

Aus der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie,
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der
Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Interaktion von Staphylokokken mit Thrombozyten
in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen:
Zell- und molekularbiologische Untersuchungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Nicola Spehr

Gießen 2001

Aus der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie,
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Betreuer: PD Dr. rer. nat. Beate Kehrel

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der
Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

**Interaktion von Staphylokokken mit Thrombozyten
in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen:
Zell- und molekularbiologische Untersuchungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Nicola Spehr
Tierärztin aus Frankfurt a. M.

Gießen 2001

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. B. Kehrel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Pathomechanismus <i>Staphylococcus aureus</i> - induzierter endovaskulärer Infektionen	3
2.2	Thrombozyten	6
2.2.1	Morphologie der Thrombozyten	6
2.2.2	Funktion der Thrombozyten	8
2.3	Adhäsionsproteine	9
2.3.1	von Willebrand Faktor	9
2.3.2	Fibrinogen	10
2.3.3	Thrombospondin - 1 (TSP - 1)	12
2.4	Staphylokokken-Adhäsine	12
2.4.1	Fibrinogen - bindendes Protein („clumping factor“)	13
2.4.2	Koagulase	14
2.4.3	Protein A	15
2.4.4	Map	15
2.4.5	Adhäsine für weitere Matrixproteine	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Geräte	17
3.2	Chemikalien	18
3.3	Antikörper	18
3.4	Bakterienstämme	19
3.4.1	Standard - Laborstämme	19
3.4.2	Mutanten	20
3.5	Anzucht der Bakterien	20
3.6	Keimzahlbestimmung	21
3.7	Gewinnung und Aufreinigung von Thrombozyten	21
3.7.1	Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP)	22
3.7.2	Aufreinigung von Thrombozyten mittels Gelfiltration	22
3.7.3	Bestimmung der Thrombozytenkonzentration	23

3.8	Durchflußzytometrie	23
3.8.1	Probenvorbereitung für Untersuchungen der Thrombozyten - <i>Staphylococcus aureus</i> - Assoziation	25
3.8.1.1	Präparation der Thrombozyten	25
3.8.1.2	Präparation der Bakterien	26
3.8.2	Koinkubation von Thrombozyten und <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.8.3	Auswertung der Assoziate im Durchflußzytometer	26
3.8.4	Einsatz der Thrombin - induzierten Thrombozytenaktivierung im Assoziationsversuch und im Fibrinogenbindungsassay	27
3.8.5	Einsatz der Ristocetin A - induzierten Thrombozytenaktivierung im Assoziationsversuch und im von Willebrand Faktor - Bindungsassay	28
3.8.6	Einsatz von die Thrombozyten - <i>Staphylococcus aureus</i> - Assoziation beeinflussenden Substanzen	28
3.8.6.1	RGDS	28
3.8.6.2	„fibrinogen - binding inhibitor peptide“ (H-His-His-Leu- Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-OH)	28
3.8.6.3	Antikörper	29
3.8.6.4	Sialyl - Lewis - X	29
3.8.6.5	Beriate	29
3.8.6.6	Thrombospondin - 1	29
3.8.6.7	Einsatz der Adhäsionsproteine Fibrinogen, von Wille- brand Faktor, Fibronectin, Vitronectin und Thrombo- spondin -1	30
3.8.7	Bindung von von Willebrand Faktor und Fibrinogen an Bakterien	30
3.8.8	Untersuchung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.8.9	Untersuchung zum Einfluß des Fc-Rezeptors auf die <i>Staphylo- coccus aureus</i> - induzierte Aktivierung der Thrombozyten	32
3.9	Markierung von Fibrinogen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	32
3.10	Reinigung und FITC - Markierung des von Willebrand Faktors.....	33
3.10.1	Reinigung des von Willebrand Faktors	33
3.10.2	Markierung des von Willebrand Faktors mit FITC	34
3.11	Herstellung von F(ab`) ₂ - Fragmenten	35
3.12	SDS - Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS - Page)	36
3.13	Silberfärbung	38

3.14 Adhäsionsassay an Polymeroberflächen	39
3.14.1 Radioaktivmarkierung der Bakterienzellen.....	39
3.14.2 Bindung der Thrombozyten an PMMA - Scheibchen („coverslips“)	40
3.14.3 Koinkubation von Thrombozyten und Bakterien	41
3.15 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
3.16 Aufreinigung chromosomaler DNA aus Vollblut	43
3.17 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	43
3.18 Agarosegelelektrophorese	45
3.19 Statistik	46
4 Ergebnisse	47
4.1 Durchflußzytometrische Bestimmung der Thrombozyten - <i>Staphylo-</i> <i>coccus aureus</i> - Assoziante	47
4.1.1 Bakterienmarkierung mit dem Nukleinsäurefarbstoff Syto13..	48
4.1.2 Thrombozytenmarkierung mittels Phycoerythrin-markierter Antikörper	48
4.1.3 Bestimmung des Thrombozyten - <i>Staphylococcus aureus</i> - Verhältnisses	49
4.1.4 Einfluß der Koinkubationsdauer auf die Assoziation	51
4.1.5 Einfluß der Bakterienwachstumsphase auf die Assoziation	52
4.2 Einfluß des Thrombozytenaktivierungszustandes auf die Assoziation	53
4.3 Einfluß von Plasmaproteinen auf die Assoziation	54
4.3.1 Untersuchung von Thrombozyten im PRP und nach Gelfiltration..	54
4.3.2 Einfluß einzelner Adhäsionsproteine auf die Assoziatbildung	54
4.3.3 Fibrinogen als Brückenbildner	56
4.3.3.1 Fibrinogenbindung an Thrombozyten	56
4.3.3.2 Fibrinogenbindung an Bakterien	57
4.3.3.3 Inhibierung der Fibrinogenbindung an Thrombozyten - Einfluß auf die Assoziation	58
4.3.3.3.1 Einsatz des RGDS - Peptids	59
4.3.3.3.2 Einsatz des „fibrinogen - binding inhibitor peptides“	59
4.3.3.4 Untersuchung von Fibrinogenbindungsadhäsinen auf <i>Staphylococcus aureus</i>	60
4.3.3.4.1 Protein A	60

4.3.3.4.1.1	Untersuchungen an Protein - A - Deletionsmutanten.....	61
4.3.3.4.1.2	Einsatz eines anti - Protein - A - Antikörpers	62
4.3.3.4.2	Untersuchungen an Map - Deletionsmutanten ..	63
4.3.3.4.3	Untersuchungen an „clumping factor” - und Koagulase - Deletionsmutanten	65
4.3.4	von Willebrand Faktor als Brückenbildner	67
4.3.4.1	von Willebrand Faktor - Bindung an Thrombozyten	67
4.3.4.2	von Willebrand Faktor - Bindung an Bakterien	68
4.3.4.3	Inhibierung der von Willebrand Faktor - Bindung an Thrombozyten durch Antikörper : Einfluß auf die Assoziation	69
4.3.4.4	Protein A - ein Oberflächenadhäsion für die Bindung des von Willebrand Faktors an <i>Staphylococcus aureus</i>	71
4.3.4.4.1	Untersuchungen an Protein - A - Deletions- mutanten	71
4.3.4.4.2	Einsatz eines anti - Protein - A - Antikörpers	72
4.4	Rolle der Thrombozytenproteine für die <i>Staphylococcus aureus</i> - Thrombozyten - Assoziation	73
4.4.1	Assoziation zwischen <i>Staphylococcus aureus</i> und Thrombozyten mit Speicherfunktionsstörungen der Granula	73
4.4.1.1	“ α -, δ - storage pool disease”	74
4.4.1.2	“Gray - platelet - syndrome”	75
4.4.2	Rolle von P - Selektin (CD62) für die Assoziation	75
4.4.2.1	Inhibierung von P - Selektin mittels Sialyl - Lewis - X	76
4.4.2.2	Untersuchungen an P - Selektin - knockout - Mäusen	76
4.4.3	Assoziation zwischen <i>Staphylococcus aureus</i> und CD36 - defizienten Plättchen	77
4.4.4	Assoziation zwischen <i>Staphylococcus aureus</i> und GPIIb/IIIa - defizienten Plättchen	78
4.4.5	Assoziation zwischen <i>Staphylococcus aureus</i> und Thrombozyten von Knockout - Mäusen der Fc γ - Kette.....	79
4.4.6	Rolle des von Willebrand Faktors für die Assoziation	81
4.4.7	Rolle des Gerinnungsfaktors VIII für die Assoziation	82

4.4.8 Rolle von Thrombospondin - 1 (TSP - 1) für die Assoziation	84
4.5 Untersuchungen zur Aktivierung von Thrombozyten durch <i>Staphylococcus aureus</i>	85
4.5.1 Expression von CD62 auf Thrombozyten durch Interaktion mit <i>Staphylococcus aureus</i>	85
4.5.2 Interindividuelle Thrombozytenaktivierung	86
4.5.3 Rolle des FcRIIA - Rezeptors für die Aktivierung	87
4.5.3.1 Hemmung der Aktivierung durch Einsatz eines anti - FcRIIA - Antikörpers (Klon IV.3 - Fab)	87
4.5.3.2 Rolle des FcRIIA - Genpolymorphismus	88
4.5.4 Aktivierung von GPIIb/IIIa - defizienten Thrombozyten durch <i>Staphylococcus aureus</i>	91
4.5.5 Aktivierung von Thrombozyten eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 durch <i>Staphylococcus aureus</i>	91
5 Diskussion	93
5.1 Untersuchung der Thrombozyten - <i>Staphylococcus aureus</i> - Assoziation	93
5.2 Thrombozytenaktivierung	95
5.3 Plasmaproteine	95
5.3.1 Fibrinogen	96
5.3.2 von Willebrand Faktor	100
5.4 Bedeutung der Thrombozytenproteine	105
5.5 Aktivierung von Thrombozyten durch <i>Staphylococcus aureus</i>	108
6 Zusammenfassung	113
7 Summary	117
8 Ausblick	121
9 Literaturverzeichnis	123

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
ACD	Acid-Citrat-Dextrose
A. dest.	Aqua destillata
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
cfu	Kolonie bildende Einheit (colony forming unit)
ClfA bzw. ClfB	„clumping factor“ A bzw. B
CRP	C-reaktives Protein
DTE	Dithioerythritol
E. coli	Escherichia coli
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter)
BHI-Medium	Heart-Brain-Infusion, Herz-Hirn-Bouillon
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GP	Glykoprotein
GPRP	Glycin-Prolin-Arginin-Prolin
HSA	humanes Serumalbumin
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
I.E.	internationale Einheit
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDA	Kilo-Dalton
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

log	logarithmisch
mA	Milliampere
Map	MHC-Klasse II-analoge Protein
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl der durchgeführten Messungen
NCTC	National Collection of Type Culture
NEM	N-Ethylmaleinimid
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PRP	plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
r. E.	relative Einheiten
RGDS	Glycin-Arginin-Glycin-Asparagin-Serin-Prolin
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.D.	Standardabweichung
sec	Sekunden
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TSP-1	Thrombospondin-1
Tz	Thrombozyten
U/ml	Unit/Milliliter
μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

Bakterielle endovaskuläre Infektionen wie die Endokarditis, die suppurative Thrombophlebitis und polymerassozierte Infektionen stellen aufgrund der resultierenden Bakteriämie, Sepsis und metastatischer Erregerabsiedlung eine schwerwiegende Verlaufsform bakterieller Infektionen dar. Seine Fähigkeit zur schnellen Adhäsion an Gewebe und Fremdoberflächen, zur Gewebepenetration und schließlich der Fähigkeit zur Inaktivierung von Wirtsabwehrmechanismen weisen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) als hochpathogenen Erreger aus. Die Kolonisation endothelialen Gewebes durch *S. aureus* ist ein multifaktorieller Vorgang, bei dem bakterielle Faktoren, Endothelfaktoren, Plättchen und Plasmabestandteile in konzertierter Weise interagieren. Tierexperimentelle Studien konnten die besondere Bedeutung von Thrombozyten in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen nachweisen (Sullam et al, 1996).

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Adhäsionsmechanismus von Staphylokokken an Thrombozyten und die Identifizierung der für die Interaktion relevanten Rezeptoren auf Seiten der Thrombozyten und der Staphylokokken. Desweiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob und welche Plasmabestandteile als „Brückenmoleküle“ fungieren könnten und welche Rezeptoren auf thrombozytärer und bakterieller Seite für dessen Bindung relevant sind.

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen Thrombozyten und Staphylokokken in Suspension stellt die Durchflußzytometrie eine sensible Methode dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Markierungsverfahren entwickelt werden, welches es erlaubt, Thrombozyten- und Bakterienpopulation in einem Durchflußzytometer mit nur einem Anregungslaser getrennt voneinander darstellen zu können und die quantitative Erfassung von Plättchen-Bakterien-Assoziaten möglich zu machen.

Nach Aktivierung kommt es bei Thrombozyten zu ausgeprägten Veränderungen. So kommt es zur Formveränderung, zur Ausschüttung der Granulainhaltsstoffe, zur Präsentation aktivierungsabhängiger Glykoproteine und zur Aktivierung von Glykoproteinen mit der Folge der erhöhten Bindungsfähigkeit für Plasmaproteine. Eine Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Untersuchung, inwieweit diese Veränderungen die Adhäsion von *S. aureus* an die Plättchen beeinflußt und ob die Anwesenheit von Plasmaproteinen dabei von Bedeutung ist. Desweiteren sollte die Charakterisierung dieser Plasmaproteine erfolgen.

Neben der Bindung über Plasmaproteine konnte jedoch auch eine direkte Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten nachgewiesen werden (Yeaman et al, 1992). Anhand von Plättchen, denen ganze Granula, einzelne Granulainhaltsstoffe oder einzelne Glykoproteine bzw. Rezeptoren fehlen, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, welche Bestandteile oder Oberflächenstrukturen der Plättchen für die Anbindung von *S. aureus* eine Rolle spielen.

S. aureus besitzt neben der Fähigkeit an adhärierte Thrombozyten zu binden, auch die Möglichkeit, an im Blut freischwimmende Thrombozyten zu binden und diese zu aktivieren (Rusovick und Johnson, 1991). Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, den Mechanismus, über den die Plättchen durch *S. aureus* aktiviert werden näher zu betrachten und dessen Relevanz für die Auslösung endovaskulärer Infektionen zu untersuchen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von *S. aureus*-Adhäsinen für die Bindung spezifischer Plasmaproteine zu untersuchen. Es ist seit langem bekannt, daß *S. aureus* in der Lage ist, Fibrinogen zu binden. Anhand von Westernblots und Adhäsionsassays konnten unterschiedliche fibrinogenbindende Adhäsine auf *S. aureus* identifiziert werden (McDevitt et al, 1994; Ni Ehin et al, 1998; Boden und Flock, 1989; McGavin et al, 1993). Mit Hilfe der Durchflußzytometrie sollte unter Verwendung von spezifischen Deletionsmutanten untersucht werden, inwieweit die einzelnen *S. aureus*-Adhäsine für die Fibrinogenbindung in Suspension von Bedeutung sind.

Ein weiteres, an *S. aureus* bindendes Plasmaprotein ist der von Willebrand Faktor (Herrmann et al, 1997). Voruntersuchungen lassen Protein A, ein zellwand-assoziiertes Protein von *S. aureus*, als Adhäsine für von Willebrand Faktor vermuten. In dieser Arbeit sollte Protein A als Bindungsadhäsine für von Willebrand Faktor weiter verifiziert werden.

2 Schrifttum

2.1 Pathomechanismus *Staphylococcus aureus* - induzierter endovaskulärer Infektionen

Staphylococcus aureus ist ein bei Mensch, Säugetier und Vögeln vorkommender Kommensale der Haut und Schleimhäute. Als fakultativ pathogener Keim ist er an einer Vielzahl von Krankheitsbildern wie z. B. Dermatitis, Synovitis, Mastitis, Bakteriämie und Sepsis beteiligt (Rolle/Mayr, 1993). Von bedeutender klinischer Relevanz ist jedoch seine Fähigkeit zur Auslösung endovaskulärer Infektionen, d. h. zur lokalen Besiedlung von Gefäßendothel bzw. Endokard mit der Folge von Bakteriämie, Sepsis und metastatischer Infektion. Beispiele solcher Infektionen sind die Endokarditis, die suppurative Thrombophlebitis, aber auch polymer-assoziierte Infektionen. Untersuchungen in der Humanmedizin ergaben, daß *S. aureus* mit 15-20 % nach den Streptokokken der zweithäufigste Erreger von Nativklappenendokarditiden ist (Riecker, 1993).

Untersuchungen zur Pathogenese endovaskulärer Infektionen haben ergeben, daß Bakterien nur begrenzt in der Lage sind, an ungeschädigtes Endothel zu adhären. So geht einer bakteriell-endovaskulären Infektion meist ein durch unterschiedliche Noxen ausgelöster Endothelschaden voraus. Ursache dieses Schadens können z. B. durch Herzklappenfehler ausgelöste Unregelmäßigkeiten im Blutfluß, aber auch zirkulierende Immunkomplexe oder Streß sein. Dies führt zur Bildung einer nichtbakteriellen thrombotischen Vegetation mit Exposition subendothelialen Gewebes, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten sowie lokaler Fibrinpolymerisierung. Das so vorbereitete Gewebe ermöglicht nun die Adhärenz von im Blut zirkulierenden Bakterien. Dies führt zur weiteren Bindung von Plättchen und schließlich zu Bildung einer Vegetation (Sullam et al, 1985; Karchmer, 1997).

S. aureus verfügt über eine Anzahl von Adhäsinen (siehe Kapitel 2.4), über welche die Keime an Proteine der subendothelialen Matrix (Kollagen, Fibrinogen, etc.) binden können. Eine besondere Rolle in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen kommt jedoch den Thrombozyten zu. Tierexperimentelle Studien an Kaninchen konnten zeigen, daß die Adhäsion von *S. aureus* an Thrombozyten entscheidend für die Entstehung einer Endokarditis ist (Sullam et al, 1996). Vorangegangene Untersuchungen zeigen hierbei eine direkte Bindung von *S. aureus*

an die Plättchen (Yeaman et al, 1992), aber auch die Möglichkeit der Bindung über Brückenmoleküle wie Fibrinogen (Herrmann et al, 1993). Neben der Fähigkeit an Thrombozyten zu adhären, ist *S. aureus* jedoch auch in der Lage die Aggregation der Thrombozyten zu induzieren (Bayer et al, 1995). Untersuchungen an *Streptococcus sanguis* konnten zeigen, daß diese Fähigkeit zur weiteren Vergrößerung der entstehenden Vegetation und somit zur erhöhten Pathogenität führt (Herzberg et al, 1992; Greaves et al, 1993).

Abschließend besteht die am Endothel entstehende Vegetation aus sich abwechselnden Schichten von Plättchen und Fibrin, zwischen denen dichte Bakterienkolonien liegen (Abb.2-1).

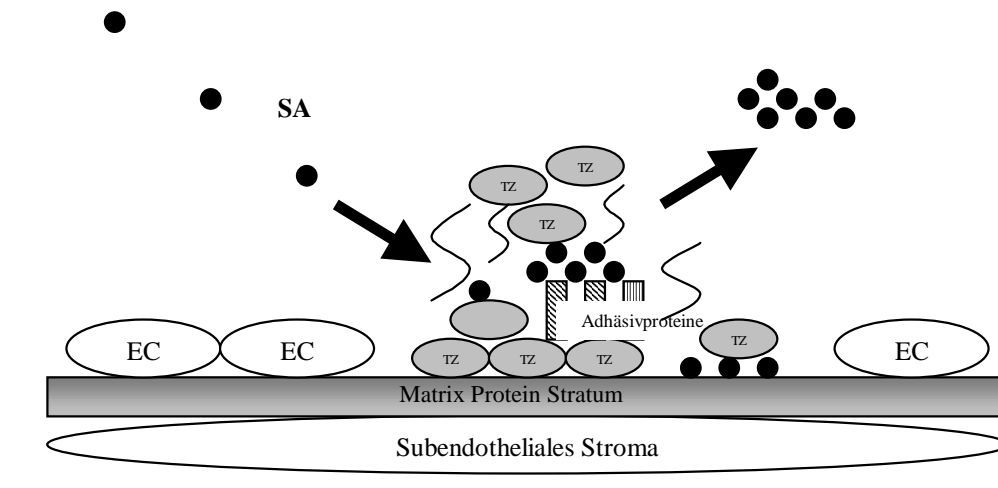


Abb. 2-1: Endovaskuläre Kolonisation nach Endothelzellschädigung (Modell). Nach Endothelzell(EC)-Schädigung werden Thrombozyten (TZ) gebunden, aktiviert und exprimieren aktivierte Rezeptorproteine für adhäsive Thrombozytenmoleküle wie Fibrinogen (FG), Fibronectin, Thrombospondin und von Willebrand Faktor. *S. aureus* (SA) interagiert entweder mit den Thrombozyten direkt, via Brückenmoleküle, oder direkt mit der subendothelialen Matrix. Die Zeichnung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. M. Herrmann, Medizinische Mikrobiologie, Münster.

Neben der Förderung des Pathogeneseverlaufs endovaskulärer Infektionen sind Thrombozyten jedoch gleichzeitig in der Wirtsabwehr involviert (Zusammenfassung in Yeaman, 1997). Dabei spielt vor allem die Freisetzung antimikrobieller Peptide („platelet microbicidal proteins“, PMP's) nach Thrombozytenaktivierung eine Rolle. Die Wirkung der PMP's beruht neben der Zerstörung der Zellmembran über einen u. a. von der Membranspannung abhängigen Mechanismus (Koo et al, 1996) auch auf der Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation und der Verstärkung der antimikrobiellen Wirkung unterschiedlicher Antibiotika-

gruppen (Yeaman et al, 1992a). Tierexperimentell konnte im Kaninchenmodell gezeigt werden, daß PMP-resistente Stämme im Vergleich mit PMP-sensitiven Stämmen eine deutlich höhere Virulenz aufweisen (Dhawan et al, 1997).

