen binding. This is more intense after incubation with Eap compared to the binding intensity after incubation with thrombin, collagen or ADP. In contrast to that, secretion of the α -granules turned out to be rather poor after incubation of human thrombocytes with Eap and secretion of the dense bodies could not be detected. Therefore, Eap-induced activation was not secondarily enhanced by agonists of the dense bodies. Eap also aggregated human platelets.

Hence, different platelet activation parameters were influenced by Eap unequally.

In addition to the modulation of the innate immune response via the p-selectin-PSGL-1-connection and the inhibition of leukocytic transmigration via ICAM-1, there is still another factor making Eap an immune modulator. Incubated with Eap, thrombocytes express CD40L. CD40L on the platelet surface stimulates the immune and endothelial cells, which express CD40 on their cell surfaces. Therefore, the CD40L-expression on platelets might also stimulate the T-cell-proliferation as it was described by Hagggar et al. (2005).

It is quite possible that Eap induces the formation of associates between thrombocytes and leukocytes via the CD40L-CD40-connection and the P-selectin-PSGL-1-connection.

The evidence of an Eap-induced procoagulant surface on thrombocytes detected by binding of FITC-conjugated coagulation factors and Annexin-V-FITC, leads to the conclusion that Eap induces the binding of procoagulant complexes to the cell surface and owing to this to a sufficient synthesis of thrombin on the platelet surface.

But surprisingly, the experiments with anticoagulants show that the activation of thrombocytes - here detected by fibrinogen binding, takes place independently from thrombin or Ca^{2+} . This can be concluded from the fact that neither thrombin inhibitors nor Ca^{2+} -chelators can prevent platelet activation detected by fibrinogen binding. Just the group of heparines can block the Eap-induced platelet activation completely.

In this work, also the effect of thiol reactive substances was assayed, which had shown an inhibition of platelet activation induced by known agonists like thrombin. So it is of great interest which effect they have on Eap-induced platelet activation.

It was reported before that in case of platelet activation by known agonists thiol blocking substances like pCMPS or DTNB are only able to inhibit the binding of fibrinogen, but not granule secretion. That means the degranulation of platelets induced by known agonists occurs independently of free thiol groups on the receptors, whereas free thiol groups are necessary for the binding of fibrinogen.

In contrast, the results of this work show that after incubation with Eap the thiol blocking substances inhibited the binding of fibrinogen to platelets as well as platelet degranulation.

So there is a definitive dependency on free thiol groups on the platelet surface, not only for fibrinogen binding, but also for granule secretion.

Additionally, the activation of platelets by Eap seems to be dependent on the protein disulfide isomerase (PDI) concluded from the experiments that have shown an inhibition of Eap-induced fibrinogen binding after incubation with the PDI-inhibitor bacitracin.

Based on the knowledge that Eap reacts with free thiol groups there could be a possible explanation for the effect of the heparines. Probably it is not the antithrombotic effect of the heparines inhibiting the platelet activation induced by Eap, but much more their molecular structure with lots of sulphate groups that Eap possibly interacts with forming complexes with the heparine molecules.

In addition to the effects of Eap on human thrombocytes, the effect of Eap on thrombocytes of different animal species was studied. Further experiments with blood samples from animals have shown that there is a great variation in the platelet reactions in response to Eap. This could possibly be explained by the fact that there is a species dependent different reactivity of platelets to the different agonists. Horses for example show a high tendency to thrombo-embolic complications, especially in connection with inflammation processes as found in case of colic or laminitis.

In contrast, ruminants have been reported to have a very low tendency to those complications, which has also been reflected by a very low reactivity of ruminant platelets to different agonists in this work.

Besides, the exact mechanism of platelet activation induced by Eap is not known yet. This could possibly imply further details to understand these differences in reactivity. We suppose that similar to other adhesion proteins of *S. aureus* immune globulins and the Fc-receptor could play a key role. It is therefore conceivable that a more intense production of antibodies in the rat compared to other species could induce a stronger activation of thrombocytes; or may be on the surface of rat platelets there are more receptors or structures expressed that Eap could interact with compared to platelets of other species. Further research is necessary to find out more about the mechanism of platelet activation induced by Eap. The results of this work indicate that Eap activates platelets via structures or receptors that possess accessible thiol groups on their surface.

In addition it is evident that MSCRAMMs like the fibrinogen- and fibronectin binding proteins (FnBPs), the clumping factors A and B (Clf A and B) and the staphylococcal protein A (SPA) activate platelets via the FcγRIIA-receptor.

Beside the staphylococcal bacteria several other bacterial species are known to activate platelets via this receptor, for example *Sc. pyogenes* or *Sc. sanguis* which also express adhesion proteins on their surface. So, obviously, in further experiments it should be checked out if Eap activates platelets via this receptor as well. In the present literature it is not mentioned if there are thiol groups on the Fc-receptor, which are accessible on its surface.

Additionally, in case of activation via this receptor, immune globulins could have a mediating role indeed, since the Fc-receptor is the receptor for the immune globulins as well.

In case of a sepsis, Eap is distributed over the whole circulation system. With its capability to activate platelets it can cause clot forming, so that the bacteria are sequestered in the clots being protected against the immune cells and medications; in worst case a disseminated intravascular coagulation (DIC) could be initiated. The situation seems to be still more precarious taking into account that *S. aureus* develops continuously more resistances to antibiotics and how heavy the course of a sepsis induced by *S. aureus* can be, for example by developing an infectious endocarditis that can result in a permanent heart deficiency.

Based on these facts it becomes clear how important it is to find new therapeutic ways to fight septicaemia more successfully. In general, it is important not only to fight the bacteria, but also to do a prophylaxis, respectively a therapy against platelet activation and DIC.