Neben dem oben beschriebenen Plättchen/Matrixprotein-abhängigen Mechanismus ist *S. aureus* jedoch auch in der Lage endovaskuläre Infektionen Plättchen/Matrixprotein-unabhängig auszulösen. Dabei bindet *S. aureus* zunächst direkt über Adhäsionsproteine (Tompkins et al, 1992; Tompkins et al, 1990) oder indirekt über Brückenmoleküle wie Fibrinogen (Cheung et al, 1991) an die Endothelzellen, von denen es im weiteren Verlauf phagozytiert werden kann (Hamill et al, 1986). Die Freisetzung von Toxinen, vor allem α -Toxin, dieser Bakterien führt zur Lyse der Endothelzellen und, neben der Freisetzung weiterer stoffwechselaktiver Substanzen, zur Freisetzung des Endothel-Gewebefaktors („tissue-factor“, TF). Ebenfalls durch die Staphylokokkenphagozytose ausgelöst kommt es zur Bindung und Aktivierung von Monozyten, welche ebenfalls „tissue factor“ freisetzen (Beekhuizen et al, 1997; Bancsi et al, 1996). Dieser führt über die Aktivierung des exogenen Gerinnungssystems zu einer erhöhten koagulatorischen Aktivität und damit zu einer verstärkten Thrombozytenadhäsion und -aktivierung im Bereich der sich ausbildenden Vegetation (Ing et al, 1997). An diese können sich nun, wie oben beschrieben, weitere Bakterien ansetzen (Abb. 2-2/A).

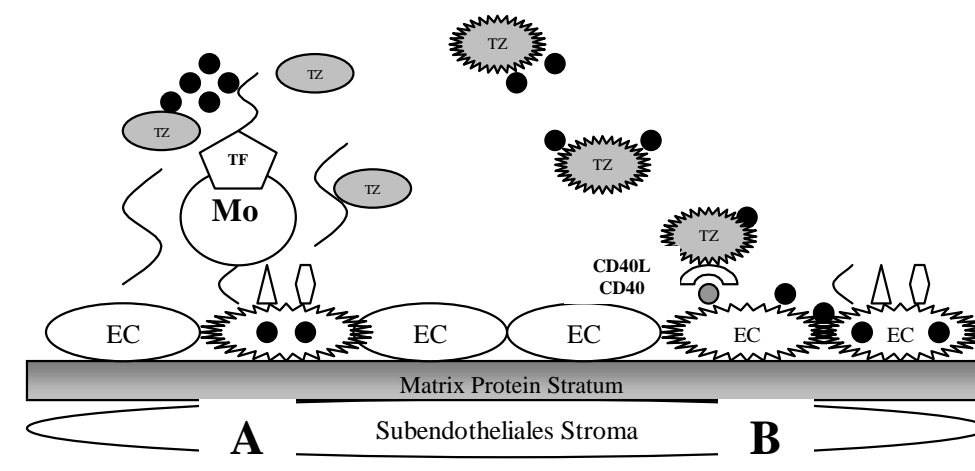


Abb 2-2: Thrombozyten-Endothel-*S. aureus* Interaktion bei intaktem Endothel (Modell). Nach Aufnahme von *S. aureus* durch EC (A) und EC-Aktivierung erfolgt Expression von EC-Rezeptorproteinen, Adhäsion von Monozyten und ‚tissue factor‘-Expression mit lokaler prokoagulanter Aktivität und weiterer SA-Adhäsion. Alternativ (B) kommt es durch SA-TZ-Komplexe zu CD40L-vermittelter EC-Aktivierung und nachfolgender TF-Aktivierung. Die Zeichnung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. M. Herrmann, Medizinische Mikrobiologie, Münster.

Thrombozyten können jedoch noch über einen weiteren Weg zur Entstehung einer endovaskulären Infektion beitragen. CD40 Ligand (CD40L) ist ein unter anderem auf T-Zellen vorkommendes Protein, dessen Interaktion mit dem auf B-Zellen vorkommenden CD40 für die Entwicklung und Funktion der humoralen Abwehr von Bedeutung ist. Neben B-Zellen ist CD40 auch auf Endothelzellen nachweisbar. Im Rahmen einer Bakteriämie kommt es neben der Adhäsion von Bakterien an Endothelzellen und adhärierte Thrombozyten auch zur Bildung von Thrombozyten-*S. aureus*-Aggregaten im Blutstrom (Rusovick und Johnson, 1991). Die in diesem Rahmen auftretende Thrombozytenaktivierung führt zur Expression von CD40L auf der Thrombozytenoberfläche, welches nun mit dem auf Endothelzellen vorkommenden CD40 interagieren kann und zur Aktivierung der Endothelzellen führt. Dadurch wird eine inflammatorische Endothelreaktion ausgelöst, welche über den oben beschriebenen Mechanismus zur Entwicklung einer lokalen Infektion beiträgt (Henn et al, 1998; Abb. 2-2/B).

2.2 Thrombozyten

2.2.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten (Tz), auch Blutplättchen genannt, sind kernlose Zellen, welche durch Abschnürung von Megakaryozyten aus dem Knochenmark entstehen (Dodds und Kaneko, 1989). In unaktiviertem Zustand zeigen sie eine diskoide Form und weisen sowohl in Zahl als auch Größe erhebliche tierartige Unterschiede auf. Während Menschen 140.000-360.000 Thrombozyten/ μl besitzen, variiert die Anzahl im Tierreich zwischen 200.000 Tz/ μl beim Pferd bis zu 600.000 Tz/ μl beim Rind. Das größte Plättchenvolumen besitzt die Katze mit $12,2 \mu\text{m}^3$. Mittleres Volumen weisen Schwein und Hund auf (6,9 bis $7,7 \mu\text{m}^3$) und eher kleine Plättchen besitzen Mensch, Pferd und Rind mit einem Volumen von 4,4 bis $5,8 \mu\text{m}^3$ (Dodds, 1978, Meyers, 1986).

Die aus einer Lipid-Doppelschicht bestehende Thrombozytenmembran ist mit einer Glykokalix überzogen, in welche die Glykoproteine integriert sind. Diese variieren je nach Tierart in ihrer Anzahl. So fehlt Katzen das für die von Willebrand Faktor-Adhäsion wichtige Glykoprotein Ib. Einstülpungen der Plasmamembran in das Plättcheninnere bilden das offene Kanalsystem, welches bei Aktivierung der Plättchen zur Pseudopodienbildung nach außen gestülpt wird (Morgenstern, 1998). Thrombozyten von Wiederkäuern fehlt dieses System (siehe Abb. 2-3). Neben dem offenen Kanalsystem, besitzen Plättchen noch ein geschlossenes Kanalsystem. Das Zytoplasma enthält neben das den Wiederkäuern fehlenden

Mikrotubulsystem noch Mikrofilamente, Mitochondrien, Lysosomen und Speichergranula. Die Speichergranula unterteilt man in dichte Körperchen („dense bodies“), welche hauptsächlich ADP, Serotonin und Kalzium enthalten und die α -Granula. In diesen befinden sich Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, von Willebrand Faktor und Thrombospondin, desweiteren Zytokine und Wachstumsfaktoren.

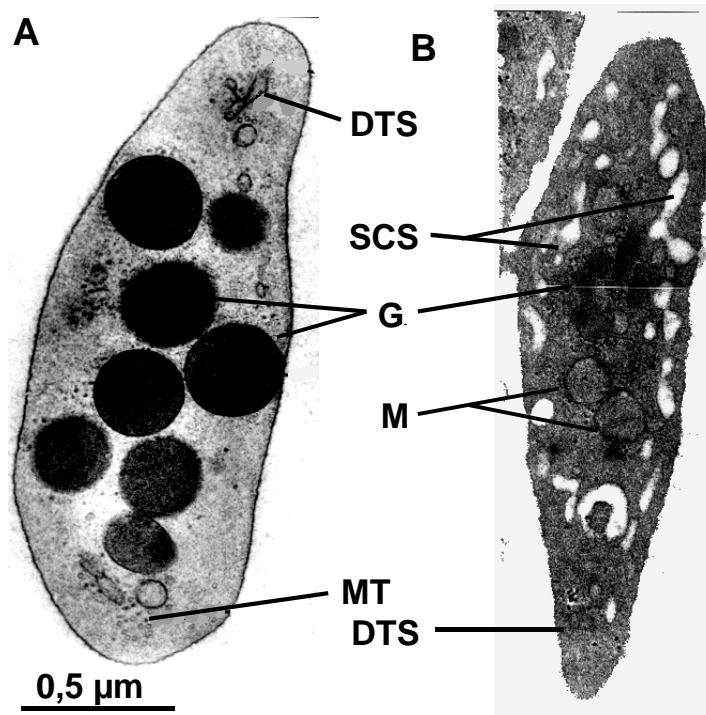


Abb. 2-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme ruhender Thrombozyten eines Rindes (A) und einer Hauskatze (B). Thrombozyten von Wiederkäuern besitzen vergleichsweise große α -Granula, ihnen fehlt jedoch das offene Kanalsystem. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. E. Morgenstern, Homburg/Saar.

DTS: dichtes tubuläres System
SCS: offenes kanikuläres System
G: α -Granula
M: Mitochondrien
MT: Mikrotubuli

Für die Pathogenese thrombozytenassoziierter Infektionen ist vor allem die extrem unterschiedliche Reaktionsfähigkeit der Zellen von Bedeutung. So bilden Thrombozyten von Wiederkäuern zwar Pseudopodien aus, es fehlt jedoch die nach Aktivierung der Zellen übliche Plättchenausbreitung. Daneben zeigen die Plättchen eine reduzierte Adhäsion an Subendothel und lassen sich durch Agonisten nur schwer aggregieren. Im Gegensatz hierzu zeigen Katzenplättchen eine sofortige Reaktion auf Agonisten wie ADP oder Thrombin und selbst bei Einsatz von Antikoagulantien wie Citrat sind Spontanaggregationen zu beobachten. Auch Pferdethrombozyten zeigen sich in vivo als hochreaktiv und thromboembolische Erkrankungen sind, im Gegensatz zum Wiederkäuer, häufig zu beobachten (Weiss, 1999).

2.2.2 Funktion der Thrombozyten

Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, ist neben der direkten Bindung von *S. aureus* an geschädigtes Endothel die Anheftung an Thrombozyten ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung endovaskulärer Infektionen. Thrombozyten lagern sich im Rahmen von Hämostasevorgängen an geschädigtes Endothel oder Subendothel an, um einen Verschlusspfropf zu bilden. Dieser Vorgang beinhaltet die drei Schritte der Plättchenadhäsion, -aktivierung, und -aggregation.

Die Adhäsion wird über die Interaktion spezifischer Plättchenglykoproteine mit der subendothelialen Matrix vermittelt. Die Blutplättchen binden dabei an Proteine wie z.B. Kollagen, Fibronectin oder Laminin. Wichtig bei geringen Scherkräften ist auch die Bindung an auf dem freigelegten Subendothel immobilisierten Fibrinogen über das Plättchenglykoprotein IIb/IIIa (siehe Kapitel 2.3.2). Unter hohen Scherkräften, wie sie in kleineren Gefäßen und Kapillaren entstehen, kann die Bindung jedoch lediglich über den von Willebrand Faktor (vWF) geschehen (siehe Kapitel 2.3.1; Savage et al, 1996).

Die Anbindung der Plättchen an diese Proteine über spezifische Plättchenrezeptoren führt zur Plättchenaktivierung (Savage et al, 1992; Kehrel et al, 1998). Plättchen können jedoch auch durch physiologische Agonisten wie z. B. Thrombin, ADP und Serotonin oder mechanisch durch hohen Scherstreß aktiviert werden (Ruggeri, 1993a). Die Bindung der Agonisten führt durch Auslösung eines intrazellulären Botenstoffmechanismus zu aktivierenden Stoffwechselsignalen innerhalb des Plättchen und damit zu weitgreifenden Veränderungen der Zellen. Durch Veränderung der Zytoskelettproteine werden α -Granula und „dense-bodies“ zentralisiert und im Rahmen von Exozytosevorgängen verschmilzt die Granulamembran mit der Zellmembran. Dies führt zur Freisetzung der Granulainhaltsstoffe. Diese dienen nun ihrerseits als Agonisten für weitere Plättchenaktivierung und die Plättchenaggregation. Durch die Verschmelzung werden in der Granulamembran verankerte Glykoproteine wie das P-Selektin (CD62) der α -Granula und das Granulophysin (CD63) der „dense-bodies“ an die Plättchenoberfläche gebracht. Mit Hilfe des Zytoskeletts erfolgt auch der Formwandel („shape change“) der Plättchen. Die ursprünglich diskoide Form geht in eine sphärische Form über. Die Plättchen breiten sich aus und gleichzeitig werden durch Membranausstülpungen des offenen kanikulären Systems Pseudopodien gebildet. Durch die Bindung von Agonisten bzw. von Liganden wie Fibrinogen oder vWF werden jedoch nicht nur Signale in die Zelle geleitet („outside-in-signaling“), sondern Signale aus den Plättchen („inside-out-signaling“), führen zu einer

Konformitätsänderung des für die Aggregation essentiellen Glykoproteins IIb/IIIa (Shattil et al, 1998). Dieses wird damit in die Lage versetzt, lösliches Fibrinogen zu binden. Die Fibrinogenmoleküle können nun als Brückenmoleküle dienen und mehrere Plättchen miteinander verbinden. Die lokale Anhäufung mehrerer GPIIb/IIIa-Komplexe führt desweiteren zu einer Verstärkung der Plättchenbindung untereinander und damit zur Aggregatbildung (Lüscher und Weber, 1993).

Thrombozyten sind jedoch neben der Anheftung an geschädigtes Endothel auch in der Lage sich, materialabhängig, an inserierte Polymermaterialien anzulagern. Die Bindung erfolgt auch hier über spezifische Plättchenglykoproteine an die sich auf das Fremdmaterial anlagernden Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin, IgG, vWF und geringfügig auch Vitronectin (DiFazio et al, 1994). Die auf den daraufhin ausgelösten Kalziumeinstrom folgenden intrazellulären Signale und Veränderungen der Plättchen entsprechen denen für andere Agonisten beschriebenen (Packham, 1988; Ware et al, 1991).

2.3 Adhäsionsproteine

2.3.1 von Willebrand Faktor

Von Willebrand Faktor (vWF) ist ein in Megakaryozyten (Sporn et al, 1985) und Endothelzellen (Jaffe et al, 1974) synthetisiertes Glykoprotein, welches Multimere mit bis zu 50-100 Untereinheiten bildet. In Thrombozyten wird vWF in den α -Granula gespeichert und dort nach Aktivierung freigesetzt. Endothelzellen speichern das Protein in den Weibel-Palade-Körperchen, von wo aus es kontinuierlich und verstärkt nach Zellaktivierung ins Plasma und in die subendotheliale Matrix abgegeben wird.

Primäres Translationsprodukt ist der Prä-pro-von-Willebrand-Faktor, welcher aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und dem reifen vWF besteht. Nach Entfernung des Signalpeptids wird der pro-vWF durch Bildung von Disulfidbrücken zunächst zu Dimeren, später zu Multimeren zusammengefügt. Die größten Multimere, welche für die Plättchenadhäsion und -aggregation am effektivsten sind, befinden sich in den Speicherorganellen und kommen im Blut nur vorübergehend vor (Meyer und Girma, 1993). Das Propeptid und die reife vWF-Untereinheit bestehen aus einer Abfolge aus A-, B-, C-, und D-Domänen, auf welchen die unterschiedlichen Bindungsstellen lokalisiert sind.

Für die Hämostase spielt der vWF eine wichtige Rolle für die Plättchenadhäsion und die Thrombusbildung bei hohem Scherstreß (Ruggeri und Ware, 1992). Dabei wird vWF aus der subendothelialen Matrix und aus dem Plasma an die geschä-

digte Gefäßwand adsorbiert. Dies geschieht über die Bindung der A1-Domäne an Kollagen Typ VI und Bindung der A3-Domäne an Kollagen Typ I und III (Ruggeri, 1999). Dadurch erfährt der vWF eine Konformationsänderung, die es den Plättchen ermöglicht, über den GPIb-IX-V-Komplex an die A1-Domäne des vWF anzubinden. Gelöster vWF ist lediglich bei Anwesenheit von Modulatoren wie Ristocetin oder Botrocetin in der Lage über GPIb an Thrombozyten zu binden, was die Aggregation von Plättchen durch vWF unter physiologischen Bedingungen verhindert (Scott et al, 1991). Die Bindung der Thrombozyten an GPIb führt zur Plättchenaktivierung und zur Aktivierung des Plättchenglykoproteins GPIIb/IIIa. Dadurch wird dieses in die Lage versetzt, vWF über dessen in der C1-Domäne liegende RGDS-Sequenz zu binden. Dies führt letztlich zur irreversiblen Adhäsion der Plättchen an die Oberfläche. Die Plättchen breiten sich aus und aggregieren, so daß schließlich ein Thrombus entsteht. An der Ausbildung eines Thrombus sind jedoch neben dem vWF noch andere Proteine beteiligt. Unter hohem Scherstreß, wie er z.B. in engen Gefäßen vorkommt, ist der vWF für die Hämostase jedoch essentiell (Ruggeri und Ware, 1993).

Eine weitere wichtige Aufgabe des vWF ist die Bindung des Gerinnungsfaktors VIII über die D-Domäne. Dadurch wird dieser vor der Aktivierung durch Faktor Xa und der Inaktivierung durch aktiviertes Protein C geschützt (Kaufmann und Pipe, 1999).

Veränderungen des vWF-Moleküls bzw. Mangel des vWF führen zu dem in viele Subtypen unterteilten Krankheitsbild der „von Willebrand Disease“ (Zusammenfassung in Ruggeri, 1991).

Über die Bindung des vWF an *S. aureus* konnten Herrmann et al, 1997 berichten. Weitere Untersuchungen wiesen Protein A als Bindungsadhäsion für vWF auf *S. aureus* aus (Veröffentlichung in Druck).

2.3.2 Fibrinogen

Fibrinogen ist ein im Plasma, in Megakaryozyten und den α -Granula der Thrombozyten vorkommendes Glykoprotein. Die Synthese erfolgt in den Hepatozyten, von wo aus es ins Blut abgegeben wird und von Megakaryozyten und Plättchen aufgenommen werden kann. Das Fibrinogenmolekül ist ein Dimer, welches aus zwei identischen Hälften besteht, von denen jede wiederum aus drei nicht-identischen Polypeptidketten ($A\alpha$ -, $B\beta$ -, und γ -Kette) zusammengesetzt ist (Hantgan et al, 1994; Doolittle, 1984 und Blombäck, 1996).

Fibrinogen spielt eine entscheidende Rolle für die Gerinnung. Die durch Thrombin ausgelöste Abspaltung der Fibrinopeptide A und B vom Aminoende der A α - und B β -Kette führt zur Ausbildung von Fibrinmonomeren, welche vernetzt und unter enzymatischer Wirkung von Faktor XIII durch kovalente Bindung stabilisiert werden. Fibrin wiederum führt zur Aktivierung des fibrinolytischen Systems und damit zum Abbau des Gerinnsels durch Plasmin (McDonagh, 1995).

Die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten und Endothelzellen ist essentiell für die Thrombozytenadhäsion an geschädigtes Endothel und die Thrombozytenaggregation. Fibrinogen bindet dabei an Thrombozyten über das Glykoprotein IIb/IIIa. Die Bindungsstellen sind ein Dodekapeptid (His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val; HHLGGAKQAGDV) am Carboxyterminus der γ -Kette (Kloczewiak et al, 1984; Hettasch et al, 1992) und zwei Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenzen enthaltende Regionen der A α -Kette (Plow et al, 1985; Haverstick et al, 1985 und Gartner et al, 1985).

Lösliches Fibrinogen ist kaum in der Lage an Thrombozyten anzubinden. Im Gegensatz zu anderen Adhäsionsproteinen wie z.B. vWF oder Fibronectin ist oberflächengebundenes Fibrinogen jedoch in der Lage, an den GPIIb/IIIa-Komplex auf Plättchen zu binden und diese damit zu aktivieren (Savage und Ruggeri, 1991). Durch die Aktivierung wird der Komplex in die Lage versetzt lösliches Fibrinogen zu binden. Durch die Zusammenlagerung mehrerer Komplexe auf der Plättchenoberfläche wird die Verbindung zweier Plättchen über ein bzw. mehrere Fibrinogenmoleküle und damit die Plättchenaggregation ermöglicht (Lüscher und Weber, 1993).

Für die Bindung von Fibrinogen auf *S. aureus* sind mehrere Adhäsine auf der Oberfläche von *S. aureus* beschrieben worden, auf die in Kapitel 2.4 näher eingegangen wird. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, daß Fibrinogen an das *S. aureus*-Adhäsin „clumping factor“ über eine im C-Terminus der γ -Kette liegende Bindungsstelle an *S. aureus* bindet, welche identisch mit der Bindungsstelle von Fibrinogen an GPIIb/IIIa ist (Hawiger et al, 1982; Strong et al, 1982; McDevitt et al, 1997). Die Bindung von *S. aureus* an Fibrinogen ermöglicht es den Bakterien an Fremdoberflächen wie z.B. Plastik (Vaudaux et al, 1989; Cheung und Fischetti, 1990) und Zellen wie Endothelzellen und Plättchen (Cheung et al, 1991; Herrmann et al, 1993) zu adhären und stellt somit einen Schritt in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen dar.

2.3.3 Thrombospondin - 1 (TSP-1)

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein großes Glykoprotein (MG = 450.000Da), welches aus drei identischen Untereinheiten besteht (Coligan und Slayter, 1984; Lawler et al, 1985). Die Synthese erfolgt in unterschiedlichen Zellen wie z. B. Endothelzellen (Mosher et al, 1982; McPherson et al, 1981), Monozyten (Jaffe et al, 1985), glatten Muskelzellen (Raugi et al, 1982) oder Fibroblasten (Jaffe et al, 1983). TSP-1 ist ein multifunktionelles Protein, welches neben der Vermittlung von Zell-Zell-, und Zell-Matrix-Kontakten in viele physiologische Vorgänge wie z. B. die Hämostase, die Organogenese und die Wundheilung involviert ist (Lahav, 1993). Im Plasma liegt TSP-1 nur in geringen Konzentrationen vor und Hauptreservoir für gespeichertes TSP-1 sind die α -Granula der Thrombozyten. Von dort wird es bei der Plättchenaktivierung freigesetzt und bindet zum einen an Rezeptoren auf der Plättchenmembran zurück, zum anderen spielt es eine Rolle bei der Formierung von Fibrinpolymeren und Thromben (Bale et al, 1985; Murphy-Ullrich und Mosher, 1985).

Die Bindung von TSP-1 an Thrombozyten erfolgt über die Rezeptoren CD36 (Asch et al, 1987), GPIIb/IIIa (Karczewski et al, 1989) und über an Thrombozyten gebundenes Fibrinogen (Leung und Nachman, 1982). Über die Interaktion mit Fibrinogen stabilisiert TSP-1 dabei die Plättchenaggregation und induziert die Bildung von Mikro- in Makroaggregate (Leung et al, 1982 und 1984).

Neben seiner Fähigkeit an unterschiedliche Zellen zu binden, konnten Herrmann et al, 1991 die Bindung von TSP-1 an *Staphylococcus aureus* nachweisen. 1993 isolierten McGavin et al ein extrazelluläres Matrixprotein aus *S. aureus*, welches in der Lage ist, Thrombospondin zu binden.

2.4 Staphylokokken - Adhäsine

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen ist die Anheftung der Bakterien an das Wirtsgewebe bzw. an Fremdoberflächen. Dies kann entweder über die direkte Bindung oder über eine durch extrazelluläre Matrixproteine wie Fibrinogen, von Willebrand Faktor oder Fibronectin vermittelte Bindung erfolgen. Während bisher noch keine Rezeptoren auf *S. aureus* für eine direkte Bindung charakterisiert werden konnten, wird die Bindung an Matrixproteine über *S. aureus*-Adhäsine vermittelt, welche zusammenfassend als MSCRAMM („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) bezeichnet werden. Diese Proteine weisen einen nahezu identischen Aufbau auf. Die extrazelluläre Region besteht aus einer am N-Terminus liegenden Signal-

sequenz, gefolgt von einfachen Sequenzen, welche für die Ligandenbindung zuständig sind und einer aus mehreren Wiederholungssequenzen bestehenden Domäne. Das C-terminale Segment enthält eine zellwandüberspannende Domäne aus prolin- und glycinreichen Resten bzw. aus Serin-Aspartat-Dipeptid-Wiederholungen, einem für die Verankerung in der Zellmembran zuständigen LPXTG-Motiv und die membranüberspannende Domäne (Patti et al, 1994a; Patti und Höök, 1994; Foster und Höök, 1998).

Diese zellwandassoziierten Proteine werden vor allem während der logarithmischen Wachstumsphase produziert und unterliegen den drei regulatorischen Elementen *agr*, *sar* und *xpr* (Peng et al, 1988; Cheung et al, 1992; Smeltzer et al, 1993). Die Proteine werden dabei negativ durch den *arg-locus* reguliert und dessen Inaktivierung führt zu einer erhöhten Expression der Proteine (Rescei et al, 1986). Deletion des *sar-locus* hingegen bewirkt eine reduzierte Expression dieser Proteine (Projan und Novick, 1997). Neben dem direkten Einfluß des *sar-locus* auf die Proteinproduktion ist dieser auch in der Lage, durch die Anbindung seiner Genprodukte an den *agr*-Promoter den *arg-locus* zu aktivieren und somit Einfluß auf die Proteinexpression zu nehmen (Chien und Cheung, 1998).

2.4.1 Fibrinogen - bindendes Protein („clumping factor“)

Das Fibrinogen-bindende Protein oder der „clumping factor“ (ClfA) ist ein auf der Oberfläche von *S. aureus* exprimiertes Adhäsion, welches die Fähigkeit besitzt, die Bakterien bei Anwesenheit von Fibrinogen zu verklumpen. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, daß der ClfA die Anheftung von *S. aureus* an immobilisiertes Fibrinogen, an plasmaproteinbehaftete Biomaterialien ex vivo und an geschädigte Herzklappen in vivo induziert und damit eine Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen spielt (McDevitt et al, 1994; Moreillon et al, 1995; Vaudaux et al, 1995). Die Klonierung und Sequenzierung ergab ein Protein, welches dem allgemeinen Aufbau der MSCRAMM-Proteine folgt, statt der prolin- und glycinreichen Region jedoch eine hauptsächlich aus Aspartat und Serin bestehenden Dipeptid-R- („repeat“)-Region enthält. Mit Hilfe von rekombinanten Fragmenten konnte die fibrinogenbindende Domäne im Bereich einer 218- Aminosäuren-Sequenz innerhalb der der Signalsequenz folgenden Region A lokalisiert werden (McDevitt et al, 1994; 1995).

Kürzlich konnte ein zweites Fibrinogen-bindendes Protein, der „clumping factor“ B (ClfB) auf *S. aureus* identifiziert werden. ClfA und ClfB werden von unterschiedlichen Genen kodiert, unterscheiden sich hinsichtlich ihres Aufbaus jedoch

lediglich in der A-Domäne, welches aber in beiden Fällen die Bindungsstelle für Fibrinogen darstellt. Während ClfA Fibrinogen an dessen γ -Kette bindet, findet die Bindung von ClfB an die α - und β -Kette des Fibrinogens statt. Im Gegensatz zu ClfA, welches in allen Wachstumsphasen auf den Bakterien präsent ist, ist ClfB lediglich in der frühen exponentiellen Phase zu finden. Mit Hilfe von ClfB-Deletionsmutanten konnte nachgewiesen werden, daß ClfB wie ClfA in der Lage ist, in Anwesenheit von Fibrinogen zu klumpen, an immobilisiertes Fibrinogen und *ex vivo* an Biomaterial zu binden (Ni Edhin et al, 1998).

2.4.2 Koagulase

Koagulase ist ein von den meisten *S. aureus*-Stämmen produziertes extrazelluläres Protein, welches aus drei unterschiedlichen Regionen besteht. Dem N-Terminus, einer Zentralregion und der C-terminalen Region mit fünf oder acht repetitiven Einheiten (Phonimdaeng et al, 1990). Über den N-Terminus erfolgt die Bindung von Prothrombin zu dem sogenannten Staphylothrombin-Komplex. Dieser induziert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und damit die Bildung von Klots im Plasma (Hemker et al, 1975; Kawabata et al, 1985). Boden und Flock (1989) konnten im Westernblot die Bindung von Fibrinogen an gereinigte Koagulase nachweisen. Diese Bindung erfolgt über den C-Terminus der Koagulase. In Versuchen mit Koagulase-Deletionsmutanten konnte jedoch kein Unterschied in der Bindung von Mutante und Wildtyp an mit Fibrinogen beschichtete PMMA-Scheibchen festgestellt werden (McDevitt et al, 1992). Widersprüchliche Aussagen bestehen auch über die Eigenschaft der Koagulase als Virulenzfaktor. So zeigten nach Mutagenisierung durch Zugabe von N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin isolierte Koagulase-Deletionsmutanten in Versuchen mit Mäusen eine niedrigere Virulenz als der Wildtyp (Jonsson et al, 1985). Untersuchungen an Mutanten, welche durch Allelaustausch hergestellt wurden, konnten jedoch keinen Unterschied in der Virulenz zwischen Mutante und Wildtyp beschreiben (Phonimdaeng et al, 1990; Baddour et al, 1994; Moreillon, 1995). Während bei dem Verfahren des Allelaustausches sicher gesagt werden kann, daß nur die Koagulaseexpression betroffen ist, besteht bei der chemischen Herstellung der Mutanten jedoch die Möglichkeit, daß noch andere Virulenzfaktoren mit beeinflußt werden bzw. daß das Wachstum der Bakterien *in vivo* vermindert wird.

2.4.3 Protein A

Protein A ist ein zellwandassoziiertes Protein von *Staphylococcus aureus*. Es besteht aus den fünf extrazellulären Domänen E, D, A, B und C und den die zellwandüberspannenden Domänen X_r und X_c . Verankert ist es in der zytoplasmatischen Membran über eine hydrophobe Domäne am C-Terminus (Löfdahl et al, 1983; Uhlen et al, 1984; Guss et al, 1984). An jede der extrazellulären Domänen kann ein IgG-Molekül über seine Fc-Region binden (Moks et al, 1986). Damit konkuriert Protein A mit Phagozytosezellen um IgG-Fc-Bindungsstellen und vermindert somit die IgG vermittelte Opsonophagozytose (Peterson et al, 1977; Gemmell et al, 1990). Weitere Virulenzfaktoren von Protein A sind die Fähigkeit zur Komplementaktivierung und die Freisetzung von Histaminen aus Basophilen (Fosgren et al, 1983). Neuerdings konnten Untersuchungen von Hartleib und Kollegen und eigene Untersuchungen (Veröffentlichung in Druck) zeigen, daß Protein A an von Willebrand Faktor anbindet und damit der Gruppe der MSCRAMM-Proteine zugeordnet werden sollte. Damit ermöglicht Protein A den Bakterien die Anheftung an subendotheliale Matrix und an mit Plasmaproteinen überzogenen Fremdmaterialien und ermöglicht die Manifestation von Infektionen. Durch Einsatz von Protein-A-Deletionsmutanten im Tierversuch konnte die Rolle von Protein A als Virulenzfaktor untermauert werden. So zeigten Protein-A-Mutanten und Wildtyp erhebliche Unterschiede in ihrer Virulenz bei Peritonitis und subkutanen Infektionen (Patel et al, 1987) und im Mastitismodell der Maus (Foster et al, 1990).

2.4.4 Map

Mittels LiCl-Extraktion konnten McGavin et al (1993) ein 72 kDa-Protein mit breiter Spezifität und Bindungseigenschaften für Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin und Knochensialoprotein aufreinen, dessen Struktur und Sequenz von Jönsson et al (1995) aufgeklärt werden konnte. Das aus insgesamt 689 Aminosäuren (AS) bestehende Protein enthält eine am NH_2 -Terminus liegende Signalsequenz und sechs aus jeweils 110 AS bestehenden Wiederholungsdomänen. Innerhalb jeder Wiederholungsdomäne liegt eine aus 31 AS bestehende Subdomäne, welche eine hohe Homologie mit dem aminoterminalen Ende der β -Kette vieler MHC-Klasse-II-Proteine aufweist. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Protein als Map (MHC-Klasse-II-analoge-Protein) deklariert. Diese Region der MHC-Klasse-II-Proteine enthält für die Bindung von Peptiden wichtige Sequenzen. Da für die Zellverankerung wichtige Sequenzen am carboxyterminalen Ende des Proteins

fehlen, wird angenommen, daß das Protein nicht fest mit der Zellwand verankert ist.

1998 konnten Hussain und Kollegen eine Map-Deletionsmutante konstruieren und damit die Möglichkeit zur Untersuchung weiterer Map-assoziiierter Funktionen eröffnen.

2.4.5 Adhäsine für weitere Matrixproteine

Neben den beschriebenen fibrinogenbindenden Adhäsinen konnten auf *S. aureus* zwei weitere Adhäsine nachgewiesen und molekular charakterisiert werden. Dabei weisen sowohl das fibrinogenbindende-Protein Fib, als auch das fibrinogenbindende Protein fbpA Sequenzhomologien mit dem Koagulase-Gen auf (Boden und Flock, 1994; Cheung et al; 1995).

Für die Bindung von Kollagen konnte ein Kollagenadhäsion kloniert und sequenziert und seine Kollagenbindungsdomäne bestimmt werden (Patti et al, 1992; 1993; 1995). Seine Bedeutung für Pathogenität konnte in Arthritismodellen und im Endokarditismodell nachgewiesen werden (Switalski, 1993; Patti et al, 1994; Hienz et al, 1996).

Mittels affinitätschromatographischer Methoden konnte zunächst ein Fibronectin-bindendes Protein gereinigt werden (Froman et al. 1987). Molekulargenetische Analysen konnten zwei benachbarte Gene nachweisen, welche für die Expression zweier fibronectin-bindender Adhäsine, FnBPA und FnBPB, verantwortlich sind (Flock et al, 1987; Signäs et al, 1989; Jönsson et al, 1991).

Ein 60 kDa großes Adhäsion wurde gereinigt und sequenziert und die Bindung von Vitronectin anhand von Westernblots bestätigt (Liang et al, 1993; 1995).

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Durchflußzytometrie

- Durchflußzytometer: FACScan [Becton Dickinson, Heidelberg]
- Computersystem: HP9000 [Hewlett Packard, Böblingen]
- Computersystem: PowerMac7600/132 [Apple, U.S.A.]
- Steuer - und Auswertprogramme: FACScan und CellQuest [Becton Dickinson, Heidelberg]
- Drucker: HP3000-Paintjet und HP1600CM-Deskjet [Hewlett Packard, Böblingen]

Elektrophorese

- Vertikalelektrophoresekammer: SE600 [Hofer, U.S.A.]
- Kühlung: LKB2219 Multitemp II [Pharmacia & LKB, Schweden]
- Netzgeräte: LKB197 und LKB2103 [Pharmacia & LKB, Schweden]
- Gelrockner: Model 543 [BioRad, München]

PCR

- Thermocycler: Touch Down Thermocycler HBTDCMO5S [Hybaid GmbH, Heidelberg]
- Horizontalelektrophoresekammer: Subcell[®]GT [BioRad, München]
- Netzgerät: PowerPac 300 [BioRad, München]

Zentrifugen

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

Sonstige Geräte

- Analysenwaage: AE50 [Mettler-Toledo, Schweiz]
- β -Szintillations-Zählgerät: Tri-Carb2100TR [Canberra-Packard, Dreieich]

- Brutschrank: T6060	[Heraeus, Hanau]
- Eismaschine: Scotsman AF10	[Fisher Scientific, Nidderau]
- Fraktionssammler: Model 2110	[BioRad, München]
- Lyophilisator: Alpha 1-2	[Christ, Osterode am Harz]
- Phasenkontrastmikroskop: Axioskop	[Zeiss, Oberkochen]
- pH-Meter: STH600	[WTB, Weilheim]
- Photometer: Eppendorf	[Eppendorf, Hamburg]
- Photometer: 4060	[Biochrom, U.S.A.]
- Ultraschallgerät: Model 250 Sonifier	[Branson Inc., Danbury, U.S.A.]
- Waage: 2355	[Sartorius, Göttingen]
- Wasseraufbereitungsanlage: Elix10 und Milli-Q-biocal	[Millipore, Eschborn]
- Zellzählgerät: System 9000	[Serono Baker Diagnostics, U.S. A.]
- Zwei-Kanal-Schreiber: Model 1327	[BioRad, München]

3.2 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

BioRad (München); Calbiochem (Bad Soden); Gibco (Eggenstein); ICN (Meckenheim); Merck (Darmstadt); Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen)

3.3 Antikörper

Antigen	Herkunft und Spezifität	Klon	Konjugation	Bezugsquelle
Aktin	Kaninchen, anti-Human			Sigma, Deisenhofen
FcγRII-Rezeptor (CD32)	Maus, anti-Human	IV.3-Fab		Medarex, U.S.A.
GPIb (CD42b)	Maus, anti-Human	SZ2		Immunotech, Hamburg
GPIIIa (CD61)	Hamster, anti-Maus	2C9.G2	PE	Pharmingen, U.S.A.

GPIX (CD42a)	Maus, anti-Human	ESS	PE	Exalpha,Natutec, Frankfurt a.M.
Protein-A	Kaninchen			Sigma, Deisenhofen
P-Selektin (CD62P)	Ratte, anti-Maus	RB40.34	FITC	Pharmingen, U.S.A.
P-Selektin (CD62P)	Maus, anti-Human	CLB- Thromb/6	FITC	Immunotech, Hamburg
P-Selektin	Maus, anti-Human	AK6		Serotec, England
von Willebrand Faktor (vWF)	Maus	AVW-1		Diagast (GTI), Jülich

3.4 Bakterienstämme

3.4.1 Standard-Laborstämme

Folgende *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)-Stämme wurden verwendet:

- Cowan1: ATCC 12598 ein Protein A reicher Laborstamm
- Newman: ATCC 25904 ein Fibrinogen-Rezeptor reicher Laborstamm
- 8325-4: NCTC 8325 (Novick, 1963), ein Koagulase- und Protein A-reicher Laborstamm
- Wood 46: ATCC 10832 ein Protein A defizienter Laborstamm
- 4074; 15286: aus Endokarditis- bzw. Sepsis-Patienten isolierte Stämme

Weiterhin wurden als Negativkontrolle folgende Laborstämme verwendet:

- RP62A: ATCC 35984; (Christensen et al, 1985), ein koagulasenegativer *Staphylococcus epidermidis* Laborstamm
- E. coli ATCC 25922

Sämtliche Laborstämme wurden vom Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Münster, zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Mutanten

- Protein A-Deletionsmutanten:
 - $\Delta spa::Tc^r$ DU 5889 aus Stamm Cowan 1
 - $\Delta spa::Tc^r$ DU 5873 aus Stamm Newman
 - $\Delta spa::Tc^r$ DU 5875 aus Stamm 8325-4
- „clumping factor“-Deletionsmutanten:
 - $clfA1::Tn917$ DU 5852 aus Stamm Newman
 - $clfA2::Tn917$ DU 5926 aus Stamm 8325-4
- Koagulase-Deletionsmutanten:
 - $coa::Tc^r$ DU 5855 aus Stamm Newman
 - $coa::Em^r$ DU 5809 aus Stamm 8325-4

Aus den Mutanten $\Delta spa::Tc^r$ DU 5873 und $\Delta spa::Tc^r$ DU 5875 konnten durch Komplementierung mit dem Plasmid pSPA7235 (Patel et al, 1992) folgende Stämme erhalten werden:

- komplementierte Protein-A-Mutanten:
 - DUNew/253
 - DU83/253

Sämtliche oben genannten Mutanten der *S. aureus* - Stämme wurden aus dem Labor von Dr. T. Foster, Dublin, Irland, zur Verfügung gestellt.

Aus dem Labor der Medizinischen Mikrobiologie, Münster, stammen folgende Mutanten:

- Map-Deletionsmutanten: - $\Delta map::Em^r$ 9A und 9B aus Stamm Newman
- SA 113 (1) und (2) (Iordanescu et al, 1976) nach Einführung des Map-Gen enthaltenden Plasmids pCX19

3.5 Anzucht der Bakterien

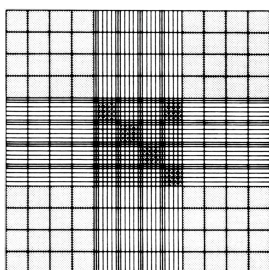
Sämtliche Stämme wurden bei -70°C in Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion, BHI-Medium; Merck, Darmstadt), die 30% Glycerin enthielt, aufbewahrt. Daraus wurden die verwendeten Laborstämme im Dreiösenausstrich auf Blutagarplatten (Columbia Agar + 7% Schafsblut; Becton Dickinson, Heidelberg) überimpft, über Nacht bei 37°C bebrütet und zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Erhaltung der in die Mutanten eingeführten Plasmide wurden diese auf TSA-Platten (Tryptic-Soy-Agar; Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert, welche entsprechend der Antibiotikaresistenz der Mutanten mit $10\ \mu\text{g/ml}$ Antibiotikazusatz versetzt waren. Eine Überimpfung sämtlicher Kulturen fand alle drei bis vier Wochen statt. Da es während der exponentiellen und der stationären

Wachstumsphase zu einer unterschiedlichen Expression der Exoproteine auf Bakterien kommt [Patel et al, 1992; Patel et al, 1987], wurden in den Experimenten, um eine möglichst gleichbleibende Bakterienoberfläche zu erhalten, jeweils frische Übernachtskulturen in 5 ml BHI-Medium bei 37°C verwendet.

- BHI - Medium: pH 7,4	Nährsubstrat (Hirn-,Herzextrakt und Peptone)	27,5 g/l
	D(+)-Glucose	2,0 g/l
	NaCl	5,0 g/l
	Na ₂ HPO ₄	2,5 g/l

3.6 Keimzahlbestimmung

Zunächst wurde die Übernachtskultur 10 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) mit 2500xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 5 ml Puffer resuspendiert. Um eine Vereinzelnung der Mikroorganismen zu erreichen, wurden diese in 10 Zyklen für je eine Sekunde bei 50 Watt im Ultraschallgerät behandelt. Die Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mittels Phasenkontrastmikroskop (Axioskop, Zeiss). Hierzu wurden die zuvor behandelten Bakterien 1:100 verdünnt und im mittleren Quadrat der Neubauer-Kammer 5 Gruppenquadrate aus je 16 Kleinstquadraten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:



$$\begin{aligned} \text{Zellzahl}/\mu\text{l} &= \frac{\text{gezählte Zellen (n)}}{\text{Fläche} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verdünnung}} \\ &= \frac{n}{0,2 \times 0,1 \times 0,01} = n \times 5000 \end{aligned}$$

Abb. 3-1: Neubauer-Zählkammer

3.7 Gewinnung und Aufreinigung von Thrombozyten

Die verwendeten Thrombozyten (Tz) mußten jeweils aus frisch entnommenen Vollblut präpariert werden. Zur Gewinnung humaner Thrombozyten wurde freiwilligen Probanden bzw. Patienten venöses Blut mittels eines „Butterfly“-21G-Venenpunktionsbesteckes (Venofix/Braun, Melsungen) entnommen. Zur Gewinnung muriner Thrombozyten wurden folgende Mäusestämme verwendet: von Herrn Prof. Dr. Vestweber, Institut für Zellbiologie (ZMBE), Münster, wurden

P-Selektin-knockout Mäuse vom Stamm 129SV und von Herrn Dr. Olle Korsgren, Institut für Transplantationsimmunologie, Uppsala, Schweden, wurden Knockout-Mäuse der Fc γ -Kette vom Stamm C57B, zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung des Vollblutes aus Mäusen erfolgte durch Abnahme von ca. 300 μ l Blut aus dem retrobulbären Venenkomplex mittels einer Glaspipette. Um ein Anheften von Blutplättchen an die Glasoberfläche zu verhindern, wurde diese zuvor silikonisiert. Als Antikoagulanzen wurden für die Thrombozytenaufreinigung Natriumcitrat (110 mM Natriumcitratlösung im Verhältnis 1:10), für die Aufreinigung von DNA aus Vollblut Kalium-EDTA (1,6 mg EDTA/ml Blut) verwendet.