Further research on the effects of Eap on platelet function could lead to a better understanding of the intracellular processes of platelet activation caused by Eap. Gaining more detailed information about these mechanisms and the pathogenesis of complications in connection with a sepsis could yield to possible new therapeutic approaches.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigene
Ak	Antikörper
Akt/ PKB	Akt/Proteinkinase B, Serin/ Threonin Proteinkinase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (entspr. <i>A. terreus</i> u. a.)
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
β-TG	β-Thromboglobulin
BCA	Bicinchinon-Säure
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C8bp	C8-bindendes Protein
cAK	cyclo-Adenosinmonophosphat abhängige Kinase
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CAMP	Kationische antimikrobielle Peptide
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CLEC-2	C-type lectin-like receptor-2
Clf A & B	Clumping Factor A & B
Da	Dalton
DAF	Decay accelerating Factor
DAG	Diacylglycerin
DC-SIGN	Dendritic cell specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic-acid)
DTS	dense tubular system (elektronendichtes tubuläres System)
EAE	Experimentelle autoimmunvermittelte Enzephalomyelitis

Eap	Extrazelluläres Adhäsionsprotein
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunfluoreszenztest (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_{\max}	Emissionsmaximum
EPR -1	Effektor Protease Rezeptor-1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen
FACS	Fluorescence-activated cell sorter (Durchflusszytometer)
F Va	Gerinnungsfaktor Va (entspr. auch FXa, FIXa oder FX, FIX)
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FibFITC/ FFITC	mit FITC konjugiertes Fibrinogen
fl	Femtoliter
FnBPA & B	Fibronectin bindende Proteine A & B
FP-A & -B	Fibrinopeptid-A & -B
F/P-Ratio	FITC/ Protein-Verhältnis
FSC	forward scatter channel (Photodiode, die das Vorwärtsstreulicht detektiert)
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
GDP	Guanisindiphosphat
GFP	gelfiltrierte Plättchen
GPRP	Glycin-Prolin-Arginin-Prolin
GPVI	Glykoprotein Ia (entspr. auch GP Ib, IX, IIb/IIIa etc.)
GSH	Glutathion (monomere, reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (dimere, oxidierte Form)
GTP	Guanisintriphosphat
h	Stunde(n)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus-1
HMGB-1	High-mobility-group-box-1 Protein
5HT2A-Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-2A-Rezeptor
H/T-Puffer	Hepes/Tyrode-Puffer
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IE	Infektiöse Endokarditis
IFN- γ	Interferon- γ

IgE	Immunglobulin E (entspr. IgG, IgM etc.)
IL	Interleukin (z. B. IL-8)
IP ₃	Inositol (1,4,5-)trisphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif (Tyrosinbasiertes Aktivierungsmotiv am Immunrezeptor)
kDa	Kilodalton
Koll.	Kollagen
LFA-1	Mit der Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LPXTG-Motiv	Leucin-Prolin-Norleucin-Threonin-Glycin-Motiv
LRRs	leucin rich repeats (Leucinreiche Wiederholungssequenzen)
Mac-1	Macrophage associated antigen-1
mAk	monoklonaler Antikörper
Map	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II analoges Protein
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MEK	MAPK/ ERK-Kinase
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
MIP- α	Macrophage inflammatory protein-1 α
MIRL	Membraninhibitor der reaktiven Zellyse
MLC	Leichte Myosinkette
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i> -Stamm
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
n	Anzahl der Messwerte
NADPH	reduzierte Form des Nicotinamid-adenindinukleotid-triphosphat
NF- κ B	Nuklearfaktor Kappa B (kernständiger Transkriptionsfaktor)
NMH	niedermolekulares Heparin
NPase	Neutrale Phosphatase
OCS	Open canalicular system (Offenes kanalikuläres System)
OD	optische Dichte bei entsprechender Wellenlänge (280 nm z. B.)
OFR	Oxygen free radicals
OPN	Osteopontin
p	Signifikanzmaß
PAF	Platelet Activating Factor (Plättchenaktivierender Faktor)

PAMP	Pathogen associated molecular patterns (Pathogenassoziierte Molekularstrukturen)
PAO	Phenylarsinoxid
PAR1 & 4	Protease activated receptors 1 & 4 (Protease aktivierte Rezeptoren 1 & 4)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (Phosphate Buffered Saline)
PC	Phosphatidylcholin
pCMPS	Para-Chloromercuriphenylsulfonat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PE	Phosphatidylethanolamin
Pe	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PF-4	Platelet Factor-4 (Plättchenfaktor-4)
PGRP	Peptidoglykan Recognition Protein (Peptidoglykan-Erkennungsprotein)
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PLC β	Phospholipase C β
PLC γ	Phospholipase C γ
PMN	Polymorphnukleare Neutrophile
PMP	Platelet derived microbicidal protein (aus Thrombozyten freigesetztes antibakterielles Protein)
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PRR	Pattern Recognition Receptor (Rezeptoren, welche die PAMP erkennen)
PS	Phosphatidylserin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RANTES	regulated on activated normal T-cell expressed and secreted
Raf	Rat Fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
rel. E.	relative Einheiten
rel. Fluoresz.	relative Fluoreszenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<i>Sc. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
S.D.	Standard Deviation (Standardabweichung)
SEC2	Staphylococcal Enterotoxin 2
SERAM	Secretable expanded repertoire adhesive molecules
SM	Sphingomyelin
SMC	Submembranöses Zytoskelett
SPA	Staphylococcal Protein A
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SSC	side scatter channel (Photodiode, die das Seitwärtsstreulicht detektiert)
T β -4	Thymosin β -4
TBS	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan gepufferte Natriumchloridlösung
TF	Tissue Factor (Gewebefaktor)
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor (Inhibitor d. Gewebefaktorsignalweges)
Th-Zellen	T-Helferzellen
Thr.	Thrombin
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
t-PA	Gewebe-Plasminogenaktivator
TSP-1	Thrombospondin-1
TxA ₂	Thromboxan A ₂
Tz	Thrombozyt(en)
U	“Unit” (Einheit)
UFH	unfraktioniertes Heparin
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	Vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor
vgl.	vergleiche
VLA-4	Very Late Antigen-4
vWF	van Willebrand Faktor
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

IX. Literaturverzeichnis

- Ahamed,J., Versteeg,H.H., Kerver,M., Chen,V.M., Mueller,B.M., Hogg,P.J., and Ruf,W. (2006): Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103:13932-13937.
- Ahmad,S.S., Scandura,J.M., and Walsh,P.N. (2000): Structural and functional characterization of platelet receptor-mediated factor VIII binding. *J.Biol.Chem.*, 275:13071-13081.
- Alston,W.K., Elliott,D.A., Epstein,M.E., Hatcher,V.B., Tang,M., and Lowy,F.D. (1997): Extracellular matrix heparan sulfate modulates endothelial cell susceptibility to *Staphylococcus aureus*. *J.Cell Physiol*, 173:102-109.
- Ashhurst-Smith,C., Norton,R., Thoureau,W., and Peel,M.M. (1998): *Actinobacillus equuli* Septicemia: an unusual zoonotic infection. *J.Clin.Microb.*, 36(9):2789-2790.
- Aszodi,A., Pfeifer,A., Ahmad,M., Glauner,M., Zhou,X.H., Ny,L., Andersson,K.E., Kehrel,B., Offermanns,S., and Fassler,R. (1999): The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.*, 18:37-48.
- Athanasopoulos,A.N., Economopoulou,M., Orlova,V.V., Sobke,A., Schneider,D., Weber,H., Augustin,H.G., Eming,S.A., Schubert,U., Linn,T., Nawroth,P.P., Hussain,M., Hammes,H.P., Herrmann,M., Preissner,K.T., and Chavakis,T. (2006): The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood*, 107:2720-2727.
- Baglia,F.A., Shrimpton,C.N., Emsley,J., Kitagawa,K., Ruggeri,Z.M., Lopez,J.A., and Walsh,P.N. (2004): Factor XI interacts with the leucine-rich repeats of glycoprotein Ibalph on the activated platelet. *J.Biol.Chem.*, 279:49323-49329.
- Barry,O.P., Pratico,D., Savani,R.C., and Fitzgerald,G.A. (1998): Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J.Clin.Invest.*, 102:136-144.