3.7.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP)

Zur weitgehenden Trennung der Thrombozyten von anderen Blutbestandteilen wurde humanes Blut 10 min bei RT mit 200xg zentrifugiert und der die Plättchen enthaltene Plasmaüberstand vorsichtig abpipettiert. Zur Gewinnung hoher Konzentrationen an murinen Thrombozyten wurde das Blut zunächst mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, s. Kap. 3.8.1.1) im Verhältnis 2:1 oder 1:1 verdünnt. Aufgrund der geringeren Größe muriner gegenüber humanen Thrombozyten erfolgte die Zentrifugation für 8 min bei 150xg. Hierbei ergaben sich drei Schichten: 1.) eine untere, die Erythrozyten und Leukozyten enthaltende Schicht, 2.) eine mittlere, die Plättchen enthaltende sowie 3.) eine obere, aus Plasma bestehende Schicht. Zur Gewinnung der Thrombozyten wurden diese vorsichtig aus der mittleren Schicht abpipettiert.

3.7.2 Aufreinigung von Thrombozyten mittels Gelfiltration

Um eine schonende Trennung der Thrombozyten von den Plasmaproteinen zu ermöglichen, wurde das aus ca. 10-20 ml Vollblut gewonnene PRP (Kapitel 3.7.1) gelfiltriert (Timmons und Hawiger, 1989). Eine Entfernung des durch Scherung an die Plättchen anhaftenden von Willebrand Faktors und von von Willebrand Faktor mit hoher Multimerzahl ist dabei jedoch nicht möglich. Als Säulenmaterial wurde Sepharose 2B (Pharmacia, Freiburg) verwendet, welche mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und luftblasenfrei in eine silikonisierte Glassäule (V = 50 ml) gefüllt wurde. Vor dem Auftragen des PRP's erfolgte eine Äquilibration der Säule mit Tyrode-Hepes-Puffer. Um eine Aktivierung der Plättchen durch ADP zu verhindern wurde dem Puffer Apyrase (Grad VIII, Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Die Trennung erfolgt bei dieser Methode über die Größenunterschiede zwischen Plättchen und Plasmabestandteilen, so daß die Thrombozyten als trübe

Suspension vor dem Erscheinen des Plasmas aufgefangen werden können. Anschließend wurde die Säule mit 0,9%iger NaCl, versetzt mit 0,02%igem Natriumazid, gespült.

- Tyrode-Hepes-Puffer: NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
NaHCO ₃	12,0 mM
D(+)-Glucose	5,5 mM
Hepes	5,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM
BSA (bovines Serumalbumin)	0,35 % (w/v)
Apyrase	0,1 U/ml

3.7.3 Bestimmung der Thrombozytenkonzentration

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte mittels des Zellzählgerätes System 9000 (Serono, U.S.A.). Dazu wurden 40 µl der zu zählenden Probe in 10 ml Puffer verdünnt und die Zellzahl nach Angaben des Herstellers im Gerät ermittelt. Die Thrombozytenkonzentration wurde dabei in Thrombozyten pro µl angegeben.

3.8 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode, bei der die simultane Messung unterschiedlicher physikalischer und biochemischer Zelleigenschaften in Suspension ermöglicht wird. Dabei werden Zellen mittels eines Laserstrahls angeregt und die dabei entstehenden Streulicht- (relative Zellgröße und Granularität der Zellen) und Fluoreszenzeigenschaften gemessen.

Zur Analyse wird die Zellsuspension durch eine Stahlkapillare mittels Überdruck in die Meßkammer transportiert. Dort werden die Zellen von der zuströmenden Trägerflüssigkeit erfasst und durch Verengung der Kammer beschleunigt. Durch diese sogenannte „hydrodynamische Fokussierung“ kommt es zu einer Vereinzelung der Zellen, so daß diese nacheinander den Analysenpunkt passieren. Im Analysenpunkt kommt es zu einer Erfassung der Zelle durch den Laserstrahl und damit zur Analysierung und Klassifizierung der Zelle.

Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird dieser zum größten Teil in Richtung des einfallenden Strahls gestreut. Dieses Streulicht ist ein Maß für die Zellgröße und wird als Vorwärtsscatter (forward light scatter, FSC) bezeichnet.

Der geringere Teil des Lichts wird im rechten Winkel zum einfallenden Strahl gestreut und hängt von der Granularität der Zellen ab. Er wird als Seitwärtsscatter (side scatter, SSC) bezeichnet.

Trifft der Laserstrahl auf mit Fluorochromen markierte Zellen, kommt es innerhalb eines Absorptionsspektrums zur Anregung der fluoreszierenden Verbindung und zur Emittierung eines für das Fluorochrom charakteristischen Fluoreszenzlichtes.

Das in dieser Arbeit benutzte Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) arbeitet mit einem Argonlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm entsendet. Es können also nur solche Fluorochrome benutzt werden, deren Absorptionsspektren in diesem Bereich liegen. Zur Erhaltung eines möglichst starken Signals sollte das Absorptionsmaximum bei 488 nm liegen. Um eine Unterscheidung der Fluorochrome durch das Gerät zu ermöglichen, muß neben dem gemeinsamen Anregungsbereich von 488 nm eine deutliche Unterscheidung der Emissionsmaxima gewährleistet sein. Als Fluorochrome wurden in dieser Arbeit sowohl Fluoresceinisothiocyanat, FITC (Absorptionsmaximum: 495 nm, Emissionsmaximum: 525 nm) als auch Phycoerythrin, PE (Absorptionsmaximum: 488, 565 nm, Emissionsmaximum: 578 nm) benutzt. Für die Markierung der Bakterien wurde der Nukleinsäurefarbstoff Syto 13 (MoBiTec, Göttingen) verwendet, dessen Absorptions- und Emissionsspektrum dem des FITC entspricht.

Zur Detektion der unterschiedlichen Fluoreszenzen wird das Licht durch unterschiedliche Filter geleitet, in einer Photoröhre verstärkt und in elektronische Signale umgerechnet. Die gemessenen Signale können dabei entweder linear oder logarithmisch verstärkt werden. Parameter, die einen hohen Empfindlichkeitsbereich erfordern, sollten im logarithmischen Modus gemessen werden, da Signale mit geringer Intensität hierbei gespreizt und mit höherer Intensität gestaucht werden. Da sowohl Bakterien als auch Thrombozyten kleine Zellen und damit schwache Signale darstellen, wurde für die Einstellung von FSC und SSC der logarithmische Modus gewählt. Die Verstärkung der Immunfluoreszenzen erfolgte ebenfalls logarithmisch, da sich hier die Populationen um mehrere Größenordnungen voneinander unterscheiden können, und der Meßbereich im logarithmischen Modus größer als im Linearmodus ist.

Zur Datenaufnahme wird die registrierte Signalintensität für jede gemessene Eigenschaft mittels eines Analog- / Digitalumwandlers einer bestimmten Kanalzahl zugeordnet. Der FACScan arbeitet mit einer Anzahl von 1024 Kanälen. Die so erfassten Daten können dann mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogrammes im

Computer ausgewertet werden. Dabei bieten sich zwei Darstellungsmöglichkeiten an. Für die Einfarbenimmunfluoreszenzmessung (z.B. die Bindung von FITC markiertem Fibrinogen oder von Willebrand Faktor an Zellen) wurde die Einparameterdarstellung gewählt. Hierbei wird die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Zahl der Kanäle (Abszisse) in einem Histogramm aufgetragen.

Zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen empfiehlt sich die Zweiparameterdarstellung in Form eines Punktehistogramms (Dot plot), da hierbei die Möglichkeit besteht, zwei Zelleigenschaften miteinander zu korrelieren. So kann z. B. der FSC gegen den SSC aufgetragen werden.

Außerdem besteht hierbei die Möglichkeit, durch „Gaten“ einzelne Populationen zu markieren, so daß diese von anderen Zellen unabhängig in die Messung bzw. in die Zählung eingehen können. [Raffael, 1988; Schmitz und Rothe, 1994]

3.8.1 Probenvorbereitung für Untersuchungen der Thrombozyten - *Staphylococcus aureus* - Assoziation

Für die Bestimmung der Assoziate aus Thrombozyten und Bakterien mußten diese zunächst getrennt voneinander bearbeitet werden, bevor die Koinkubation durchgeführt werden konnte.

3.8.1.1. Präparation der Thrombozyten

Die aus der Gewinnung von PRP (s. Kap. 3.7.1) oder mittels Gelfiltration (s. Kap. 3.7.2) isolierten Plättchen wurden mit PBS auf eine Zellzahl von 25.000 Zellen/ μ l eingestellt. Die Markierung der Plättchen erfolgte mittels monoklonaler PE-markierter Antikörper. Bei Verwendung humaner Thrombozyten wurde ein gegen das plättchen-spezifische Glykoprotein IX (GPIX) gerichteter Antikörper (CD42a-PE, Klon ESS) in einer Konzentration von 0,75 μ g/ml eingesetzt, bei murinen Plättchen ein gegen das Integrin β_3 gerichteter Antikörper (CD61-PE, Klon 2C9.G2) in einer Konzentration von 10 μ g/ml. Die Inkubation erfolgte unter leichter Bewegung auf dem Schüttler für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

- PBS-Puffer:	NaCl	137 mM
pH 7,4	KCl	2,6 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,0 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM

3.8.1.2 Präparation der Bakterien

Die Bakterien wurden mit TBS (Tris gepufferte Salzlösung) auf eine Zellzahl von 250.000 Keime/ μl eingestellt. Die Markierung der Zellen erfolgte durch Anfärbung der Bakteriennukleinsäuren mittels Syto 13 (MoBiTec, Göttingen) in einer Konzentration von 2 μM . Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln, wurden die Proben zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes durch Zugabe von Puffer im Verhältnis 1:1 einmalig gewaschen und bei 2500xg für 10 min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Bakterien auf das Anfangsvolumen mit TBS aufgefüllt und resuspendiert. Um bei der Zentrifugation entstandene Aggregate zu lösen, erfolgte eine erneute Ultraschallbehandlung der Zellen (10 Zyklen 1 sec, 50 Watt; s. Kap. 3.6).

- TBS-Puffer:	Tris	10 mM
pH 7,4	NaCl	50 mM
	EDTA	1 mM
	CaCl ₂	2 mM (Zugabe je nach Versuchsbedingung)

3.8.2 Koinkubation von Thrombozyten und *Staphylococcus aureus*

Für die Koinkubation von Bakterien und Thrombozyten wurde ein Bakterien-Thrombozyten-Verhältnis von 10:1 gewählt. Die zuvor behandelten Zellsuspensionen (s. Kap. 3.8.1.1 und 3.8.1.2.) wurden im Verhältnis 1:1 vereinigt und 10 Minuten inkubiert. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge PBS wurden die Proben auf das im Durchflusszytometer verwendete Probenvolumen von 300 μl gebracht.

3.8.3. Auswertung der Assoziate im Durchflußzytometer

Die Markierung von Thrombozyten und Bakterien durch Fluorochrome unterschiedlicher Emissionsmaxima ermöglichte eine klare Unterscheidung der beiden Zellpopulationen im Durchflußzytometer. Für die quantitative Bestimmung der Thrombozyten wurden diese über die Fluoreszenz 1 (Messung des Fluorochroms PE) identifiziert und durch Setzen eines „Gates“ die Plättchenpopulation von der der Bakterien getrennt. Gezählt wurden 5000 Ereignisse pro Messung. In der Auswertung konnten dann durch Korrelation beider Fluoreszenzen zueinander diejenigen Thrombozyten detektiert werden, welche Bakterien gebunden hatten.

Berechnet wurde der prozentuale Anteil der bakterientragenden Plättchen im Verhältnis zur Thrombozytengesamtzahl.

3.8.4 Einsatz der Thrombin - induzierten Thrombozytenaktivierung im Assoziationsversuch und im Fibrinogenbindungsassay

Eine Aktivierung der Plättchen mit bovinem α -Thrombin (Sigma, Deisenhofen) wurde zum einen bei Versuchen durchgeführt, bei denen die Assoziation an aktivierten Plättchen gemessen werden sollte, zum anderen, um die Anbindung von Fibrinogen an die Plättchen zu untersuchen. Thrombozyten aus dem PRP bzw. gefilterte Thrombozyten wurden mit PBS (s. Kap. 3.8.1.1) pH 7,8 auf 25.000 Zellen/ μ l eingestellt und mit dem Peptid GPRP (Endkonzentration 1,25 mM) versetzt. GPRP verhindert dabei die Fibrinpolymerisierung (Michelson, 1994). Vor der Thrombinaktivierung wurden bei den Assoziationsversuchen die Plättchen zunächst wie in Kapitel 3.8.1.1 beschrieben markiert, Thrombin in einer Konzentration von 0,2 bzw. 1 U/ml in die Probenröhrchen vorgelegt und die entsprechende Menge Thrombozytensuspension dazugegeben. Nach der Inkubation von 3 min, in denen die Röhrchen nicht bewegt werden durften, erfolgte die Abstopfung der Aktivierungsreaktion je nach Versuch variabel durch 1.) Zugabe von Hirudin (12,5 U/ml; Loxo, Dossenheim), durch 2.) Zugabe von 1%iger Formaldehydlösung im Verhältnis 1:1 oder durch 3.) Zugabe der Bakteriensuspension (s. Kap. 3.8.1.2) im Verhältnis 1:1. Der Zugabe von Formaldehyd folgte eine Inkubation von 30 min bei RT und ein anschließender Waschschrift durch Zugabe von 1 ml PBS-Puffer und Zentrifugation bei 350xg für 10 min. Die Koinkubation erfolgte wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben.

Zur Untersuchung der Fibrinogenbindung an Thrombozyten wurden die Thrombozyten vor der Aktivierung mit FITC markiertem Fibrinogen in einer Endkonzentration von 150 μ g/ml versetzt und 10 min inkubiert. Thrombin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,05 U/ml bis 1 U/ml in Probenröhrchen vorgelegt und die Thrombozytensuspension aufpipettiert. Nach 3minütiger Inkubation erfolgte die Abstopfung der Aktivierung durch 1%ige Formaldehydlösung im Verhältnis 1:1. Nach 30minütiger Inkubation wurden die Thrombozyten wie oben beschrieben gewaschen, der Überstand abgesaugt und die Probe auf ein Volumen von 200 μ l mit PBS-Puffer aufgefüllt.

3.8.5 Einsatz der Ristocetin - induzierten Thrombozytenaktivierung im Assoziationsversuch und im von Willebrand Faktor - Bindungsassay

Ristocetin A (Paesel und Lorei, Duisburg) ist ein Antibiotikum, welches eine Konformationsänderung am von Willebrand Faktor (vWF) auslöst und damit dessen Anbindung an Thrombozyten möglich macht. In Assoziationsversuchen wurde Ristocetin in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt und die Proben entsprechend der Thrombinaktivierung in Kapitel 3.8.4 behandelt, wobei ein Abstoppen der Aktivierung lediglich durch Zugabe von Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1 erfolgte.

Für den Nachweis der Bindung des von Willebrand Faktors an Thrombozyten, wurden Plättchen aus dem PRP (25.000 Tz/ μ l) mit FITC-gekoppelten vWF (Endkonzentration 100 μ g/ml) versetzt und mit Ristocetin in einer Konzentration von 0,5 mg/ml bis 2 mg/ml für 3 min aktiviert. Das Abstoppen der Aktivierung erfolgte mit 1%iger Formaldehydlösung im Verhältnis Probe:Formaldehyd 1:1. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 1 ml PBS-Puffer und Zentrifugation bei 350xg für 10 min gewaschen und auf ein Meßvolumen von 200 μ l mit PBS aufgefüllt.

3.8.6 Einsatz von die Thrombozyten - *Staphylococcus aureus* - Assoziation beeinflussenden Substanzen

Zur Untersuchung von die Assoziation beeinflussenden Substanzen wurden die Thrombozyten wie in Kapitel 3.8.1.1 beschrieben vorbereitet. Zusätzlich erfolgte parallel zur Antikörperzugabe der Einsatz der zu untersuchenden Substanz in nachfolgend beschriebener Konzentration. Verwendet wurden, falls nicht extra erwähnt, Thrombozyten aus der PRP-Gewinnung. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in den Kapiteln 3.8.1.2 bis 3.8.3 beschrieben.

3.8.6.1 RGDS

Der Einsatz von RGDS (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin; Nova-biochem, Schweiz) erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 20 μ M bis 500 μ M. Die Thrombinaktivierung wurde mit 1 U/ml Thrombin (s. Kap. 3.8.4) durchgeführt.

3.8.6.2 „fibrinogen binding inhibitor peptide“

Das der Fibrinogen-spezifischen Dodeca-Peptidsequenz (Histidin-Histidin-Leucin-Glycin- Glycin- Alanin- Lysin- Glutamin- Alanin- Glycin- Aspartat- Valin; Bachem, Schweiz) entsprechende „fibrinogen binding inhibitor peptide“ wurde in einer

Konzentration von 10 µM bis 200 µM eingesetzt. Die Thrombinaktivierung erfolgte mit 1 U/ml Thrombin.

3.8.6.3 Antikörper

Für Untersuchungen des von Willebrand Faktors als Brückenbildner wurden die Antikörper anti-CD42b (Klon SZ2) und anti-vWF (Klon AVW-1) in einem Konzentrationsbereich von 0,5 µg/ml bis 10 µg/ml verwendet. Das aus dem anti-vWF-Antikörper (Klon AVW-1) hergestellte F(ab')₂ - Fragment wurde in einer Konzentration von 0,1 µg/ml bis 5 µg/ml eingesetzt. Dabei wurden die Proben wie in Kapitel 3.8.5 beschrieben mit 2 mg/ml Ristocetin aktiviert.

Für Untersuchungen über P-Selektin wurde der Antikörper anti-P-Selektin (Klon AK6) in Konzentrationen zwischen 0,5 µg/ml und 20 µg/ml eingesetzt. Eine Thrombinaktivierung wurde mit 0,2 U/ml Thrombin durchgeführt.

3.8.6.4 Sialyl - Lewis - X

Sialyl-Lewis- X (Oxford, Glycosciences) wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml bis 10 µg/ml eingesetzt. Die Thrombinaktivierung erfolgte mit 1 U/ml Thrombin.

3.8.6.5 Beriate

Für den Ersatz von Faktor VIII bei einem Hämophilie A Patienten wurde Beriate[®] HS1000 (Centeon, Marburg) in einer Konzentration von 1 internationalen Einheit (I.E.) pro ml eingesetzt. Die Thrombozyten wurden durch Gelfiltration (s. Kap.3.7.2) gewonnen und mit 2 mg/ml Ristocetin aktiviert.

3.8.6.6 Thrombospondin - 1

Für die Untersuchungen mit Thrombospondin-1, wurde dieses bei Patienten mit fehlenden α-Granula („Gray-platelet-syndrom“ und „α-δ-storage-pool-disease“), und damit fehlendem Thrombospondin, ersetzt. Das in der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Münster, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte Thrombospondin-1 wurde in einer Konzentration von 30 µg/ml eingesetzt. Zuvor waren die Thrombozyten gelfiltriert worden. Die Thrombinaktivierung erfolgte mit 0,2 U/ml Thrombin.

3.8.6.7 Einsatz der Adhäsionsproteine Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin - 1

Für den Einsatz von Adhäsionsproteinen wurden gelfiltrierte Thrombozyten verwendet. Die Aktivierung erfolgte bei Einsatz des von Willebrand Faktors mit 2 mg/ml Ristocetin, bei den übrigen Proteinen mit 1 U/ml Thrombin.

Die Proteine wurden in folgender Konzentration eingesetzt: Fibrinogen: 150 µg/ml; aus Hämate[®] HS1000 (2200 I.E. vWF/1000 I.E. Faktor VIII): vWF: 1 I.E./ml und Faktor VIII: 0,5 I.E./ml; Fibronectin: 10 µg/ml; Vitronectin: 200 µg/ml und Thrombospondin-1: 30 µg/ml.

3.8.7 Bindung von von Willebrand Faktor und Fibrinogen an Bakterien

Um die Bindung von zugegebenen vWF und Fibrinogen an Bakterien durchflußzytometrisch messen zu können, mußten die beiden Plasmaproteine zunächst, wie in den Kapiteln 3.9 und 3.10 beschrieben, markiert werden. Zum Erreichen der Endkonzentration von 120.00 Keimen/µl wurde die entsprechende Menge gezählter Bakterien in Probenröhrchen pipettiert und vWF-FITC bzw. Fibrinogen-FITC in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 200 µg/ml dazugegeben. Das Auffüllen bis zum gewünschten Probenvolumen erfolgte mit 2 mM Ca²⁺ enthaltenden TBS-Puffer (s. Kap. 3.8.1.2). Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln wurden die Proben mit 1 ml Puffer versetzt, bei 2500xg 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Bakterien in 1 ml Puffer resuspendiert. Um eine Vereinzelnung der Mikroorganismen zu erreichen, wurden diese in 10 Zyklen für je eine Sekunde bei 50 Watt im Ultraschallgerät behandelt.

Für den Versuch der Verdrängung des FITC markierten Fibrinogens bzw. des von Willebrand Faktors von den Bakterien, wurden die markierten Proteine in sättigender Konzentration (je 150 µg/ml) den Bakterien zugesetzt, die jeweiligen unmarkierten Proteine in einer Konzentration von 0,5 mg/ml bis 2 mg/ml zupipettiert und die Proben zum gewünschten Volumen mit 2 mM Ca²⁺ enthaltendem TBS-Puffer (s. Kap. 3.8.1.2). aufgefüllt. Die weitere Durchführung des Versuches erfolgte entsprechend der für die Fibrinogen- bzw. vWF-Bindung an Bakterien beschriebenen.

Für die Untersuchung der Rolle von Protein A als Bindungsadhäsine von Fibrinogen bzw. von von Willebrand Faktor erfolgte die Verdrängung der markierten Proteine auf der *S. aureus*-Oberfläche durch Zugabe eines anti-Protein-A-Antikörpers bzw. zur Detektion der unspezifischen Bindung durch Zugabe eines Kontrollantikörpers

(Anti-Muskelaktin). Um die Endkonzentration von 120.000 Keimen/ μl zu erhalten, wurde die entsprechende Menge gezählter Bakterien in Probenröhrchen pipettiert und mit FITC markiertem Fibrinogen bzw. vWF in sättigender Konzentration (je 150 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Zur Verdrängung von Fibrinogen wurden der anti-Protein-A- und der Kontrollantikörper in einem Konzentrationsbereich von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ bis 30 $\mu\text{g/ml}$ und zur Verdrängung der vWF-Bindung die beiden Antikörper in einem Konzentrationsbereich von 7,5 $\mu\text{g/ml}$ bis 150 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem zur Bindung von Fibrinogen und vWF an Bakterien beschriebenen.

Im Durchflußzytometer konnte die steigende bzw. abnehmende Bindung der markierten Substanzen über den Median der Signalintensität bestimmt werden. Um die Eigenfluoreszenz der Bakterien unberücksichtigt zu lassen, wurde die Verstärkung so eingestellt, daß der Median von unmarkierten Keimen zwischen Werten von 20 und 30 lag.

3.8.8 Untersuchung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *Staphylococcus aureus*

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es möglich, die Aktivierung von Thrombozyten *in vitro* anhand von Veränderungen der Membranglykoproteine zu bestimmen. Aktivierungsabhängig kann der Zuwachs bzw. die Abnahme der Bindung von spezifischen Antikörpern oder Adhäsionsmolekülen auf der Plättchenoberfläche bestimmt und als Median der mittleren Fluoreszenz angegeben werden (Kehrel et al, 1998a). Die durchflußzytometrische Bestimmung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten erfolgte in dieser Arbeit über die Expression des α -Granula-Membranproteins P-Selektin (CD62). Bestimmt wurde hierbei der aktivierungsabhängige Zuwachs der Bindung von anti-P-Selektin-Antikörpern auf der Thrombozytenoberfläche.

Humane Thrombozyten und Thrombozyten von Knockout-Mäusen der $\text{Fc}\gamma$ -Kette wurden mit PBS (s. Kap. 3.8.1.1) auf 25.000 Tz/ μl eingestellt und im Verhältnis 1:1 zu der mit PBS auf 120.000 Keime/ μl eingestellten Bakteriensuspension gegeben. Verwendet wurde dabei der *S. aureus* Stamm Newman. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT unter leichter Bewegung wurde dem Ansatz mit humanen Thrombozyten PE-markierter anti-CD42a, Klon ESS (0,75 $\mu\text{g/ml}$) und FITC-markierter anti-P-Selektin, Klon CLB-Thromb/6 (5 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Für den Ansatz muriner Thrombozyten wurden PE-markierter anti-CD61-Antikörper, Klon 2C9.G2 (10 $\mu\text{g/ml}$) und FITC-markierter anti-P-Selektin-Antikörper, Klon RB40.34

(5 µg/ml) verwendet. Die Inkubation dauerte 10 min und wurde durch Zugabe von PBS auf ein Probenvolumen von 300 µl beendet.

Die Detektion der Thrombozyten im Durchflußzytometer erfolgte mittels der PE - markierten Antikörper. Pro Ansatz wurden 5000 PE-positive Zellen gemessen. Die Zunahme der Bindung von FITC-markierten anti-P-Selektin-Antikörpern wurde als Zunahme der Fluoreszenzintensität über den Median angegeben.

3.8.9 Untersuchung zum Einfluß des Fc-Rezeptors auf die *Staphylococcus aureus* - induzierte Aktivierung der Thrombozyten

Der Versuch der Hemmung der Aktivierung wurde durch Einsatz des anti-FcγRII-Rezeptor-Antikörpers, Klon IV.3 - Fab, durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Kapitel 3.8.8 beschrieben, jedoch wurde vor Zugabe der Thrombozyten zu den Bakterien der Antikörper in einem Konzentrationsbereich von 0.025 µg/ml bis 1 µg/ml den Thrombozyten zugesetzt und 10 min inkubiert. Verwendet wurden humane Thrombozyten aus dem PRP und *S. aureus* vom Stamm Newman. Die Auswertung erfolgte wie im Kapitel 3.8.8 beschrieben.

3.9 Markierung von Fibrinogen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Um die Bindung von zugesetztem Fibrinogen an Bakterien und Thrombozyten im Durchflußzytometer detektieren zu können, wurde dieses nach einer leicht modifizierten Methode von Xia et al. (1996) mit FITC konjugiert.

Dazu wurden 10 mg humanes Fibrinogen (Kordia, Niederlande) und 5 mg FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) in 5 ml Kopplungspuffer gelöst und 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde nicht gelöstes Material durch Zentrifugation (13.000xg, 10 min, RT) abgetrennt und das nicht konjugierte FITC mittels Gelfiltration vom gekoppelten Fibrinogen-FITC separiert. Als Säulenmaterial diente hierbei eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule (Pharmacia, Freiburg) mit einem Volumen von 50 ml. Die Proteinbestimmung erfolgte wie in Kapitel 3.15 beschrieben. Zur Bestimmung des FITC/Protein-Verhältnisses wurden die Proben bei 280 nm und 495 nm photometrisch gemessen und wie folgt berechnet. Im Durchschnitt wurden 5 - 7 FITC-Moleküle pro Fibrinogenmolekül gebunden.

$$F/P \text{ (molar)} = \frac{OD495 \times \varepsilon \text{ (Fibrinogen)} \times MG \text{ (Fibrinogen)}}{\varepsilon \text{ (FITC)} \times MG \text{ (FITC)} \times (OD280 - (0,35 \times OD495))}$$

F/P (molar) = Anzahl der gebundenen FITC-Moleküle pro Proteinmolekül

$$\text{Extinktionskoeffizient } \varepsilon \text{ (Fibrinogen)} = \frac{OD280 - (0,35 \times OD495)}{\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g/ml}]}$$

MG (Fibrinogen) = 330.000 Da

MG (FITC) = 390 Da

Extinktionskoeffizient ε (FITC) = 200

[Peters und Baumgarten, 1990]

Lösungen:

- PBS s. Kap. 3.8.1.1.
- Kopplungspuffer:

PBS	4,5 ml
pH 7,8	0,5 ml
Na ₂ CO ₃ -Lösung (5%ig)	24 μ l

3.10 Reinigung und FITC – Markierung des von Willebrand Faktors

3.10.1 Reinigung des von Willebrand Faktors

Zur Gewinnung der für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation am wirksamsten großen Multimere des vWF (Meyer et al 1993; Ruggeri und Ware, 1992), wurde eine Reinigung nach der in Herrmann et al (1997) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten Haemate[®] HS 500 Faktor VIII / vWF Kryopräzipitate (Centeon, Marburg). Die Gesamtproteinmenge betrug 200-440 mg mit einem Albuminanteil von 160-240 mg. Die Aufreinigung erfolgte durch eine Gelfiltrations-Chromatographie mit einer BioGel A-15-m-Gelsäule (BioRad, München). Das Säulenvolumen betrug dabei 800 ml. Als Äquilibriumspuffer diente ein Tris-HCl enthaltender Puffer (50 mM, pH 7,35), dem zum Schutz der vWF-Multimere vor Proteolyse die Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF; Sigma, Deisenhofen; 1 mM), Leupeptin-Hemisulfat (Sigma, Deisenhofen; 5 μ M) und Aprotinin (Trasilol[®]; Bayer, Leverkusen; 10 μ M) zugesetzt wurden.

Die Reinheit des erhaltenen von Willebrand Faktors wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Münster mittels Elektrophorese, eines von Willebrand Faktor-ELISAs und einem Assay zur Bestimmung der Ristocetin-Kofaktor-Aktivität geprüft. Zur Aufbewahrung wurde der gereinigte vWF lyophilisiert.

- Äquilibrierungspuffer: Tris (pH 7,35)	50 mM
NaCl	150 mM
tri-Natrium-Citrat	5,0 mM
PMSF	1,0 mM
Leupeptin-Hemisulfat	5,0 µM
Aprotinin	10 µM

3.10.2 Markierung des von Willebrand Faktors mit FITC

Um den gereinigten von Willebrand Faktor im Durchflußzytometer messen zu können, erfolgte dessen Markierung mit FITC leicht modifiziert nach Goto et al (1995). Dazu wurde der vWF in TBS-Puffer mit 2 mM Ca²⁺ - Zusatz (s. Kap. 3.8.1.2) gelöst und mit 5%iger Natriumcarbonatlösung auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt. FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und im Verhältnis 1:10 mit der vWF-Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur. Mittels einer mit Hepes-Puffer äquilibrierten Sephadex G-25 PD-10 Säule (Pharmacia, Freiburg) wurde das unmarkierte FITC von dem an vWF gebundenen FITC getrennt. Anschließend wurde die Säule mit 0,9%iger NaCl, versetzt mit 0,02%igem Natriumazid, gespült. Zur Bestimmung des FITC/Protein-Verhältnisses und zur Berechnung der Konzentration wurden die Proben bei 280 nm und 495 nm photometrisch gemessen und wie folgt berechnet:

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

F/P (molar) = Anzahl der gebundenen FITC-Moleküle pro Proteinmolekül

Extinktionskoeffizient ε (vWF) = 0,7

MG (FITC) = 390 Da

MG (vWF) = 250.000 Da

Extinktionskoeffizient ε (FITC) = 200

$$\text{vWF-Konzentration (mg/ml)} = \frac{OD_{280} - (0,35 \times OD_{495})}{\varepsilon \text{ (vWf)}}$$

- Hepes-Puffer:	Hepes	10 mM
pH 7,4	NaCl	140 mM

3.11 Herstellung von F(ab')₂ – Fragmenten

F(ab')₂-Fragmente wurden aus dem an die C-Domäne des von Willebrand Faktor bindenden Antikörpers anti-vWF, Subklasse IgG2a, Klon AVW-1 hergestellt. Die Präparation wurde mit Hilfe des ImmunoPure[®] F(ab')₂ PreparationKit (Pierce, Rockford) durchgeführt. Das Testprinzip ist die Spaltung von Immunglobulinen G (IgG) mittels des Enzyms Pepsin in einen Fc- und einen F(ab')₂-Teil und die darauffolgende Eliminierung der Fc-Stücke und der ungespaltenen Globuline mittels einer Protein-A-Säule.

Da Pepsin für die Antikörperklasse IgG2a ein pH-Optimum von pH 4,2 aufweist, wurde der in Phosphatpuffer + 0,02% Azid gelöste Antikörper mittels Dialyse umgepuffert. Der Dialyseschlauch (Spectra/Por, Semi Micro, 12.000-14.000 MW cutoff; Serva, Heidelberg) wurde zunächst für 15 min in Carbonatpuffer und darauffolgend 3 x für 5 min in Aqua dest gekocht und in Digestionspuffer abgekühlt. Nach dem Füllen und Verschließen des Schlauchs erfolgte die Dialyse im Digestionspuffer durch 2maligen Pufferwechsel nach einer Stunde und einmaligen Pufferwechsel nach Übernachtinkubation.

Zur Äquilibrierung des an ein Gel gebundenen Pepsins wurden 250 µl des Gels in ein 16 x 150 mm Glasröhrchen gegeben und 4 ml Digestionspuffer zugegeben. Durch Herunterdrücken des Serumseparators konnte das Gel komprimiert und der so entstandene Überstand abgegossen werden. Anschließend wurde das Gel in 500 µl Digestionspuffer aufgenommen und zur Spaltung des Antikörpers die Probe in einem Volumen von 1 ml auf das Gel aufgetragen. Die Inkubation erfolgte unter heftigem Schütteln 4 Stunden bei 37°C. Durch Herunterdrücken des Serumseparators konnten die entstandenen Fragmente vom Pepsin getrennt und als Überstand aufgefangen werden. Um die restlichen Fragmente aus dem Gel zu spülen, wurden 1,5 ml Bindungslösung aufgetragen und der Überstand dekantiert. Die so aufgefangenen F(ab')₂-Fragmente wurden mittels einer mit Bindungslösung äquilibrierten Protein-A-Säule von unverdauten IgG und Fc-Stücken getrennt.

Das Aufkonzentrieren und Umpuffern der gewonnenen Probe erfolgte mit einem Mikrokonzentrator Centricon-30 (Amicon, Witten). Die Probelösung wurde dabei durch Zentrifugation durch eine Polycarbonat-Membran ultrafiltriert, wobei Partikel mit einem MG von < 30.000 Dalton durch die Membran gelangen. Größere Partikel verbleiben im Proben-Reservoir und können auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert werden. Durch 3maliges zentrifugieren bei 1000xg für 10 Minuten

bei RT konnte die Probe auf das Volumen von 1 ml in PBS (s. Kap. 3.8.1.1) aufkonzentriert werden.

Lösungen:

- Carbonatpuffer:	Na ₂ CO ₃	200 mM
	EDTA	10 mM
- Digestionspuffer: pH 4,2	Na-Acetat	20 mM
- Bindungslösung: pH 8,0	Na ₂ -EDTA	0,1%

3.12 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - Page)

Die Elektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihren unterschiedlichen Molekulargewichten. Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergenz, denaturiert die Proteine und gibt ihnen, ihrer Masse entsprechend, eine negative Ladung, indem es alle vorhandenen Ladungen überdeckt. Die mit negativer Ladung versehenen Proteine wandern in einem angelegten Spannungsfeld bis zum Ladungsausgleich in Richtung Anode. Relativ kleine Moleküle wandern infolge des Molekularsiebeffekts dabei schneller durch die Gelporen des Acrylamidgels als Größere (Cooper, 1981; Stryer, 1990).

Für das Trenngel wurde ein 7,5 %iges Acrylamidgel (Acrylamid: ICN, Meckenheim) gegossen. Der Zusatz von Bisacrylamid ermöglicht hierbei die Quervernetzung des Gels. Um molekularen Sauerstoff, der die Polymerisation verlangsamt, zu entfernen, wurde die Lösung entgast. Durch Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators Tetramethylendiamin (TEMED) wurde die Polymerisation gestartet. Anschließend wurde die Lösung zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und zum glatten Auspolymerisieren mit Aqua bidest übergossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das überschüssige Aqua bidest abgegossen, das 4,5%ige Sammelgel aufgegossen und der Probenkamm aufgesetzt.

Das Auftragen der Probe erfolgte im nicht reduzierten Zustand. Zu 100 µl Probe wurde 10 µl N-Ethylmaleinimid (NEM)-Lösung gegeben, die Probe für 4 min bei 100°C gekocht und 5 µl der Bromphenolblau-Lösung zugegeben.

Als Molekulargewichtsmarker wurden in einer Verdünnung von 1:100 ein „high range“ - Marker im Bereich von 45 - 200 kDa und ein „low range“ - Marker im

Bereich von 14,4 - 97,4 kDa (BioRad, München) im reduzierten Zustand eingesetzt. Zu 100 µl der Markerverdünnung wurden 5 µl Dithioerythritol (DTE) gegeben und 4 min bei 100°C gekocht. Nach nochmaligem Zugabe von 5 µl DTE und 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden, zur Beseitigung von überschüssigem DTE, 10 µl Iodacetamid (IAA)-Lösung zupipettiert und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Durchlauf des Sammelgels wurde eine Spannung von 15 mA pro Gel angelegt. Hatte die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht, erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf 50 mA.

Für die anschließende Silberfärbung wurden die Proteine im Trenngel über Nacht in einer Methanol-Essig-Lösung fixiert.

Lösungen:

- Trenngel-Puffer:	SDS	7,0 mM
pH 8,8	Tris	750 mM
- Sammelgel-Puffer:	SDS	7,0 mM
pH 6,8	Tris	250 mM
- APS-Lösung:	APS	92 mM
- Trenngel (7,5%):	Acrylamid (30% (w/v)) - Bisacrylamid (0,8% (w/v))	7,5 ml
	Trenngel-Puffer	15 ml
	Aqua bidest	6,5 ml
	TEMED	15 µl
	APS	1 ml
- Sammelgel (4,5%):	Acrylamid (30% (w/v)) - Bisacrylamid (0,8% (w/v))	1,9 ml
	Sammelgel-Puffer	6,25 ml
	Aqua bidest	3,95 ml
	TEMED	15 µl
	APS	412,5 µl

- Auftragspuffer:	Harnstoff	8 M
	Tris	100 mM
	SDS	70 mM
	gelöst bei 37°C	
- NEM-Lösung:	NEM	40 mM
	in Auftragspuffer	
- DTE-Lösung:	DTE	200 mM
	in Auftragspuffer	
- IAA-Lösung:	IAA	778 mM
	in 0,5 ml Auftragspuffer und 0,5 ml BPB-Lösung	
- BPB-Lösung	BPB	14 mM
	in Auftragspuffer	

3.13 Silberfärbung

Zur Sichtbarmachung der bei der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurde eine Silberfärbung, leicht modifiziert nach Blum et al (1987), durchgeführt. Dabei werden die eingesetzten Silberionen unter dem Einfluß der Proteine zu elementarem Silber reduziert und die Proteine als dunkle Banden im Gel sichtbar.

Um die überschüssige Fixierlösung zu entfernen, wurde das über Nacht fixierte Gel zunächst 3 x für 20 min in Ethanol-Waschlösung gewaschen. Die Zugabe von Thiosulfatlösung für 1 min verhinderte eine Hintergrundfärbung. Nach 3maligem Waschen für 20 sec in A. dest. erfolgte die Färbung des Gels mittels Silbernitratlösung für 20 min. Überschüssige Färbelösung wurde durch 2maliges Waschen für 20 sec mit A. dest. entfernt. Die Entwicklung erfolgte nach Ermessen durch zweimalige Inkubation mit Entwicklerflüssigkeit und wurde durch Zugabe der Stopplösung für 2 min abgestoppt. Zum Schluß wurde das Gel für 10 min mit Fotofixierlösung fixiert und mindestens 30 min in A. dest. gewaschen.

Lösungen:

- Gelfixierlösung:	Methanol	12,5 M
	Eisessig	1,667 M
- Ethanol-Waschlösung:	Ethanol	6,522 M
	in A. dest.	

- Thiosulfatlösung:	Thiosulfat	0,8 mM
- Entwicklerlösung:	Natriumcarbonat	566 mM
	Thiosulfat	16 µM
	Formaldehyd	5 mM
- Stopplösung:	EDTA	13 mM
- Foto-Fixierlösung:	Tetenal (Tetenal Photowerke, Norderstedt)	10% (v/v)

3.14 Adhäsionsassay an Polymeroberflächen

Um eine Untersuchung der Thrombozyten-Bakterien-Assoziation nicht nur an Thrombozyten in Suspension, sondern auch an Oberflächen gebundenen Plättchen durchführen zu können, wurden Thrombozyten an Polymethylmethacrylat (PMMA)-Scheibchen gebunden und die Adhäsion von radioaktiv markierten *S. aureus* mittels eines β - Szintillationszählers ermittelt. Die Methode wurde dabei leicht modifiziert nach Herrmann et al (1993) durchgeführt.

3.14.1. Radioaktivmarkierung der Bakterienzellen

10 µl aus der in Kapitel 3.5 beschriebenen Übernachtskultur wurden in 1 ml frische, mit 50 µCi [3 H]-Thymidin-Lösung (Amersham-Buchler, Braunschweig) angereicherte Müller-Hinton-Bouillon (Mast, Reinfeld) überimpft und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde nicht gebundenes Thymidin durch 2maliges Waschen mit PBS-Puffer (s. Kap. 3.8.1.1) mittels Zentrifugation 1 min bei 6000xg und RT entfernt und das Pellet in 1ml Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität wurden 10 µl der Bakteriensuspension im β -Szintillations-Zählgerät auf ihren Radioaktivitätsgehalt überprüft. Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe von 1:1000 bis 1:1.000.000 angesetzt, daraus je 10 µl auf Müller-Hinton-Agar (Mast, Reinfeld) im 8-Ösen-Ausstrich ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Durch Auszählung der Bakterien konnten die koloniebildenden Einheiten (cfu) pro ml berechnet werden, welche zwischen 1×10^7 und 1×10^8 cfu/ml liegen sollten.

- Müller-Hinton-Bouillon: sauerhydrolysiertes Casein		
pH 7,4	(RM30)	17,5 g/l
	Stärke	1,5 g/l
	Herz-Extrakt	5,0 g/l

3.14.2 Bindung der Thrombozyten an die PMMA - Scheibchen („coverslips“)

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden aus PMMA-Platten (Vink, Emmerich) 0,7 x 0,7 cm große Scheibchen mit einer Dicke von 1 mm geschnitten. Diese wurden für 10 min bei 37 °C in mit 1 ml Methanol (absolut) gefüllten Röhrchen gereinigt und entfettet und nach Absaugen des Alkohols bei 100°C für 20 min getrocknet und sterilisiert.

Die Thrombozyten wurden aus Citrat-Blut mittels Gelfiltration (s. Kap. 3.7.2) gereinigt und auf 150.000 Zellen/ μ l (s. Kap. 3.7.3) eingestellt. Als Äquilibriumspuffer diente hierzu nachfolgend beschriebener Tyrode-Hepes-Puffer ohne HSA (Human Serum Albumin). Das weiterhin für den Versuch benötigte Plasma konnte durch Zentrifugation von Citrat-Blut bei 1300xg für 10 min bei RT und Abpipettieren des Überstandes gewonnen werden.

Das Aufbringen der Thrombozyten auf PMMA-Scheibchen wurde zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu wurden 40 μ l der Thrombozyten-Suspension auf die Scheibchen gegeben und für 15 min bei 36 °C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Thrombozyten wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt und durch 40 μ l Tyrode-HSA Puffer ersetzt und nochmals für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Absaugen wurden die „coverslips“ in 960 μ l Tyrode-HSA-Puffer, dem 2 mM Ca^{2+} zugesetzt wurde (THCa²⁺-Puffer), enthaltende Röhrchen überführt. Folgende Ansätze wurden im Versuch durchgeführt:

1. THCa²⁺-Puffer + Tz-freies Coverslip (bestimmt die unspezifische Bindung)
2. THCa²⁺-Puffer + Tz-freies Coverslip + 0,5 % (v/v) Plasma
3. THCa²⁺-Puffer + Tz-gecoatetes Coverslip
4. THCa²⁺-Puffer + Tz-gecoatetes Coverslip + 0,5 % (v/v) Plasma

Die Ansätze 2-4 wurden jeweils noch mit Zusatz von 1 I.E./ml Faktor VIII (Beriate[®]HS1000; Centeon, Marburg) durchgeführt.