- Begbie, M.E., Mamdani, A., Gatai, S., Eltringham-Smith, L.J., Bhakta, V., Hortelano, G., and Sheffield, W.P. (2005): An important role for the activation peptide domain in controlling factor IX levels in the blood of haemophilia B mice. *Thromb. Haemost.*, 94:1138-1147.
- Bentfeld-Barker, M.E. and Bainton, D.F. (1982): Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood*, 59:472-481.
- Blasi, F. and Carmeliet, P. (2002): uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Rev., Molecul. Cell Biol.*, 3:932-943.
- Bodin, S., Viala, C., Ragab, A., and Payrastre, B. (2003): A critical role of lipid rafts in the organization of a key FcγRIIIa-mediated signaling pathway in human platelets. *Thromb. Haemost.*, 89:318-330.
- Bogdanov, V.Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., and Nemerson, Y. (2003): Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat. Med.*, 9:458-462.
- Bom, V.J. and Bertina, R.M. (1990): The contributions of Ca²⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem. J.*, 265:327-336.
- Bombeli, T., Schwartz, B.R., and Harlan, J.M. (1998): Adhesion of Activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), α_vβ₃-Integrin and GPIbα. *J. Exp. Med.* 187, 3: 329-339.
- Born, G.V. and Cross, M.J. (1963): The Aggregation of Blood Platelets. *J. Physiol.*, 168:178-195.
- Bouchard, B.A., Catcher, C.S., Thrash, B.R., Adida, C., and Tracy, P.B. (1997): Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J. Biol. Chem.*, 272:9244-9251.
- Breton-Gorius, J. and Guichard, J. (1972): Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelets and megakaryocytes. *Am. J. Pathol.*, 66:277-293.
- Brown, A.S., Moro, M.A., Masse, J.M., Cramer, E.M., Radomski, M., and Darley-Usmar, V. (1998): Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc. Res.*, 40:380-388.

- Celi,A., Pellegrini,G., Lorenzet,R., De Blasi,A., Ready,N., Furie,B.C., and Furie,B. (1994): P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91:8767-8771.
- Chaipan,C., Soilleux,E.J., Simpson,P., Hofmann,H., Gramberg,T., Marzi,A., Geier,M., Stewart,E.A., Eisemann,J., Steinkasserer,A., Suzuki-Inoue,K., Fuller,G.L., Pearce,A.C., Watson,S.P., Hoxie,J.A., Baribaud,F., and Pohlmann,S. (2006): DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J.Virol.*, 80:8951-8960.
- Chakrabarti,S., Varghese,S., Vitseva,O., Tanriverdi,K., and Freedman,J.E. (2005): CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25:2428-2434.
- Chakroun,T., Gerotziapas,G.T., Seghatchian,J., Samama,M.M., Hatmi,M., and Elalamy,I. (2006): The influence of fibrin polymerization and platelet-mediated contractile forces on citrated whole blood thromboelastography profile. *Thromb.Haemost.*, 95:822-828.
- Chang,J.Y. (1990): Production, properties, and thrombin inhibitory mechanism of hirudin amino-terminal core fragments. *J.Biol.Chem.*, 265:22159-22166.
- Chatrenet,B. and Chang,J.Y. (1993): The disulfide folding pathway of hirudin elucidated by stop/go folding experiments. *J.Biol.Chem.*, 268:20988-20996.
- Chavakis,T., Hussain,M., Kanse,S.M., Peters,G., Bretzel,R.G., Flock,J.I., Herrmann,M., and Preissner,K.T. (2002): *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat.Med.*, 8:687-693.
- Chavakis,T., Wiechmann,K., Preissner,K.T., and Herrmann,M. (2005): *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb.Haemost.*, 94:278-285.
- Chen,M. and Geng,J.G. (2006): P-Selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis. *Arch.Immunol.Ther.Exp.*, 54 (2): 75-84.
- Chen,R., Chen,X., Salomon,R.G., and McIntyre,T.M. (2009): Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 29:363-371.

- Chen, V.M. and Hogg, P.J. (2006): Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis. *J.Thromb.Haemost.*, 4:2533-2541.
- Cheryk, L.A., Gentry, P.A., and Tablin, F. (1997): Morphological characteristics of bovine platelets activated with platelet activating factor or thrombin. *Compar.Haematol.Intern.*, 1:88-94.
- Chesney, C.M., Pifer, D.D., Byers, L.W., and Muirhead, E.E. (1982): Effect of platelet-activating factor (PAF) on human platelets. *Blood*, 59:582-585.
- Christin, L., Wysong, D.R., Meshulam, T., Haste, R., Simons, E.R., and Diamond, R.D. (1998): Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils. *Infect.Immun.*, 66:1181-1189.
- Cognasse, F., Hamzeh, H., Chavarin, P., Acquart, S., Genin, C., and Garraud, O. (2005): Evidence of Toll-like-receptor molecules on human platelets. *Immun.Cell Biol.*, 83:196-198
- Coughlin, S.R. (2000): Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407:258-264.
- Cox, A.D. and Devine, D.V. (1994): Factor XIIIa binding to activated platelets is mediated through activation of glycoprotein IIb-IIIa. *Blood*, 83:1006-1016.
- Cramer, E.M., Savidge, G.F., Vainchenker, W., Berndt, M.C., Pidard, D., Caen, J.P., Masse, J.M., and Breton-Gorius, J. (1990): Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. *Blood*, 75:1220-1227.
- Crombie, R., Silverstein, R.L., MacLow, C., Pearce, S.F., Nachman, R.L., and Laurence, J. (1998): Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J.Exp.Med.*, 187:25-35.
- Dahme, E., Weiss, E. (2007): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart, 7-8.
- Danese, S., de la, M.C., Reyes, B.M., Sans, M., Levine, A.D., and Fiocchi, C. (2004): Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J.Immunol.*, 172:2011-2015.