- Tyrode-Hepes-Puffer:	NaCl	127 mM
pH 7,3	KCl	2,7 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaH ₂ PO ₄	3,3 mM
	Hepes Salz	10,5 mM
	Hepes Säure	4,4 mM
	D(+)-Glucose	5,5 mM
	HSA (20%ige Lsg.)	5 ml/l
	ggf. Ca ²⁺	2 mM

3.14.3 Koinkubation von Thrombozyten und Bakterien

Zur Koinkubation von Thrombozyten und Bakterien wurden je 40 µl Bakterien-suspension (s.Kap. 3.15.1) zu den Coverslips gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Durch 2maliges Waschen mit PBS wurden die ungebundenen Bakterien entfernt. Nach Überführung der „coverslips“ in 5 ml Szintillationsflüssigkeit enthaltende Szintillationsröhrchen (UltimaGold[®], Packard Inc., Dreieich), erfolgte die Messung im β-Szintillationsgerät.

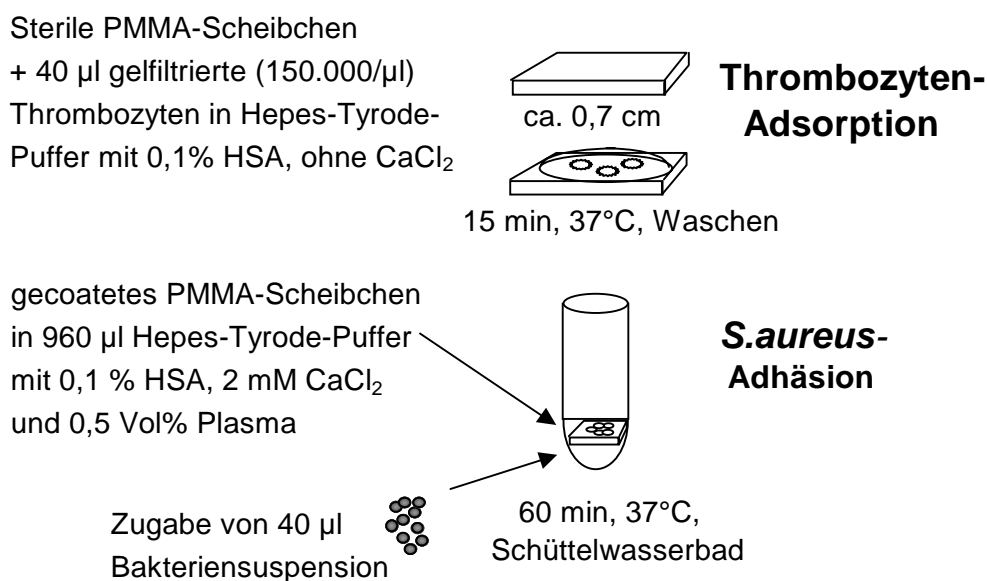


Abb.3-2: Experimenteller Ansatz (Versuchsbedingung Nr. 4) zur Bestimmung der Adhäsion von *S. aureus* an PMMA-adsorbierte Thrombozyten (modifiziert nach PD Dr. M. Herrmann)

3.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen erfolgte mittels eines auf der von Smith et al (1985) und Wiechermann et al (1988) beschriebenen Bicinchoninicsäure (BCA)-Methode basierenden Kits (Pierce, Niederlande).

Im alkalischen Milieu kommt es durch die Proteine zu einer Reduktion von zweiwertigen (Cu^{2+}) in einwertige Kupferionen (Cu^+). Diese nun an die Proteine bindenden Cu^+ -Ionen bilden mit Bicinchoninicsäure einen violetten Farbkomplex, dessen Intensität bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch bestimmt werden kann. Über die Erstellung einer Standardreihe kann dann die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

Die Erstellung der Standardreihe erfolgte mittels der BSA (bovines Serumalbumin)-Lösung in einem Konzentrationsbereich von 100 $\mu\text{g/ml}$ bis 1200 $\mu\text{g/ml}$. Als Verdünnungslösung und als Leerwert wurde dabei PBS (s. Kap. 3.8.1.1) verwendet. Je 100 μl Standardproteinlösung bzw. Probe wurden mit 2 ml BCA-Reagenz gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die photometrische Messung der Proben erfolgte (aus technischen Gründen) bei einer Wellenlänge von 578 nm.

Lösungen:

- | | | |
|--------------------|---|----------|
| - BSA-Stammlösung: | BSA | 2% (w/v) |
| | NaCl | 155 mM |
| | NaN ₃ | 8 mM |
| - Test-Reagenz A: | Na ₂ CO ₃ | |
| | Na ₄ (CO ₃) ₂ | |
| | Bicinchoninicsäure | |
| | Na-Tartrat | |
| | → Zusammensetzung nach Angaben des Herstellers in 0,2 N Natronlauge | |
| - Test-Reagenz B: | CuSO ₄ | 128 mM |
| - BCA-Reagenz: | 49 ml Reagenz A + 1 ml Reagenz B | |

3.16 Aufreinigung chromosomaler DNA aus Vollblut

Die Aufreinigung der DNA aus EDTA-Vollblut erfolgte mittels des QIAamp[®]DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden). Dabei erfolgt durch Zugabe von Proteasen zunächst eine Lyse der Zelle. Ein Zentrifugationsschritt ermöglicht die Bindung der DNA an eine Silikatgel-Membran, an welcher durch definierte Salz- und pH-Verhältnisse andere Proteine und Kontaminanten nicht haften können. Diese Substanzen werden durch Waschen entfernt. Unter Zugabe eines Lösungspuffers wird die gereinigte DNA von der Membran gelöst und kann mittels Zentrifugation im Filtrat aufgefangen werden.

200 µl Vollblut und 200 µl AL-Puffer (laut Hersteller) wurden mit 20 µl Protease versetzt, leicht durchmischt und 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100%) wurde die Suspension auf die in einem Zentrifugenröhrchen befindliche Membran aufgebracht und bei 6000xg für 1 min zentrifugiert. Zum Waschen wurden 500 µl AW1-Puffer (laut Hersteller) aufpipettiert und erneut bei 6000xg 1 min zentrifugiert. Nach Aufbringen von 500 µl AW2-Puffer (laut Hersteller) erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 20.000xg für 3 min. Das die Kontaminanten enthaltende Zentrifugat wurde dabei jeweils verworfen. Das Lösen der DNA von der Membran erfolgte durch Aufpipettieren von 200 µl bei 56 °C vorgewärmten AE-Puffer (laut Hersteller). Nach 1minütiger Inkubation und Zentrifugation von 1 min bei 6000xg konnte die im Zentrifugat enthaltene DNA aufgefangen werden.

Der DNA-Gehalt und deren Reinheit konnte über eine photometrische Messung bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Dabei ergibt sich die Reinheit aus dem Verhältnis der Absorption (A) bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm. Der Quotient aus A_{260} / A_{280} sollte dabei einen Wert von 1,7 - 1,9 aufweisen. Der DNA-Gehalt konnte aus der Tatsache berechnet werden, daß eine Absorption von 1 bei 260 nm einem Gehalt von 50 ng/µl DNA entspricht d. h. die Absorptionsdifferenz zwischen A. dest. und 50 ng/µl DNA ist gleich 1.

Lösungen: wurden nach Herstellervorschrift verwendet

3.17 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde modifiziert nach Carlsson et al (1998) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte dabei mittels einer verschachtelten („nested“) PCR. Hierbei dient das in der ersten PCR entstandene DNA-Molekül als Matrize für die zweite PCR. Da die Primer in der zweiten PCR innerhalb des vom ersten Primerpaar vorgegebenen Abschnitts hybridisieren und damit nahezu alle unspezifischen Kopien der

ersten PCR unberücksichtigt bleiben, ergibt sich eine sehr hohe Spezifität (Newton et al, 1994).

Folgende Primer (MWG-Biotech, Ebersberg) kamen zum Einsatz:

P63: 5` - CAA GCC TCT GGT CAA GGT C - 3`

P52: 5` - GAA GAG CTG CCC ATG CTG - 3`

Fc γ RIIa spezifische Primer (Osborne et al, 1994), welche ein 1000 Basenpaar (bp) -Produkt ergaben

CRP-I: 5` - CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG - 3`

CRP-II: 5` - GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA - 3`

Primer für die interne Positivkontrolle mit einem 440 bp - Produkt aus dem C-reaktiven Protein (CRP)-Gen

P13: 5` - CTA GCA GCT CAC TCC TC - 3`

P5G: 5` - GAA AAT CCC AGA AAT TTT TCC **G** - 3`

spezifisch für das Fc γ RIIa - R131 - Allel

P4A: 5` - GAA AAT CCC AGA AAT TTT TCC **A** - 3`

spezifisch für das Fc γ RIIa - H131 - Allel

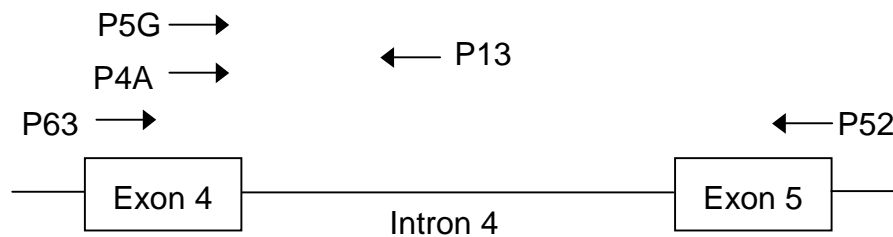


Abb. 3-3. Schematische Darstellung der Primerlokalisierung (Carlsson et al, 1998)

In der ersten PCR wurden die Positivkontrollen (CRP-I und CRP-II) und die Primer P52, P63 in getrennten Ansätzen folgendermaßen eingesetzt:

Taq-Polymerase - Puffer 10fach	10 μ l
dNTP - Mischung (Stammlsg. 10 mM)	2 μ l
Primer P63 bzw. CRP-I (100pmol/ μ l)	1 μ l
Primer P52 bzw. CRP-II (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l
DNA	100 ng
A. bidest	auffüllen auf 100 μ l

Die Taq-Polymerase und der Taq-Polymerase-Puffer wurden bezogen von Boehringer, Mannheim; die dNTP-Mischung von Perkin Elmer, Vaterstetten.

PCR-Protokoll: je 1 Zyklus bei 95°C für 5 min, 61°C für 5 min und 72°C für 5 min
35 Zyklen bei 95°C für 1 min, 61°C für 1 min und 72°C für 2 min
1 Zyklus bei 72°C für 10 min

In der zweiten PCR wurden pro erhaltenem Amplikon zwei Ansätze nach folgenden Bedingungen gefahren:

Taq-Polymerase - Puffer 10fach	10 µl
dNTP - Mischung (Stammlsg. 10 mM)	2 µl
Primer CRP-I (0,02 pmol/µl)	1 µl
Primer CRP-II (0,02 pmol/µl)	1 µl
Primer P13 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer P5G bzw. P4A (10 pmol/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Amplikons	je 0,5 µl aus den beiden Ansätzen der ersten PCR
A. bidest	82,5 µl

PCR-Protokoll: 1 Zyklus bei 95°C für 5 min
30 Zyklen bei 95°C für 15 sec, 58°C für 30 sec und 72°C für 30 sec
1 Zyklus bei 72°C für 10 min

3.18 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Ergebnisse wurden die Proben auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Dazu wurde die entsprechende Menge Standard-Agarose (Molekulargröße > 120 kDa; Auftrennungsbereich: 400-8000 bp; Appligene oncor, Heidelberg) in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgekocht und in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erhärten des Gels wurden 10 µl der Proben 1:1 mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Von der Markerverdünnung wurden 10 µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 Volt bzw. 400 mA. Anschließend wurde das Gel 15 min in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml; Sigma, Deisenhofen) gefärbt und unter UV-Licht begutachtet.

Lösungen:

- TAE-Puffer (50-fach):	Tris	2,0 M
pH 8,2	Essigsäure	1,0 M
	EDTA	0,1 M
- Probenpuffer:	N-Lauroyl-Sarcosine	17 mM
	EDTA	0,5 M
	Glycerin	0,31 M
	TAE-Puffer (x50)	2 %
	Bromphenolblau	0,75 mM
- Markerverdünnung:	TAE-Puffer (1x)	750 µl
	Probenpuffer	200 µl
	Marker1 + 2	je 25 µl

Marker 1= 100 bp DNA ladder (Biolabs, New England)

Marker 2 = 1 kb DNA ladder (Biolabs, New England)

3.19 Statistik

Die Signifikanzen in den Untersuchungen zur Rolle des FcRIIA-Genpolymorphismus (Kapitel 4.5.3.2) wurden unter Verwendung des exakten Fisher-Tests berechnet. Zur Berechnung weiterer Signifikanzen wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewandt.

4 Ergebnisse

4.1 Durchflußzytometrische Bestimmung der Thrombozyten - *Staphylococcus aureus* - Assoziante

Für die durchflußzytometrische Untersuchung der Assoziante aus Thrombozyten und Bakterien war es notwendig, eine Methode zu entwickeln, die die Verwendung eines Durchflußzytometers mit nur einem Anregungslaser erlaubte. Dabei mußte die Markierung von Thrombozyten und Bakterien so gewählt werden, daß die Fluoreszenzfarbstoffe mit der vom Laser ausgesandten Wellenlänge von 488 nm anregbar waren, diese aber in ihrer Emission so weit auseinanderlagen, daß eine Unterscheidung der beiden Zellpopulationen möglich wurde. In dieser Arbeit wurden für die Markierung der Thrombozyten mit dem Fluorochrom Phycoerythrin (PE) markierte Antikörper, für die Markierung der Bakterien ein Farbstoff gewählt, der im Bereich von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert.

Abb. 4-1 zeigt eine Dot plot - Darstellung, in der Bakterien- und Thrombozytenpopulation durch ihre unterschiedliche Markierung deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Bakterienbindende Thrombozyten können als Zellen identifiziert werden, welche die Fluoreszenz des Plättchen- als auch des Bakterienmarkers aufweisen.

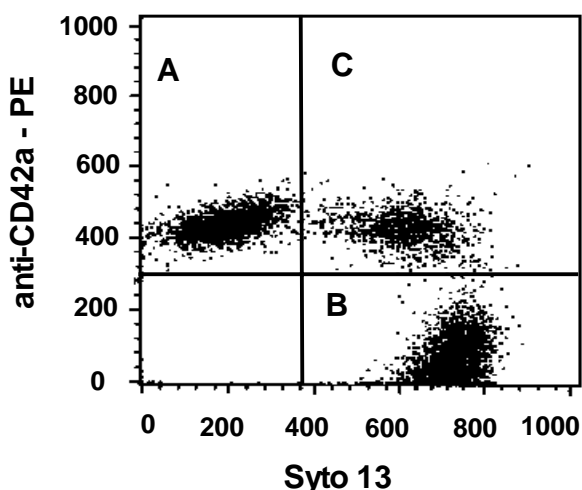


Abb. 4-1: Dot plot - Darstellung der Thrombozyten - Bakterien-Assoziation.

A: Thrombozyten markiert mit PE-konjugiertem anti - GPIX - Antikörper (CD42a)

B: Bakterien markiert mit Syto 13

C: Zellen, welche beide Fluoreszenzen tragen, werden als Bakterien-Thrombozyten-Assoziante identifiziert

4.1.1 Bakterienmarkierung mit dem Nukleinsäurefarbstoff Syto 13

Zur Bakterienmarkierung wurde ein Nukleinsäuren-markierender Farbstoff (Syto 13) verwendet, dessen Emmissionsmaximum bei 525 nm liegt.

Abb. 4-2/A zeigt die konzentrationsabhängige Anbindung des Nukleinsäurefarbstoffes an die Bakterien mit Sättigung bei einer Konzentration von 2 μM . Wie aus Abb. 4-2/B ersichtlich wird, kommt es zu einer sofortigen Bindung des Farbstoffes an die Nukleinsäuren, welche durch eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht gesteigert werden kann. Daher wurde eine ausreichende Inkubationszeit von 10 min und eine Konzentration von 2 μM für weitere Experimente gewählt.

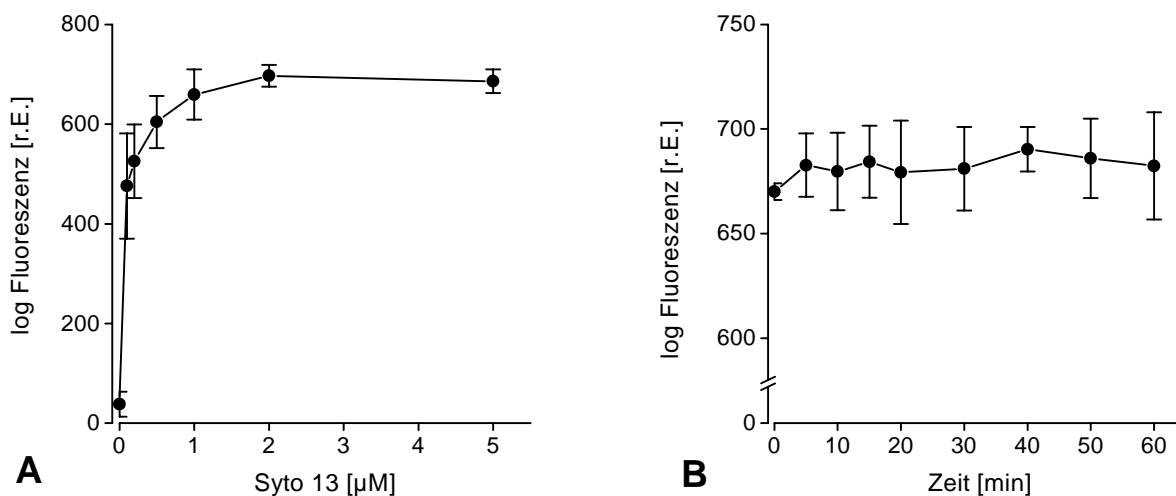


Abb. 4-2: Bindung des Nukleinsäurefarbstoffes Syto 13 an *Staphylococcus aureus* (A) in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration und (B) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Werte stellen die Mittelwerte der logarithmischen Mediane \pm S. D. von drei jeweils unabhängigen Experimenten dar.

4.1.2 Thrombozytenmarkierung mittels Phycoerythrin - markierter Antikörper

Die Markierung der Thrombozyten erfolgte mittels Phycoerythrin (PE) markierter monoklonaler Antikörper deren Emissionsmaximum bei 578 nm liegt. Für humane Thrombozyten wurde ein gegen das plättchenspezifische Glykoprotein IX gerichteter Antikörper (anti-GPIX, anti-CD42a, Klon ESS), für murine Plättchen ein mit der Integrin β_3 -Kette (anti-CD61, Klon 2C9.G2) reagierender Antikörper eingesetzt. Für beide Antikörper ergab sich ein dosisabhängiger Anstieg der Bindung, welcher im Durchflußzytometer über den Median der Fluoreszenz 2 (PE-Signal) bestimmt wurde (Abb. 4-3A/B).

In den folgenden Versuchen wurde der anti-CD42a-Antikörper in einer Konzentration von 0,75 µg/ml und der anti-CD61-Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

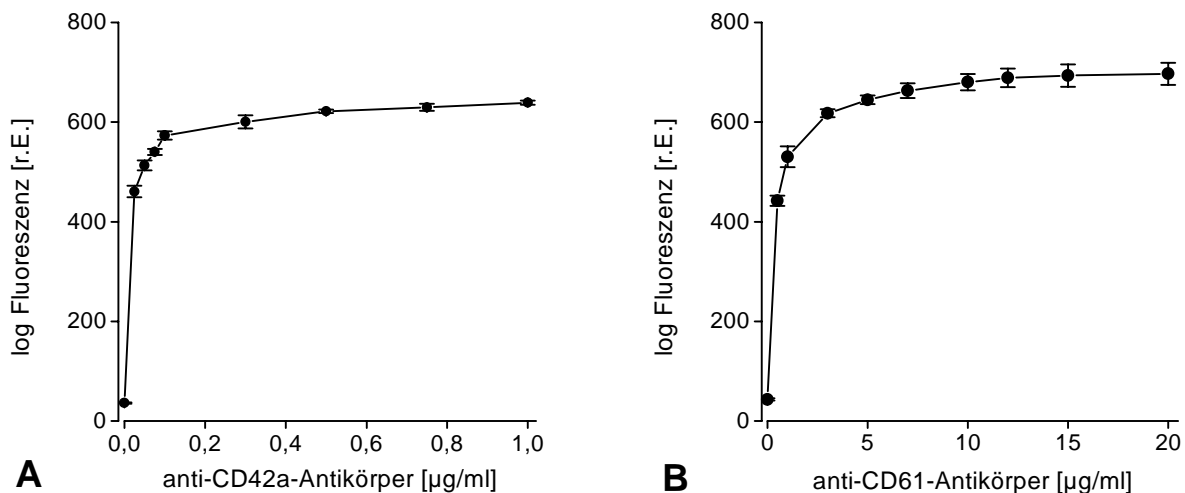


Abb. 4-3: Markierung von Thrombozyten mittels Phycoerythrin (PE)-markierter monoklonaler Antikörper.

A: Markierung humaner Thrombozyten mittels eines anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers (anti-CD42a)

B: Markierung muriner Thrombozyten mittels einem mit der Integrin β_3 -Kette reagierenden Antikörper (anti-CD61).

Die Werte geben den Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3) wieder.

4.1.3 Bestimmung des Thrombozyten - *Staphylococcus aureus* - Verhältnisses

Zur Untersuchung der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation ist es notwendig, ein Thrombozyten-Bakterien-Verhältnis zu wählen, bei dem die Assoziationsrate möglichst hoch liegt. So kann bei Einsatz von assoziationshemmenden Substanzen eine Abnahme der Assoziation genauer verifiziert werden. Gleichzeitig muß jedoch darauf geachtet werden, daß die Bakterienzahl so niedrig gewählt wird, daß die Keime noch vereinzelt vorliegen, da eine Aggregation der Keime zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Zur Bestimmung des Thrombozyten-Bakterien-Verhältnisses wurden nicht aktivierte, sowie mit 0,2 U/ml Thrombin aktivierte Thrombozyten im PRP mit *S. aureus* Newman inkubiert. Um eine zeitlich definierte Aktivierungsphase zu erhalten, wurde die Aktivierung der Plättchen nach 3 min mit Formaldehyd bzw. Hirudin abgestoppt.