- de Jonge, E., Dekkers, P.E., Creasey, A.A., Hack, C.E., Paulson, S.K., Karim, A., Kesecioglu, J., Levi, M., van Deventer, S.J., and van der, P.T. (2000): Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. *Blood*, 95:1124-1129.
- de Rossi, L.W., Horn, N.A., Baumert, J.H., Gutensohn, K., Hutschenreuter, G., and Rossaint, R. (2001): Xenon does not affect human platelet function in vitro. *Anesth. Analg.*, 93:635-640.
- Dhawan, V.K., Bayer, A.S., and Yeaman, M.R. (1998): In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with enhanced progression and hematogenous dissemination in experimental *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Infect. Immun.*, 66:3476-3479.
- Diacovo, T.G., deFougerolles, A.R., Bainton, D.F., and Springer, T.A. (1994): A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J. Clin. Invest.*, 94:1243-1251.
- Dickneite, G. and Leithauser, B. (1999): Influence of antithrombin III on coagulation and inflammation in porcine septic shock. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19:1566-1572.
- Dore, M., Korthuis, R.J., Granger, D.N., Entman, M.L., and Smith, C.W. (1993): P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood*, 82:1308-1316.
- Elg, M., Gustafsson, D., and Carlsson, S. (1999): Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rat. *Thromb. Res.*, 94:187-197.
- Elzey, B.D., Tian, J., Jensen, R.J., Swanson, A.K., Lees, J.R., Lentz, S.R., Stein, C.S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B.L., and Ratliff, T.L. (2003): Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.*, 19:9-19.
- Eriksson, U.G., Bredberg, U., Hoffmann, K.J., Thuresson, A., Gabrielsson, M., Ericsson, H., Ahnoff, M., Gislén, K., Fager, G., and Gustafsson, D. (2003): Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos.*, 31:294-305.
- Erlandsson, H.H. and Andersson, U. (2004): Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur. J. Immunol.*, 34:1503-1512.

- Fitzgerald, J.R., Loughman, A., Keane, F., Brennan, M., Knobel, M., Higgins, J., Visai, L., Speziale, P., Cox, D., and Foster, T.J. (2006): Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor. *Mol. Microbiol.*, 59:212-230.
- Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., and Cox, D. (2006): The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature Rev.*, 4:445-457.
- Flock, M. and Flock, J.I. (2001): Rebinding of extracellular adherence protein Eap to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *J. Bacteriol.*, 183:3999-4003.
- Fowler, V.G., Jr., Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein, E., Corey, G.R., Spelman, D., Bradley, S.F., Barsic, B., Pappas, P.A., Anstrom, K.J., Wray, D., Fortes, C.Q., Anguera, I., Athan, E., Jones, P., van der Meer, J.T., Elliott, T.S., Levine, D.P., and Bayer, A.S. (2005): *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*, 293:3012-3021.
- Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., and Wagner, D.D. (2000): P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.*, 191:1413-1422.
- Furie, B., Furie, B.C., and Flaumenhaft, R. (2001): A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb. Haemost.*, 86:214-221.
- Garnett, M.J. and Marais, R. (2004): Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6:313-319.
- Gear, A.R. and Camerini, D. (2003): Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*, 10:335-350.
- Geisbrecht, B.V., Hamaoka, B.Y., Perman, B., Zemla, A., and Leahy, D.J. (2005): The crystal structures of EAP domains from *Staphylococcus aureus* reveal an unexpected homology to bacterial superantigens. *J. Biol. Chem.*, 280:17243-17250.
- Gerhard, R., John, H., Aktories, K., and Just, I. (2003): Thiol-modifying phenylarsine oxide inhibits guanine nucleotide binding of Rho but not of Rac GTPases. *Mol. Pharmacol.*, 63:1349-1355.

- Gibbins,J., Asselin,J., Farndale,R., Barnes,M., Law,C.L., and Watson,S.P. (1996): Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J.Biol.Chem.*, 271:18095-18099.
- Gibbins,J.M. (2004): Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J.Cell Science*, 117: 3415-3425.
- Gofer-Dadosh,N., Klepfish,A., Schmilowitz,H., Shaklai,M., and Lahav,J. (1997): Affinity modulation in platelet alpha 2 beta 1 following ligand binding. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 232:724-727.
- Goldsmith,E.B., Erickson,B.W., and Thompson,N.L. (1997): Synthetic peptides from mouse Fc receptor (MoFc gamma RII) that alter the binding of IgG to MoFc gamma RII. *Biochemistry*, 36:952-959.
- Gomes,O.M. and Gomes,E.S. (2010): Dipyridamole and low doses of heparin as a new successful physiopathologic and therapeutic approach in 2 cases of disseminated intravascular coagulation. *Heart Surg Forum*, 13 (1):E49-51.
- Green,D., Pace,S.M., Hurne,A.M., Waring,P., Hart,J.D., and Dulhunty,A.F. (2000): Skeletal muscle ryanodine receptor channels are activated by the fungal metabolite, gliotoxin. *J.Membr.Biol.*, 175:223-233.
- Greenwalt,D.E. and Tandon,N.N. (1994): Platelet shape change and Ca²⁺ mobilization induced by collagen, but not thrombin or ADP, are inhibited by phenylarsine oxide. *Br.J.Haematol.*, 88:830-838.
- Grouse,L.H., Rao,G.H., Weiss,D.J., Perman,V., and White,J.G. (1990): Surface-activated bovine platelets do not spread, they unfold. *Am.J.Pathol.*, 136:399-408.
- Hänsch,G.M., Gemsa,D. and Resch,K. (1985): Induction of prostanoid synthesis in human platelets by the late complement components C5b-9 and channel forming antibiotic Nystatin: Inhibition of the reacylation of liberated arachidonic acid. *J. Immun.*, 135(2):1320-1324.
- Haggar,A., Hussain,M., Lonnie,H., Herrmann,M., Norrby-Teglund,A., and Flock,J.I. (2003): Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect.Immun.*, 71:2310-2317.