Wie Abb. 4-4 zeigt, stieg die Zahl der Assoziate mit Erhöhung des Bakterien-Thrombozyten-Verhältnisses.

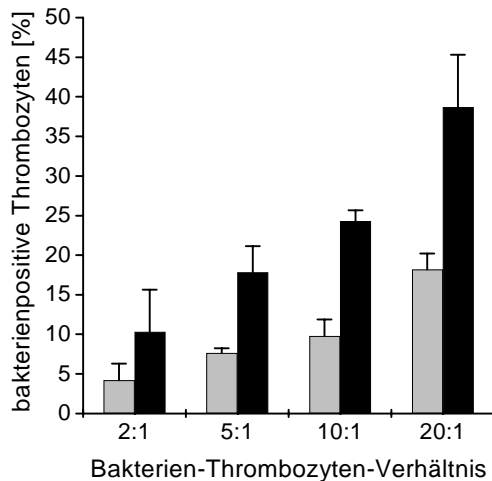


Abb. 4-4: Adhäsion von *S. aureus* Newman an Thrombozyten unter Verwendung unterschiedlicher Bakterien-Thrombozyten-Verhältnisse. Die Werte bilden den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=4).

- nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)

Durch Darstellung der Zellgrößen über den FSC („forward-scatter“) im Durchflußzytometer (Abb. 4-5A/B) wird jedoch deutlich, daß die Erhöhung der Bakterienanzahl zu einer Erhöhung des FSC der Bakterienpopulation führt. Dies bedeutet, daß es bei einem Bakterien-Thrombozyten-Verhältnis von 20:1 (Abb. 4-5/B) zu einer deutlichen Aggregation der Keime kommt, welche bei einem Verhältnis von 10:1 (Abb. 4-5/A) wesentlich geringer auftritt. Für weitere Versuche wurde deshalb ein *S. aureus*-Thrombozyten-Verhältnis von 10:1 gewählt.

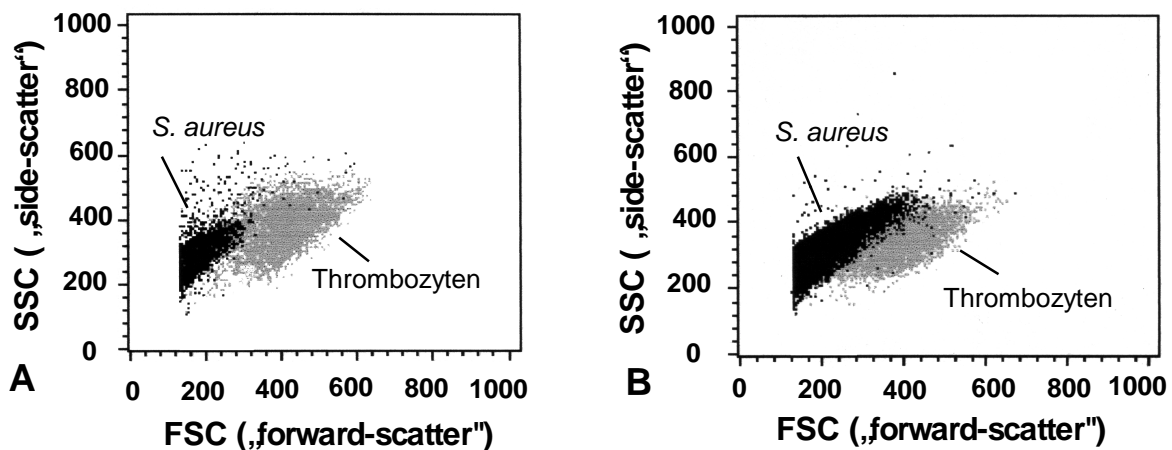


Abb. 4-5: Dot plot-Darstellung von Thrombozyten und *S. aureus* im Durchflußzytometer. Die Unterscheidung der beiden Zellpopulationen erfolgt über die Zellgröße anhand der Höhe des „forward-scatters“ (FSC).

A: *S. aureus* -Thrombozyten -Verhältnis 10:1

B: *S. aureus* -Thrombozyten -Verhältnis 20:1

4.1.4 Einfluß der Koinkubationsdauer auf die Assoziation

Nach welcher Zeit die Bindung von Bakterien an Thrombozyten abgeschlossen ist, wurde anhand einer Zeitkinetik am Beispiel *S. aureus* 8325-4 ermittelt. Thrombozyten aus dem PRP und nach Gelfiltration wurden hierzu mit 0 U/ml und 1 U/ml Thrombin aktiviert und die Aktivierung nach 3 min mit Hirudin gestoppt. Wie in Abb. 4-6A/B dargestellt, kommt es nach Zugabe der Bakterien zu den Thrombozyten zu einer sofortigen Bindung der beiden Partner, die auch bei Verlängerung der Koinkubationszeit bis zu 30 min nicht gesteigert werden kann. Dabei zeigen sich keine Unterschiede zwischen Thrombozyten aus dem PRP und nach Gelfiltration. Für weitere Untersuchungen wurde, um gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten, eine Koinkubationszeit von 10 min gewählt.

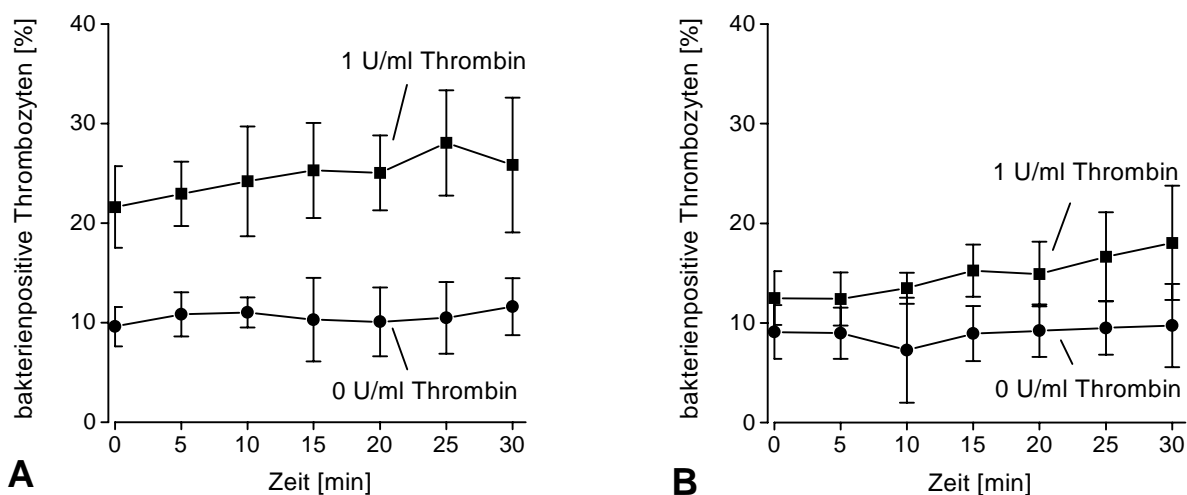


Abb. 4-6: Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation in Abhängigkeit von der Koinkubationszeit. Die Messung erfolgte jeweils an nicht aktivierten und aktivierten (1 U/ml) Thrombozyten unter Vorhandensein von Plasmaproteinen (A) und nach Entfernung der Plasmaproteine mittels Gelfiltration (B). Zur Koinkubation wurde *S. aureus* 8325-4 verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3).

4.1.5 Einfluß der Bakterienwachstumsphase auf die Assoziation

Zur Untersuchung, welche Adhäsine auf der Bakterienoberfläche für die Interaktion zwischen Thrombozyten und *S. aureus* verantwortlich sind, ist es notwendig, bei allen Experimenten eine vergleichbare Oberfläche der Bakterien zu gewährleisten. Da die Expression von *S. aureus*-Adhäsinen in den unterschiedlichen Wachstumsphasen variiert, sollte untersucht werden, wie sich das Alter bzw. die Wachstumsphase der Bakterien auf die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten auswirkt. Hierzu wurde *S. aureus* Stamm 8325-4 für zwei Stunden, einen, fünf und zehn Tage in Herz-Hirn-Bouillon bei 37°C bebrütet und anschließend die Bindung der Bakterien an Thrombozyten bestimmt. Die Thrombozyten wurden ohne (0 U/ml) und mit (0,2 U/ml) Thrombinaktivierung eingesetzt, und die Aktivierung nach 3 min durch Formaldehyd abgestoppt.

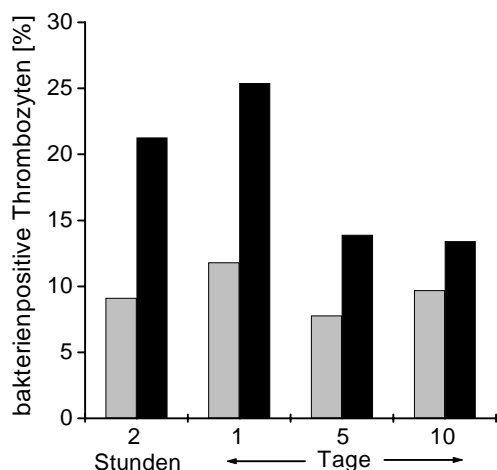


Abb. 4-7: Einfluß der Bakterienwachstumsphase auf die Assoziation. Zur Koinkubation mit den Thrombozyten wurde *S. aureus* Stamm 8325-4 nach unterschiedlichen Wachstumszeiten verwendet. Die Werte zeigen den prozentualen Anteil bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation (n=1).

□ nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
 ■ aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)

Wie aus Abb. 4-7 ersichtlich wird, binden aktivierte Thrombozyten Bakterien mit einer Wachstumsdauer von zwei Stunden mit einer Assoziationsrate von 21 %. Mit Bakterien, welche einen Tag gewachsen waren, konnte eine Assoziationsrate von 25,5 % erzielt werden. Wurden die Bakterien fünf bzw. zehn Tage bebrütet, zeigte sich mit aktivierten Thrombozyten eine deutlich niedrigere Assoziationsrate von 13,9 % bzw. 13,4 %.

4.2 Einfluß des Thrombozytenaktivierungszustandes auf die Assoziation

Die Aktivierung der Thrombozyten durch unterschiedliche Agonisten bewirkt weitgehende Veränderungen der Plättchen. Inwieweit diese Veränderungen für die Anbindung der Bakterien an die Thrombozyten von Bedeutung sind, sollte in folgenden Versuchen ermittelt werden. Thrombozyten im PRP und nach Gelfiltration wurden durch Thrombin unterschiedlich stark aktiviert (0,2 U/ml und 1 U/ml) und mit *S. aureus* Stamm Newman für 10 min koinkubiert. Um die Reaktionsbedingungen möglichst physiologisch zu gestalten, wurde auf ein Abstoppen der Aktivierung durch Hirudin oder Formaldehyd verzichtet.

Es konnte gezeigt werden (Abb. 4-8), daß sich die Assoziationsrate mit zunehmender Plättchenaktivierung erhöhte. Gelfiltrierte Thrombozyten banden bei Aktivierung mit 0,2 U/ml Thrombin $1,66 \pm 0,33$ und mit 1 U/ml Thrombin $2,55 \pm 1,09$ mal mehr Staphylokokken als nicht aktivierte Thrombozyten. Im Gegensatz zu nicht aktivierten Plättchen banden im PRP mit 0,2 U/ml aktivierte Plättchen $1,7 \pm 0,4$ und mit 1 U/ml Thrombin aktivierte Plättchen $7,1 \pm 1,72$ mal mehr Bakterien.

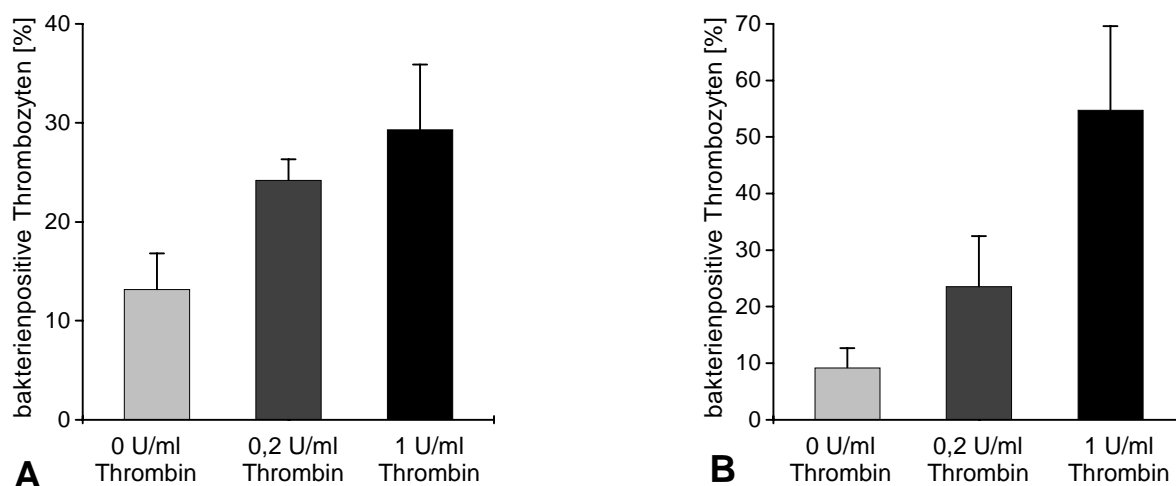


Abb. 4-8: Einfluß des Thrombozytenaktivierungszustandes auf die Thrombozyten - *S. aureus* - Assoziation. Gelfiltrierte Thrombozyten (A) und Thrombozyten im PRP (B) wurden mit Thrombin unterschiedlich stark aktiviert und mit *S. aureus* Stamm Newman für 10 min koinkubiert. Die Werte stellen den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. dar (0 U/ml Thrombin: n=14; 0,2 U/ml Thrombin: n=6; 1 U/ml Thrombin: n=8).

4.3 Einfluß von Plasmaproteinen auf die Assoziation

4.3.1 Untersuchung von Thrombozyten im PRP und nach Gelfiltration

Um den Einfluß von Plasmaproteinen auf die Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation zu bestimmen, wurde die Bindung von *S. aureus* Newman an Plättchen bei Vorhandensein von Plasmaproteinen (PRP) und nach Entfernung von Plasmaproteinen (gelfiltrierte Plättchen) verglichen (Abb. 4-9). In beiden Fällen wurden die Thrombozyten vor der Zugabe der Bakterien mit 1 U/ml Thrombin aktiviert. Die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten aus dem PRP, d. h. bei Vorhandensein von Plasmaproteinen, war hierbei um das $1,84 \pm 0,6$ fache höher als an gelfiltrierte Thrombozyten, die sich in plasmaproteinfreiem Milieu befanden.

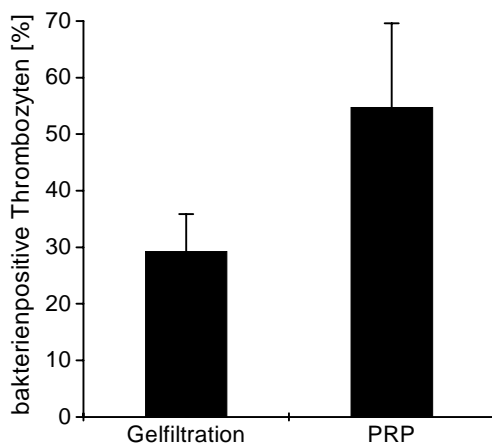


Abb. 4-9: Einfluß von Plasmaproteinen auf die Thrombozyten - *S. aureus* - Assoziation. Thrombozyten aus dem PRP und nach Gelfiltration wurden mit 1 U/ml Thrombin aktiviert und mit *S. aureus* Newman kokubiert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytensamtpopulation \pm S.D. (n=8).

4.3.2 Einfluß einzelner Adhäsionsproteine auf die Assoziatbildung

Wie in den Kapiteln 4.2 und 4.3.1 dargelegt, spielt für die Assoziation sowohl die Aktivierung der Thrombozyten als auch das Vorhandensein von Plasmabestandteilen eine Rolle. Es sollte nun weiter untersucht werden, welche Adhäsionsproteine aus Plasma bzw. Plättchen-Granula die Bindung der Bakterien an die Thrombozyten ermöglichen bzw. verstärken. Dazu wurden die Thrombozyten mittels Gelfiltration von den Plasmabestandteilen gereinigt und das jeweilige Adhäsionsprotein den einzelnen Versuchsansätzen zugesetzt. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte durch Zugabe von 1 U/ml Thrombin bzw. bei Einsatz des von Willebrand Faktors (vWF), durch Zugabe von 2 mg/ml Ristocetin. Nach Kokubation der Plättchen mit *S. aureus* Newman konnte die Assoziationsrate durchflußzytometrisch erfasst werden. Als Referenzwert wurde der Versuch

parallel an Thrombozyten aus dem PRP und an gelfiltrierten Thrombozyten ohne Zugabe eines Adhäsionsproteins durchgeführt.

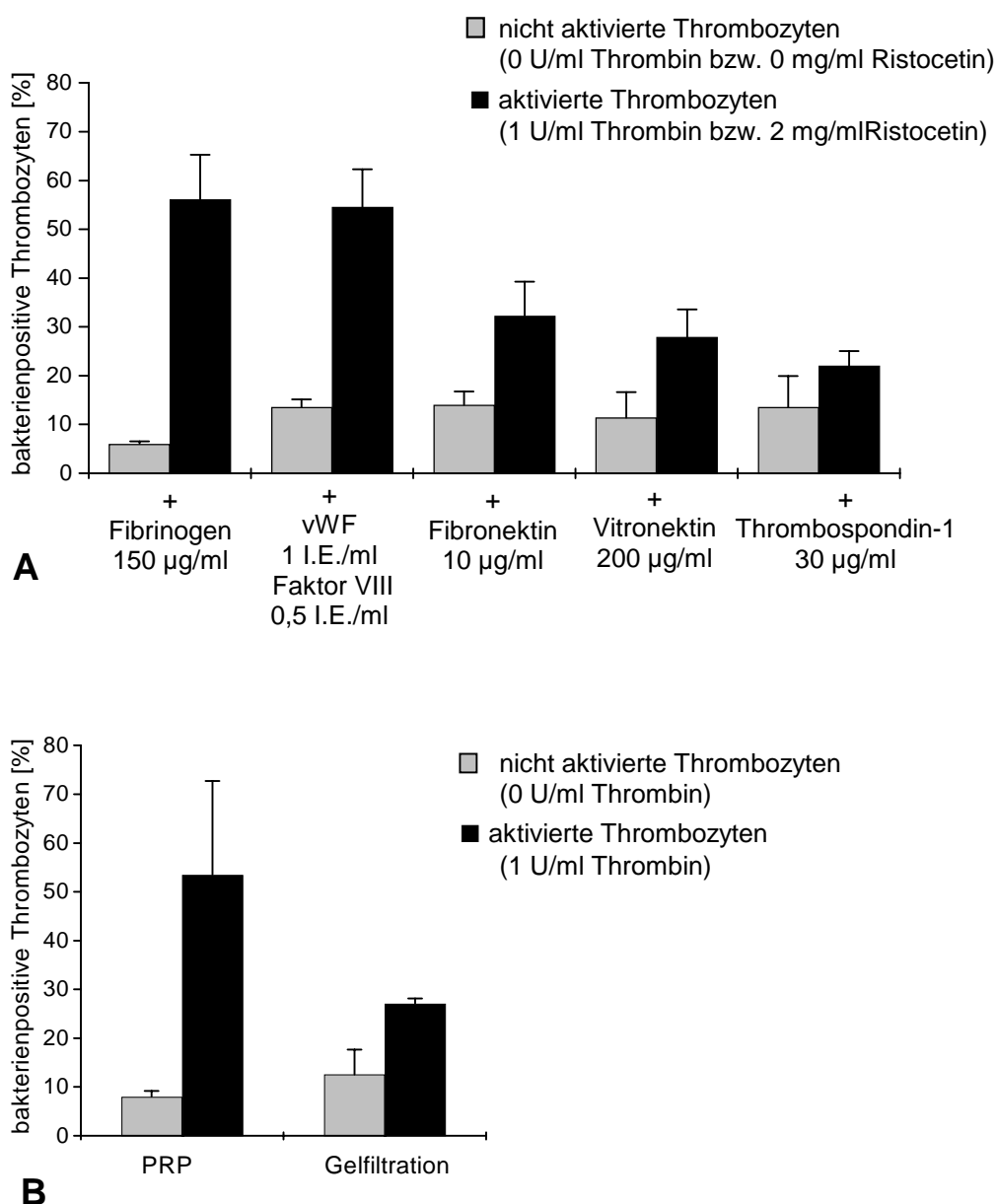


Abb. 4-10: A: Einfluß einzelner Adhäsionsproteine auf die Assoziation von *S. aureus* mit Thrombozyten. Die Thrombozyten wurden mittels Gelfiltration von Plasmaproteinen gereinigt und einzelne Proteine dem Ansatz wieder zugefügt. Die Aktivierung erfolgte mit Ausnahme bei der vWF-Zugabe (Ristocetin) mit Thrombin. Als Assoziationspartner wurde *S. aureus* Stamm Newman verwendet.

B: Messung der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation im PRP und nach Gelfiltration.

Sämtliche Werte geben den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) wieder.

Abb. 4-10/A ist zu entnehmen, daß die Aktivierung der Thrombozyten zu einer Erhöhung der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation führte. Diese war jedoch bei Zusatz der Adhäsionsproteine Fibrinogen und vWF/FaktorVIII deutlich größer als bei Zugabe von Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin-1. Im Vergleich mit Abb. 4-10/B wird deutlich, daß durch Zugabe von Fibrinogen und vWF/FaktorVIII eine Assoziationsrate erreicht wurde, die sich im Bereich der Assoziationsrate mit Plättchen aus dem PRP befand. Durch Zusatz von Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin-1 konnte dieses Niveau nicht erreicht werden. Nach Zugabe von Vitronectin und Thrombospondin-1 lag die Assoziationsrate im Bereich von gelfiltrierten Thrombozyten (Signifikanzen siehe Tabelle 4-1).

Adhäsionsproteine \ Medium	Plasma + Puffer (PRP)	Gelfiltrationspuffer
Fibrinogen	$p > 0,5$	$p < 0,005$
vWF/FaktorVIII	$p > 0,5$	$p < 0,005$
Fibronectin	$p > 0,1$	$p > 0,1$
Vitronectin	$p > 0,05$	$p > 0,5$
Thrombospondin-1	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Tabelle 4-1: Darstellung der Signifikanzen zwischen der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziationsrate aktivierter gelfiltrierter Plättchen nach Zugabe einzelner Adhäsionsproteine und der Assoziationsrate mit Plättchen aus dem PRP bzw. nach Gelfiltration.

4.3.3 Fibrinogen als Brückenbildner

In Kapitel 4.3.2 wurde gezeigt, daß die Zugabe von Fibrinogen zu einer Erhöhung der Assoziationsrate führte. Im Folgenden sollte daher die Rolle des Fibrinogens für die Assoziation genauer untersucht werden.

4.3.3.1 Fibrinogenbindung an Thrombozyten

Die Fähigkeit der Thrombozyten Fibrinogen zu binden, wurde durch Zusatz von FITC-konjugiertem Fibrinogen zu den Thrombozyten untersucht. Plättchen im PRP wurden mit Fibrinogen-FITC (150 µg/ml) versetzt, mit steigenden Mengen Thrombin aktiviert und die Aktivierung nach 3 min mit Formaldehyd abgestoppt. Die gebundenen Fibrinogenmoleküle wurden im Durchflußzytometer anhand des Medians der Fluoreszenz 1 (FITC-Signal) bestimmt.

Es ergab sich ein mit steigender Aktivierung der Thrombozyten einhergehender Anstieg der Fibrinogenbindung. Ab einer Konzentration von 0,1 U/ml Thrombin konnte keine vermehrte Fibrinogenbindung mehr gemessen werden (Abb. 4-11).

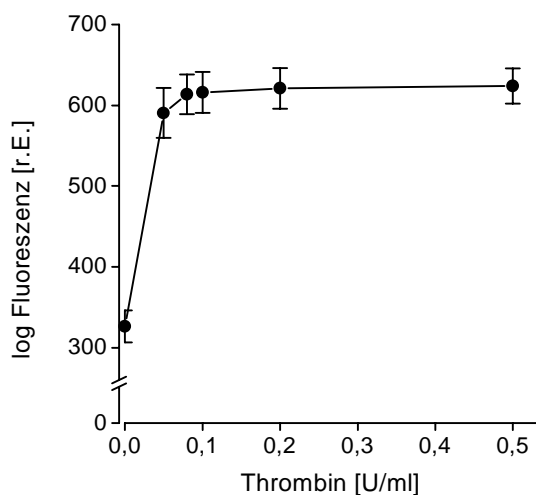


Abb. 4-11: Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung an Thrombozyten. Die Plättchen (25.000/ μ l) wurden vor der Aktivierung mit FITC gekoppeltem Fibrinogen in einer Konzentration von 150 μ g/ml inkubiert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=4).

4.3.3.2 Fibrinogenbindung an Bakterien

Für die durchflußzytometrische Untersuchung der Fibrinogenbindung an Bakterien wurden die Bakterien mit steigenden Konzentrationen FITC-konjugiertem Fibrinogens inkubiert. Neben den *S. aureus*-Stämmen Newman, Cowan1, 4074 und 8325-4 wurden *E. coli* ATCC 25922 und *S. epidermidis* RP62A eingesetzt.

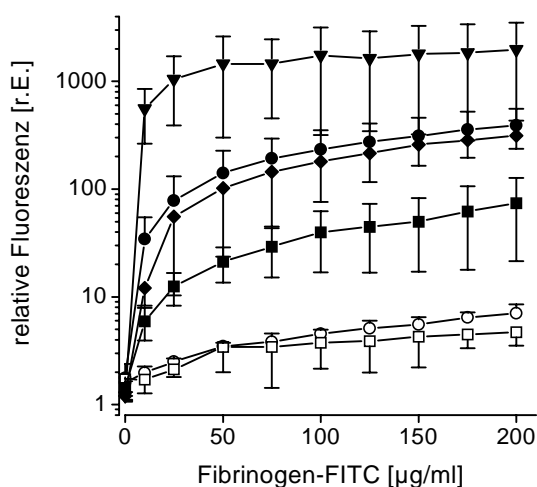


Abb. 4-12: Bindung von Fibrinogen an Bakterien. Die Mikroorganismen (120.000/ μ l) wurden für 15 min mit FITC gekoppeltem Fibrinogen inkubiert und die Fibrinogenbindung durchflußzytometrisch erfasst. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der Mediane \pm S.D. (n=3).

- ▼ *S. aureus* Newman
- *S. aureus* Cowan1
- ◆ *S. aureus* 4074
- *S. aureus* 8325-4
- *E. coli*
- *S. epidermidis* RP62A

Bei allen Stämmen zeigte sich eine dosisabhängige, sättigbare Bindung von Fibrinogen an die Bakterien (Abb. 4-12). Im Vergleich mit den *S. aureus*-Stämmen wiesen die Stämme *E. coli* und RP62A lediglich eine minimale Fibrinogenbindung auf. Innerhalb der *S. aureus*-Stämme kam es zu einer unterschiedlich starken Bindung von Fibrinogen. Dabei band *S. aureus* Newman die größte Anzahl an Fibrinogenmolekülen, gefolgt von den Stämmen Cowan1, 4074 und 8325-4.

Um zu überprüfen, wie spezifisch die Bindung von Fibrinogen an die Bakterien ist, wurde das Fibrinogen-FITC mit unkonjugiertem Fibrinogen aus dessen Bindung verdrängt. Dazu wurden die Keime mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC und steigenden Mengen ungekoppelten Fibrinogens inkubiert. Abb. 4-13 zeigt beispielhaft an den Stämmen Newman und 4074, daß Fibrinogen-FITC durch unkonjugiertes Fibrinogen um bis zu 80% aus seiner Bindung verdrängt werden konnte.

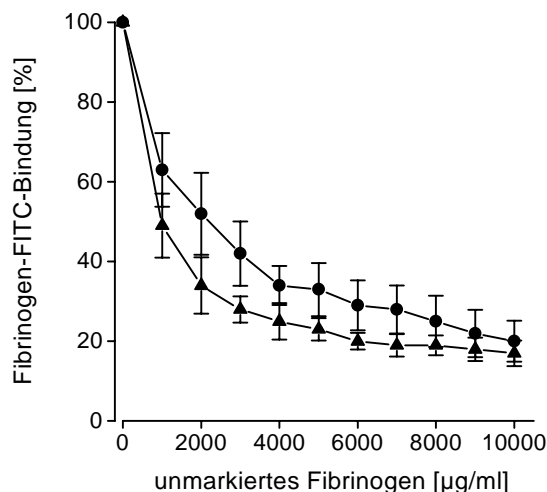


Abb. 4-13: Nachweis der spezifischen Bindung von Fibrinogen-FITC an *S. aureus* Stamm ▲Newman und ● 4074. Die Keime wurden mit 150 µg/ml Fibrinogen-FITC und steigenden Mengen ungekoppelten Fibrinogens inkubiert. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert ± S.D. (n=3).

4.3.3.3 Inhibierung der Fibrinogenbindung an Thrombozyten – Einfluß auf die Assoziation

Um die Rolle des Fibrinogens als Brückenmolekül zu untersuchen, wurden Peptide eingesetzt, welche die zwei Bindungsstellen für Fibrinogen auf dem Glykoprotein IIb/IIIa hemmen. Die mit steigenden Konzentrationen des Peptids inkubierten Thrombozyten aus dem PRP wurden nach entsprechender Aktivierung (0 U/ml und 1 U/ml Thrombin) mit *S. aureus* Newman kokubiert und die Assoziationsrate im Durchflußzytometer bestimmt.

4.3.3.3.1 Einsatz des RGDS - Peptids

Wurde die Fibrinogenbindung an Thrombozyten über die RGDS-Sequenz gehemmt, konnte die Assoziation von *S. aureus* Newman (Abb. 4-14) an mit 1 U/ml Thrombin aktivierten Thrombozyten dosisabhängig um 23,1 % vermindert werden. Bei Verwendung von nicht aktivierten Thrombozyten hatte der Einsatz des RGDS-Peptids keinerlei Einfluß auf die Assoziationsrate.

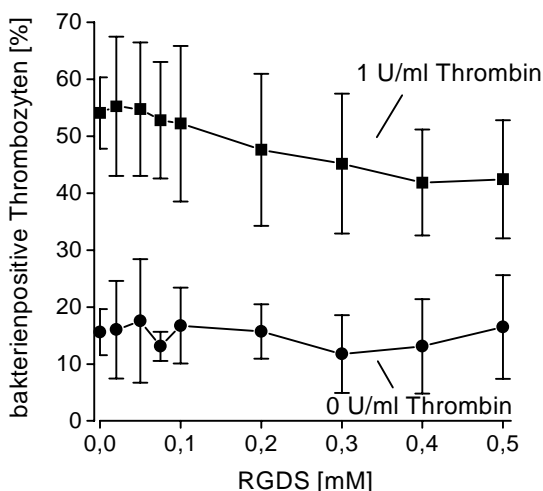


Abb. 4-14: Thrombozyten - *S. aureus*-Assoziation nach Inhibierung der Fibrinogenbindung an Thrombozyten über die RGDS-Sequenz. Thrombozyten (25.000/ μ l) wurden mit steigenden Konzentrationen RGDS-Peptid inkubiert und die Assoziate nach Koinkubation mit *S.aureus* Newman (250.000/ μ l) durchflußzytometrisch bestimmt. Die Werte geben Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) wieder.

4.3.3.3.2 Einsatz des „fibrinogen - binding inhibitor peptides“

Durch Einsatz des „fibrinogen-binding inhibitor peptides“ (H-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-OH) konnte die Bindung von Fibrinogen über die Dodeka-Peptidsequenz der γ -Kette an Thrombozyten verhindert werden.

Aus Abb. 4-15 wird ersichtlich, daß bei Verwendung von mit 1 U/ml Thrombin aktivierten Thrombozyten durch Einsatz von 0,1 mM „fibrinogen-binding inhibitor peptide“ die Assoziation zwischen den Plättchen und *S. aureus* Newman dosisabhängig um 44,8 % vermindert werden konnte. Bei Verwendung von nicht aktivierten Plättchen brachte der Einsatz des „fibrinogen-binding inhibitor peptides“ keine Abnahme der Assoziationsrate.

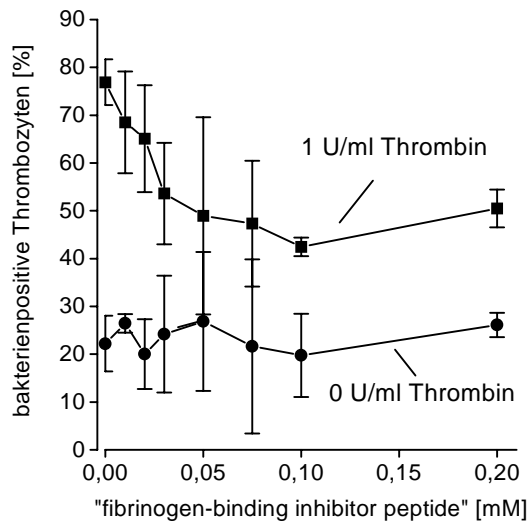


Abb. 4-15: Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation nach Inhibierung der Fibrinogenbindung an Thrombozyten über die Dodekapeptid-Sequenz der Fibrinogen- γ -Kette. Thrombozyten (25.000/ μ l) wurden mit steigenden Konzentrationen „fibrinogen-binding inhibitor peptide“ inkubiert und die Assoziate nach Koinkubation mit *S. aureus* Newman (250.000/ μ l) durchflußzytometrisch bestimmt. Die Werte geben den Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozyten-gesamtpopulation \pm S.D. (n=3) wieder.

4.3.3.4 Untersuchung von Fibrinogenbindungsadhäsinen auf *Staphylococcus aureus*

Da Fibrinogen nach den Ergebnissen der vorangegangenen Kapitel für die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation von Bedeutung zu sein scheint, war es nun von Interesse zu untersuchen, welche Adhäsine auf der Bakterienseite für die Fibrinogenbindung in Frage kommen.

4.3.3.4.1 Protein A

Über einen Vergleich der Fibrinogenbindung an Protein A exprimierende *S. aureus*-Stämme und dem Protein A defizienten Stamm Wood 46 sollte zunächst geklärt werden, ob Protein A als Adhäsine für die Fibrinogenbindung in Frage kommt.

Nach Zugabe steigender Konzentrationen FITC-konjugierten Fibrinogens zeigten alle Stämme eine dosisabhängige Bindung der Fibrinogenmoleküle. Der Protein A defiziente *S. aureus* Wood 46 band jedoch nur $\frac{1}{4}$ der Fibrinogens verglichen mit den Stämmen Newman und Cowan1 (Abb. 4-16).

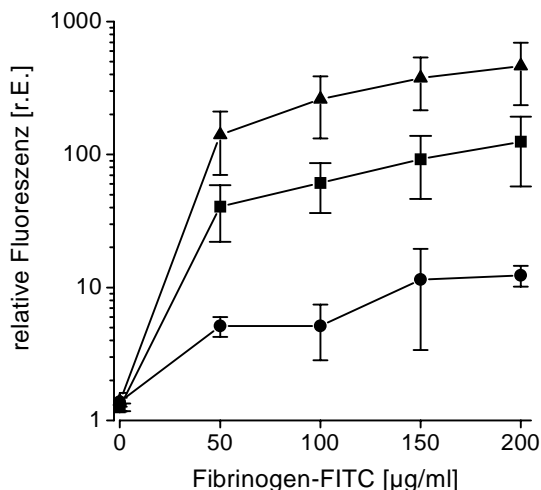


Abb. 4-16: Relevanz von Protein A für die Bindung von Fibrinogen an *S. aureus*. Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung durchflußzytometrisch bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte der Mediane \pm S. D. (n=3) dar.

▲ *S. aureus* Cowan1
 ■ *S. aureus* 8325-4
 ● *S. aureus* Wood 46 (ein Protein A defizienter Stamm)

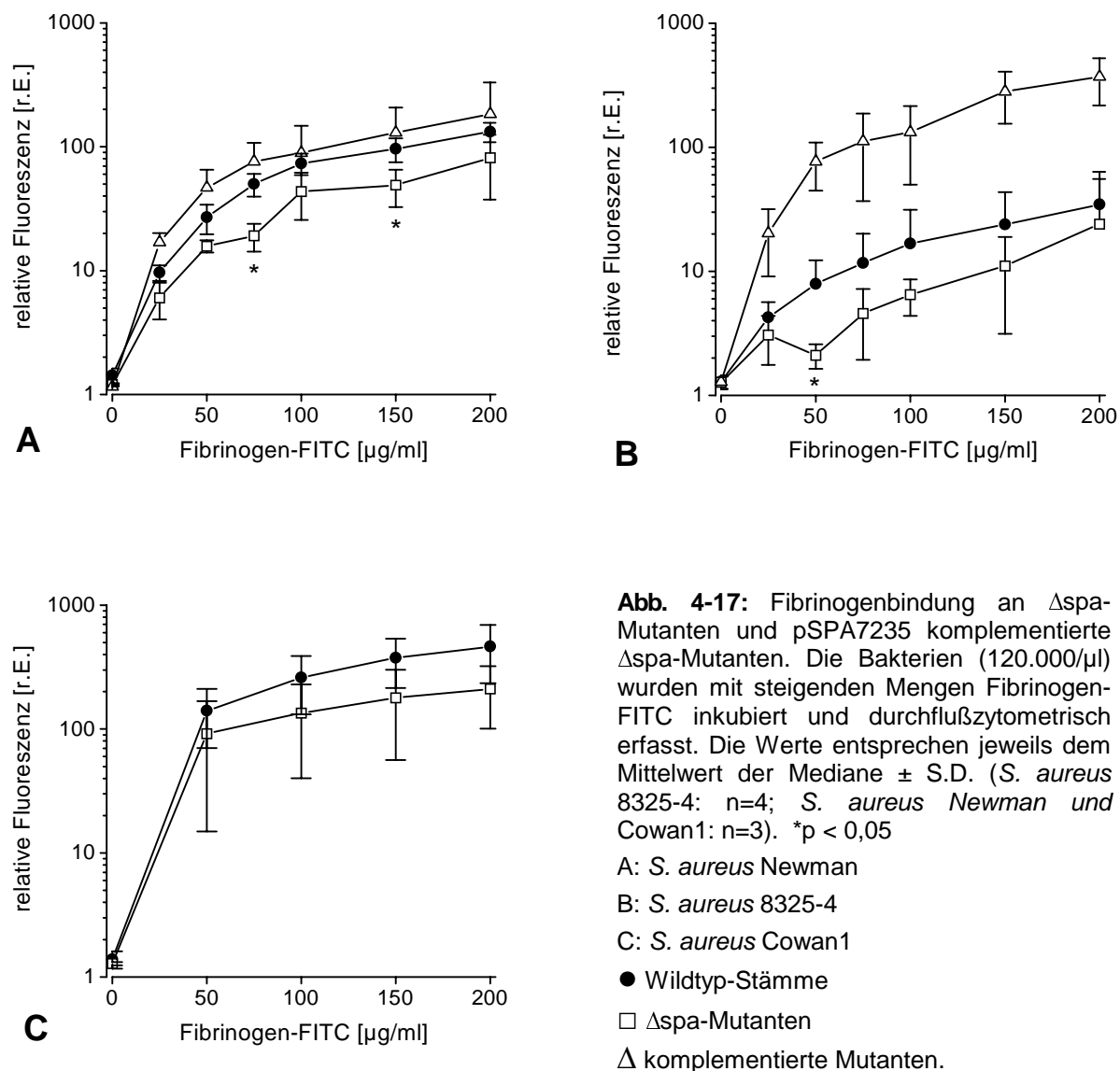
4.3.3.4.1.1 Untersuchungen an Protein A - Deletionsmutanten

Weitere Untersuchungen zu Protein A wurden mit Protein A - Deletionsmutanten (Δ spa-Mutanten) der Stämme Newman, Cowan1 und 8325-4 durchgeführt. Für die Stämme Newman und 8325-4 standen die durch Einführung des Plasmids pSPA7235 komplementierten Mutanten zur Verfügung. Sämtliche Stämme wurden mit steigenden Konzentrationen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung im Durchflußzytometer bestimmt.

Bei *S. aureus* Stamm Newman konnte der Wildtyp bis zu 2,7mal mehr Fibrinogenmoleküle binden als die Δ spa-Mutante. Die komplementierte Mutante hingegen konnte bis zu 1,7mal mehr Fibrinogen binden als der Wildtyp (Abb. 4-17/A).

Der Wildtyp von *S. aureus* 8325-4 konnte im Vergleich zur Δ spa-Mutante eine bis zu 4fach höhere Fibrinogenbindung aufweisen. Die Fibrinogenbindung der komplementierten Mutante lag bei diesem Bakterienstamm bis um das 15fache höher als die Fibrinogenbindung des Wildtyps (Abb. 4-17/B).

Bei *S. aureus* Cowan1 war die Fibrinogenbindung des Wildtyps bis um das 2,2fache im Vergleich zur Δ spa-Mutante erhöht (Abb. 4-17/C). Die komplementierte Mutante fehlte bei diesem Stamm.



4.3.3.4.1.2 Einsatz eines anti - Protein - A - Antikörpers

Für weitere Untersuchungen wurden mit Fibrinogen-FITC (150 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubierten *S. aureus* Stämmen (Newman, Cowan1 und 8325-4) steigende Mengen eines anti-Protein-A-Antikörpers zugesetzt und die abnehmende Fibrinogenbindung im Durchflußzytometer bestimmt. Zur Detektion der unspezifischen Bindung wurde der Versuch parallel mit einem IgG-Antikörper (Anti-Muskelaktin) durchgeführt, der gegen ein nicht in Plättchen vorkommendes Protein gerichtet war.

Nach Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-Protein-A-Antikörper konnten bei *S. aureus* Newman $64 \pm 2,9$ %, bei *S. aureus* 8325-4 59 ± 6 % und bei *S. aureus* Cowan1 55 ± 13 % Fibrinogen-FITC-Moleküle aus ihrer Bindung verdrängt werden. Vergleichbar

hierzu lag die Verdrängung durch den unspezifisch bindenden IgG-Antikörper bei *S. aureus* Newman bei $22,3 \pm 1 \%$, bei Stamm 8325-4 bei $34 \pm 4,6 \%$ und bei Stamm Cowan1 bei $24,6 \pm 8,3 \%$ (Abb. 4-18A/B/C).

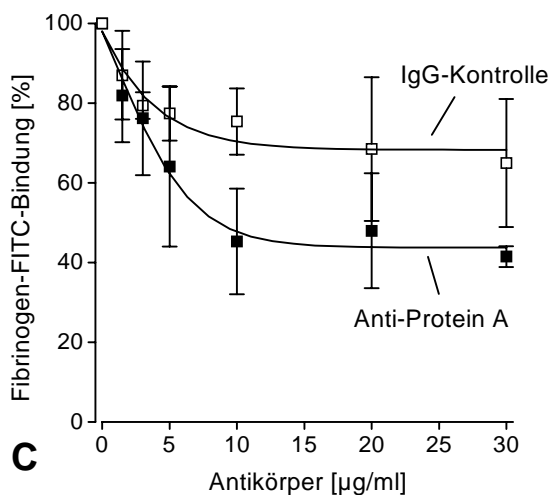
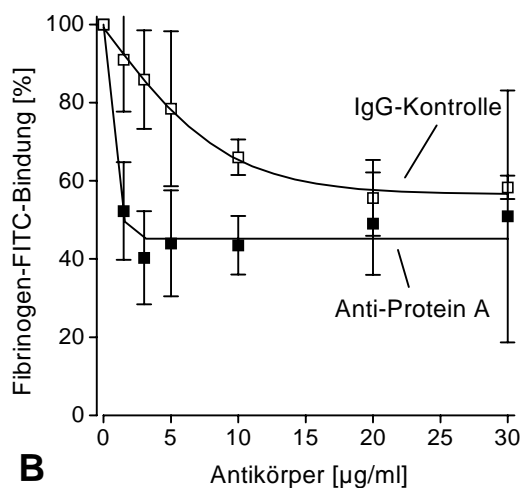