- Haggar,A., Ehrnfelt,C., Holgersson,J., and Flock,J.I. (2004): The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect.Immun.*, 72:6164-6167.
- Haggar,A., Shannon,O., Norrby-Teglund,A., and Flock,J.I. (2005): Dual effects of extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* on peripheral blood mononuclear cells. *J.Infect.Dis.*, 192:210-217.
- Hammel,M., Nemecek,D., Keightley,J.A., Thomas,G.J., Jr., and Geisbrecht,B.V. (2007): The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap) adopts an elongated but structured conformation in solution. *Protein Sci.*, 16:2605-2617.
- Hansen,U., Hussain,M., Villone,D., Herrmann,M., Robenek,H., Peters,G., Sinha,B., and Bruckner,P. (2006): The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.*, 25:252-260.
- Haque,A., Cuna,W., Bonnel,B., Capron,A., and Joseph,M. (1985): Platelet mediated killing of larvae from different filarial species in the presence of *Dipetalonema viteae* stimulated IgE antibodies. *Parasite Immunol.*, 7:517-526.
- Harraghy,N., Hussain,M., Haggar,A., Chavakis,T., Sinha,B., Herrmann,M., and Flock,J.I. (2003): The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*, 149:2701-2707.
- Harris,L.G., Foster,S.J., and Richards,R.G. (2002): An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur.Cell Mater.*, 4:39-60.
- Harrison,P. and Cramer,E.M. (1993): Platelet alpha-granules. *Blood Rev.*, 7:52-62.
- Hartleib,J., Köhler,N., Dickinson,R.B., Chhatwal,G.S., Sixma,J.J., Hartford,O.M., Foster,T.J., Peters,G., Kehrel,B.E., and Herrmann,M. (2000): Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*, 96: 2149-2156.
- Henn,V., Slupsky,J.R., Grafe,M., Anagnostopoulos,I., Forster,R., Muller-Berghaus,G., and Kroczeck,R.A. (1998): CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391:591-594.

- Hoffman, M. and Monroe, D.M., III (2001): A cell-based model of hemostasis. *Thromb.Haemost.*, 85:958-965.
- Hoffman, M. (2003): A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIIa. *Blood Rev.*, 17 Suppl 1:S1-S5
- Hogg, P.J. (2003): Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem.Sci.*, 28:210-214.
- Holme, P.A., Orvim, U., Hamers, M.J., Solum, N.O., Brosstad, F.R., Barstad, R.M., and Sakariassen, K.S. (1997): Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 17:646-653.
- Hudry-Clergeon, H., Stengel, D., Ninio, E., and Vilgrain, I. (2005): Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J.*, 19:512-520.
- Hussain, M., Hagggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J.I., and Herrmann, M. (2002): Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect.Immun.*, 70:2933-2940.
- Hussain, M., von Eiff, C., Sinha, B., Joost, I., Herrmann, M., Peters, G., and Becker, K. (2008): eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Microbiol.*, 46:470-476.
- Hussain, M., Hagggar, A., Peters, G., Chhatwal, G.S., Herrmann, M., Flock, J.I., and Sinha, B. (2008): More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect.Immun.*, 76:5615-5623.
- Inoue, M., Saito, Y., Hirata, E., Morino, Y., and Nagase, S. (1987): Regulation of redox states of plasma proteins by metabolism and transport of glutathione and related compounds. *J.Prot.Chem.*, 6(3):207-225.
- Jacobs, R.M., Boyce, J.T., and Kociba, G.J. (1986): Flow cytometric and radioisotopic determinations of platelet survival time in normal cats and feline leukemia virus-infected cats. *Cytometry*, 7:64-69.
- Jain, N.C. (1993): Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia, 72-81, 105-132.

- Jarvis,G.E. and Evans,R.J. (1996): Platelet-activating factor and not thromboxane A2 is an important mediator of endotoxin-induced platelet aggregation in equine heparinised whole blood in vitro. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 7:194-198.
- Jin,J. and Kunapuli,S.P. (1998): Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95:8070-8074.
- Jurk,K., Clemetson,K.J., de Groot,P.G., Brodde,M.F., Steiner,M., Savion,N., Varon,D., Sixma,J.J., Van Aken,H., and Kehrel,B.E. (2003): Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J.*, 17:1490-1492.
- Jurk,K., Strey,A., Van Aken,H., Janning,A., Gerke,V., and Kehrel,B.E. (2005): Crosstalk between haemostasis and inflammation: Platelets modulate the adhesion and transmigration process of monocytes. *Anesth.Analg.*, 100 Suppl.S: S-59.
- Jurk,K. and Kehrel,B.E. (2005): Platelets: physiology and biochemistry. *Semin.Thromb.Hemost.*, 31:381-392.
- Jurk,K. and Kehrel,B.E. (2005): Platelets and the new comprehension of haemostasis] *Hamostaseologie.*, 25:39-49.
- Jurk,K. and Kehrel,B.E. (2008): The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation. *Dtsch.Med.Wochenschr.*, 133:1130-1135.
- Kahn,M.L., Zheng,Y.W., Huang,W., Bigornia,V., Zeng,D., Moff,S., Farese,R.V., Jr., Tam,C., and Coughlin,S.R. (1998): A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 394:690-694.
- Karmann,K., Hughes,C.C., Schechner,J., Fanslow,W.C., and Pober,J.S. (1995): CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92:4342-4346.
- Kehrel,B., Wierwille,S., Clemetson,K.J., Anders,O., Steiner,M., Knight,C.G., Farndale,R.W., Okuma,M., and Barnes,M.J. (1998): Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*, 91:491-499.

- Kehrel,B.E. and Jurk,K. (2004): Platelets at the interface between haemostasis and innate immunity. *Transfus.Med.Hemother.*, 31:379-386.
- Keuren,J.F., Wielders,S.J., Ulrichs,H., Hackeng,T., Heemskerk,J.W., Deckmyn,H., Bevers,E.M., and Lindhout,T. (2005): Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25:1499-1505.
- Kim,Y.J., Borsig,L., Varki,N.M., and Varki,A. (1998): P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95:9325-9330.
- Klages,B., Brandt,U., Simon,M.I., Schultz,G., and Offermanns,S. (1999): Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J.Cell Biol.*, 144:745-754.
- Klinger,M.H.F. und Ulbricht,T. (2003): Participation of human blood platelets in antimicrobial host defense. *Transfus.Med.Hemother.*, 30:57-62.
- Kroll,M.H., Harris,T.S., Moake,J.L., Handin,R.I., and Schafer,A.I. (1991): von Willebrand factor binding to platelet Gplb initiates signals for platelet activation. *J.Clin.Invest*, 88:1568-1573.
- Krotz,F., Sohn,H.Y., and Pohl,U. (2004): Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 24:1988-1996.
- Lahav,J., Gofer-Dadosh,N., Luboshitz,J., Hess,O., and Shaklai,M. (2000): Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett.*, 475:89-92.
- Lahav,J., Jurk,K., Hess,O., Barnes,M.J., Farndale,R.W., Luboshitz,J., and Kehrel,B.E. (2002): Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood*, 100:2472-2478.
- Leon,C., Alex,M., Klocke,A., Morgenstern,E., Moosbauer,C., Eckly,A., Spannagl,M., Gachet,C., and Engelmann,B. (2004): Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood*, 103:594-600.
- Ley,K. (1996): Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc.Res.*, 32:733-742.
- Lindemann,S., Tolley,N.D., Dixon,D.A., McIntyre,T.M., Prescott,S.M., Zimmerman,G.A., and Weyrich,A.S. (2001): Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J.Cell Biol.*, 154:485-490.

- Linhardt,R.J. and Gunay,N.S. (1999): Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin.Thromb.Hemost.*, 25 Suppl 3:5-16.
- Maillard,R., Petit,E., Chomel,B., Lacroux,C., Schelcher,F., Vayssier-Taussat,M., Haddad,N., and Boulouis,H.J. (2007): Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*. *Emerg.Inf.Dis.*, 13(9):1383-1385.
- Matsuzaki,K., Sugishita,K., Fujii,N., and Miyajima,K. (1995): Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34:3423-3429.
- Mattsson,C., Sarich,T.C., and Carlsson,S.C. (2005): Mechanism of action of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran. *Semin.Vasc.Med.*, 5:235-244.
- Meyers,K.M., Katz,J.B., Clemmons,R.M., Smith,J.B., and Holmsen,H. (1980): An evaluation of the arachidonate pathway of platelets from companion and food-producing animals, mink, and man. *Thromb.Res.*, 20:13-24.
- Meyers,K.M., Holmsen,H., and Seachord,C.L. (1982): Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am.J.Physiol*, 243:R454-R461.
- Michelson,A.D. (1994): Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole-blood through the use of the peptide GPRP and flow-cytometry-methods and clinical applications. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 5(1):121-131.
- Middleton,J.R., Fales,W.H., Luby,C.D., Oaks,J.L., Sanchez,S., Kinyon,J.M., Wu,C.C., Maddox,C.W., Welsh,R.D., and Hartmann,F. (2005): Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. *J.Clin.Microbiol.*, 43:2916-2919.
- Miller,M.W., Fox,P.R., and Saunders,A.B. (2004): Pathologic and clinical features of infectious endocarditis. *J.Vet.Card.*, 6(2):35-43.
- Mitola,S., Belleri,M., Urbinati,C., Coltrini,D., Sparatore,B., Pedrazzi,M., Melloni,E., and Presta,M. (2006): Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J.Immunol.*, 176:12-15.
- Miyashita,T. and Kuro,M. (1998): Evaluation of platelet function by Sonoclot analysis compared with other hemostatic variables in cardiac surgery. *Anesth.Analg.*, 87:1228-1233.
- Mondino,A. and Blasi,F. (2004): uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends in Immunol.*, 25:450-455.

- Monkovic,D.D. and Tracy,P.B. (1990): Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry*, 29:1118-1128.
- Monroe,D.M., Hoffman,M., and Roberts,H.R. (1996): Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 7:459-464.
- Morgenstern,E. (1999): Morphologie der Thrombozyten. In Müller-Berghaus,G., Pötzsch,B. Hämostaseologie, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1-14.
- Muta,T. and Iwanaga,S. (1996): The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.*, 8:41-47.
- Mutch,N.J., Robbie,L.A., and Booth,N.A. (2001): Human thrombi contain an abundance of active thrombin. *Thromb.Haemost.*, 86:1028-1034.
- Nakagawa,T., Hirakata,H., Sato,M., Nakamura,K., Hatano,Y., Nakamura,T., and Fukuda,K. (2002): Ketamine suppresses platelet aggregation possibly by suppressed inositol triphosphate formation and subsequent suppression of cytosolic calcium increase. *Anesthesiology*, 96:1147-1152.
- Narayanan,S. (1999): Multifunctional roles of thrombin. *Ann.Clin.Lab Sci.*, 29:275-280.
- Nelson,R.W. und Couto,C.G. (2006): Innere Medizin der Kleintiere. Verlag Urban & Fischer, Elsevier, München, Jena, 1.dt. Ausg., 153-158.
- Nguyen,T., Ghebrehiwet,B., and Peerschke,E.I. (2000): *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect.Immun.*, 68:2061-2068.
- Nieuwland,R., Berckmans,R.J., McGregor,S., Boing,A.N., Romijn,F.P., Westendorp,R.G., Hack,C.E., and Sturk,A. (2000): Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 95:930-935.
- Nilsson-Ekdahl,K. and Nilsson,B. (2001): Phosphorylation of C3 by a casein kinase released from activated human platelets increases opsonization of immune complexes and binding to complement receptor type 1. *Eur.J.Immunol.*, 31:1047-1054.
- Nishibori,M., Cham,B., McNicol,A., Shalev,A., Jain,N., and Gerrard,J.M. (1993): The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J.Clin.Invest*, 91:1775-1782.

- Offermanns,S. (2006): Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ.Res.*, 99:1293-1304.
- Oliver,J.A., Monroe,D.M., Roberts,H.R., and Hoffman,M. (1999): Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 19:170-177.
- Olson,S.T. and Bjork,I. (1991): Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects. *J.Biol.Chem.*, 266:6353-6364.
- Olson,M.E., Ceri,H., Morck,D.W., Buret,A.G., and Read,R.R. (2002): Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canad.J.Vet.Res.*, 66:86-92.
- Ostrovsky,L., King,A.J., Bond,S., Mitchell,D., Lorant,D.E., Zimmerman,G.A., Larsen,R., Niu,X.F., and Kubes,P. (1998): A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood*, 91:3028-3036.
- Pacchiarini,L., Tua,A., and Grignani,G. (1996): In vitro effect of reduced glutathione on platelet function. *Haematologica*, 81:497-502.
- Palma,M., Haggar,A., and Flock,J.I. (1999): Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J.Bacteriol.*, 181:2840-2845.
- Patti,J.M., Allen,B.L., McGavin,M.J., and Hook,M. (1994): MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu.Rev.Microbiol.*, 48:585-617.
- Peerschke,E.I., Murphy,T.K., and Ghebrehiwet,B. (2003): Activation-dependent surface expression of gC1qR/p33 on human blood platelets. *Thromb.Haemost.*, 89:331-339.
- Perkhofer,S., Kehrel,B.E., Dierich,M.P., Donnelly,J.P., Nussbaumer,W., Hofmann,J., von Eiff,C., and Lass-Flörl,C. (2008): Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms. *J.Infect.Dis.*, 198:1243-1246.
- Peschel,A., Otto,M., Jack,R.W., Kalbacher,H., Jung,G., and Gotz,F. (1999): Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J.Biol.Chem.*, 274:8405-8410.
- Peschel, A. (2002): How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*, 10 (4): 179-186.

- Peters, J.H. und Baumgarten,H. (1990): Monoklonale Antikörper. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Pinckard,R.N., Farr,R.S., and Hanahan,D.J. (1979): Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J.Immunol.*, 123:1847-1857.
- Pitchford,S.C., Momi,S., Giannini,S., Casali,L., Spina,D., Page,C.P., and Gresele,P. (2005): Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. *Blood*, 105:2074-2081.
- Plunkett,T.A., Smith,P., and Rubens,R.D. (2000): Risk of complications from bone metastases in breast cancer: Implications for management. *Eur.J.Cancer*, 36:476-482.
- Rao, G.H.R. (1999): Handbook of Platelet Physiology and Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/ London, S. 379-393.
- Rauterberg,J. and Kühn,K. (1968): The renaturation behaviour of modified collagen molecules. Hoppe Seylers Z. *Phys.Chem.*, 349:611-622.
- Rendu,F. and Brohard-Bohn,B. (2001): The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.*, 12:261-273.
- Rennemeier,C., Hammerschmidt,S., Niemann,S., Inamura,S., Zahringer,U., and Kehrel,B.E. (2007): Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan. *FASEB J.*, 21:3118-3132.
- Ruggeri,Z.M., Orje,J.N., Habermann,R., Federici,A.B., and Reininger,A.J. (2006): Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood*, 108:1903-1910.
- Sakai,M. and Watanuki,M. (1987): Inhibitory effect of gliotoxin on platelet aggregation – importance of disulfide structure. *Agric.Biol.Chem.*, 51(8):2167-2170.
- Sanderson,J. and Duncan,G. (1993): pCMPS-induced changes in lens membrane permeability and transparency. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 34:2518-2525.
- Schlueter,C., Weber,H., Meyer,B., Rogalla,P., Roser,K., Hauke,S., and Bullerdiek,J. (2005): Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am.J.Pathol.*, 166:1259-1263.

- Schmidt,B., Ho,L., and Hogg,P.J. (2006): Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry*, 45:7429-7433.
- Schmitz,T., Rothe,M., and Dodt,J. (1991): Mechanism of the inhibition of alpha-thrombin by hirudin-derived fragments hirudin(1-47) and hirudin(45-65). *Eur.J.Biochem.*, 195:251-256.
- Schneider,D., Liaw,L., Daniel,C., Athanasopoulos,A.N., Herrmann,M., Preissner,K.T., Nawroth,P.P., and Chavakis,T. (2007): Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 357:282-288.
- Schwartz,B.R. and Harlan,J.M. (1989): Neutrophil membrane sulfhydryl groups are involved in stimulated neutrophil adherence to endothelium. *J.Leukoc.Biol.*, 45:177-182.
- Shapira,S., Friedman,Z., Shapiro,H., Presseizen,K., Radnay,J., and Ellis,M.H. (2000): The effect of storage on the expression of platelet membrane phosphatidylserine and the subsequent impact on the coagulant function of stored platelets. *Transfusion*, 40:1257-1263.
- Sinha,B., Francois,P., Que,Y.A., Hussain,M., Heilmann,C., Moreillon,P., Lew,D., Krause,K.H., Peters,G., and Herrmann,M. (2000): Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect.Immun.*, 68:6871-6878.
- Sjoberg,U., Ringdahl,U., and Ruggeri,Z.M. (2002): Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood*, 100:4470-4477.
- Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goeke,N.M., Olson,B.J., and Klenk,D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.*, 150:76-85.
- Sobke,A.C., Selimovic,D., Orlova,V., Hassan,M., Chavakis,T., Athanasopoulos,A.N., Schubert,U., Hussain,M., Thiel,G., Preissner,K.T., and Herrmann,M. (2006): The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. *FASEB J.*, 20:2621-2623.
- Songer,J.G. and Post,K.W. (2005): The Genus *Staphylococcus*. In *Veterinary Microbiology: Bacterial and fungal agents of animal disease*. Elsevier-Saunders, St. Louis/ Missouri, 35-42.

- Spycher, M.O. and Nydegger, U.E. (1995): Participation of the blood platelet in immune reactions due to platelet-complement interaction. *Infusionsther. Transfusionsmed.*, 22:36-43.
- Stenberg, P.E., Shuman, M.A., Levine, S.P., and Bainton, D.F. (1984): Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J. Cell Biol.*, 98:748-760.
- Takahashi, O. (2000): Characteristics of rat platelets and relative contributions of platelets and blood coagulation to haemostasis. *Food Chem. Toxicol.*, 38:203-218.
- Tang, Y.Q., Yeaman, M.R., and Selsted, M.E. (2002): Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect. Immun.*, 70:6524-6533.
- Tristan, A., Benito, Y., Montserret, R., Boisset, S., Dusserre, E., Penin, F., Ruggiero, F., Etienne, J., Lortat-Jacob, H., Lina, G., Bowden, M.G., and Vandenesch, F. (2009): The signal peptide of *Staphylococcus aureus* panton valentine leukocidin LukS component mediates increased adhesion to heparan sulfates. *PLoS. One.*, 4:e5042
- Trogdon Hines, M., Heidel, J.R., and Barbee, D.D. (1993): Bacterial Endocarditis with thrombus formation and abscessation in a horse. *Vet. Rad. & Ultras.*, 34(1):47-51.
- Van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Horgan, K.J., and Shaw, S. (1990): The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J. Immunol.*, 144:4579-4586.
- Veltrop, M.H., Beekhuizen, H., and Thompson, J. (1999): Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells. *Infect. Immun.*, 67:6130-6138.
- von dem Borne, P.A., Bajzar, L., Meijers, J.C., Nesheim, M.E., and Bouma, B.N. (1997): Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J. Clin. Invest.*, 99:2323-2327.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., and Peters, G. (2001): Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 344:11-16.
- von Hundelshausen, P. and Weber, C. (2007): Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 100:27-40.
- Wachowicz, B., Olas, B., Zbikowska, H.M., and Buczynski, A. (2002): Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.*, 13:175-182.

- Wagner,D.D. and Hynes,R.O. (1979): Domain structure of fibronectin and its relation to function. Disulfides and sulfhydryl groups. *J.Biol.Chem.*, 254:6746-6754.
- Wall,M., Calvert,C.A., and Greene,C.E. (2002): Infective Endocarditis in dogs. *Comp. Small Anim. Exot.*, 24(8):614-625.
- Walther,D.J., Peter,J.U., Winter,S., Holtje,M., Paulmann,N., Grohmann,M., Vowinckel,J., Alamo-Bethencourt,V., Wilhelm,C.S., Ahnert-Hilger,G., and Bader,M. (2003): Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115:851-862.
- Waring,P. and Beaver,J. (1996): Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Gen.Pharmacol.*, 27:1311-1316.
- Weiss,D.J., Monreal,L., Angles,A.M., and Monasterio,J. (1996): Evaluation of thrombin-antithrombin complexes and fibrin fragment D in carbohydrate-induced acute laminitis. *Res.Vet.Sci.*, 61:157-159.
- Weiss,D.J. (1999): Comparative physiology of platelets from different species. In Rao,G.H.R. Handbook of platelet physiology and pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 379-393.
- White,C.M. (2005): Thrombin-directed inhibitors: pharmacology and clinical use. *Am.Heart J.*, 149:S54-S60
- Wiechelmann,K.J., Braun,R.D., and Fitzpatrick,J.D. (1988): Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay - identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 231-237.
- Xia,Z., Wong,T., Liu,Q., Kasirer-Friede,A., Brown,E., and Frojmovic,M.M. (1996): Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br.J.Haematol.*, 93:204-214.
- Xie,C., Alcaide,P., Geisbrecht,B.V., Schneider,D., Herrmann,M., Preissner,K.T., Lusinskas,F.W., and Chavakis,T. (2006): Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *J.Exp.Med.*, 203:985-994.
- Xiong,Y.Q., Bayer,A.S., and Yeaman,M.R. (2002): Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in *Staphylococcus aureus* by thrombin-induced platelet microbicidal proteins. *J.Infect.Dis.*, 185:348-356.

- Yanaga,F., Asselin,J., Schieven,G.L., and Watson,S.P. (1995): Phenylarsine oxide inhibits tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 2 in human platelets and phospholipase C gamma 1 in NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.*, 368:377-380.
- Yeaman,M.R., Bayer,A.S., Koo,S.P., Foss,W., and Sullam,P.M. (1998): Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J.Clin.Invest*, 101:178-187.
- Youssefian,T., Drouin,A., Masse,J.M., Guichard,J., and Cramer,E.M. (2002): Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*, 99:4021-4029.
- Zarbock,A., Singbartl,K., and Ley,K. (2006): Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J.Clin.Invest*, 116:3211-3219.
- Zasloff,M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.
- Zhang,J.Z. and Redman,C.M. (1994): Role of interchain disulfide bonds on the assembly and secretion of human fibrinogen. *J.Biol.Chem.*, 269:652-658.
- Zimmermann,G.A., Mc Intyre,T.M., Prescott,S.M., and Stafforini,D.M. (2002): The platelet-activating-factor signalling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit.Care Med.*, 30 (5) (Suppl.): 294-301.

X. Anhang

X.1 Publikationen

X.1.1 Veröffentlichte Abstracts

- Niemann,S., Hussain,M., Pohl,S., Schifferdecker,T., Schulte,A., Bertling,A., Heilmann,C., and Kehrel,B.E. (2009):
The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* activates platelets via the ATP-gated P2X1 cation channel and Fcγ₃RIIA.
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 7:326.

Das Abstract wurde als Poster auf dem internationalen Kongress der „International Society on Thrombosis and Haemostasis“ im Juli 2009 in Boston, USA, präsentiert.

- Bertling,A., Niemann,S., Hussain,M., Brodde,M.F., Pohl,S., Schifferdecker,T., Roth,J., Jurk,K., Schulte,A., Stürzel,C., Peters,G., Heilmann,C., and Kehrel,B.E. (2010):
Activation of platelets by secreted proteins from Gram positive bacteria.
Platelets, 21 (5), 396.

Das Abstract wurde als Poster auf dem „12th UK Meeting on Platelets“ in Nottingham präsentiert und mit dem 1. Posterpreis ausgezeichnet.

X.1.2 Manuskript in Bearbeitung

Bertling,A., Niemann,S., Hussain,M., Brodde,M.F., Pohl,S., Schifferdecker,T., Roth,J., Jurk,K., Müller,A., Peters,G., Heilmann,C., and Kehrel,B.E.
Staphylococcal extracellular adherence protein (Eap) induces platelet adhesion, agglutination, aggregation and procoagulant activity

X.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Roth vom Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Gießen, danke ich ganz herzlich für die Betreuung im Fachbereich der Veterinärmedizin, für seine Unterstützung und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Beate Kehrel aus der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, für ihre intensive Betreuung bei der Erarbeitung des interessanten Themas, für die stets engagierten und hilfreichen Diskussionen und für ihren Beistand bei allen Problemen.

Ich danke Dr. rer. nat. Muzaffar Hussain für die Aufreinigung und großzügige Bereitstellung des Staphylokokkenproteins Eap, mit dessen Gebrauch ich in meinen Versuchen viele interessante Ergebnisse produzieren konnte.

Ich danke allen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe der Experimentellen und Klinischen Hämostaseologie für die nette Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima, die bereitwillige Hilfe bei Problemen und Fragen und natürlich für die vielen Blutspenden, die zur Erstellung dieser Arbeit notwendig waren. Hierfür danke ich insbesondere Dr. rer. nat. Kerstin Jurk, Dr. rer. nat. Silke Niemann, Dr. rer. nat. Martin Brodde, Anne Bertling, Anja Müller, Herrn Dr. Wigger, Herrn Prof. Dr. med. Martin Westphal und Mitarbeitern, Herrn Prof. Dr. med. Jörg Haier und Mitarbeitern.

Meinen Eltern möchte ich einen ganz besonderen Dank aussprechen. Schließlich wäre diese Arbeit nicht entstanden, wenn sie nicht jederzeit mit so großer Unterstützung hinter mir gestanden hätten. Allen meinen Freunden gilt mein herzlicher Dank für ihre ermunternden Worte, und dass sie immer Zeit hatten für ein Gespräch. Für die grammatikalische Korrektur dieser Arbeit möchte ich ganz besonders Andrea und Sophie danken.

X.3 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Silke Pohl



 *edition wissenschaft*
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5759-6



9 783835 193759 6

Foto: Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen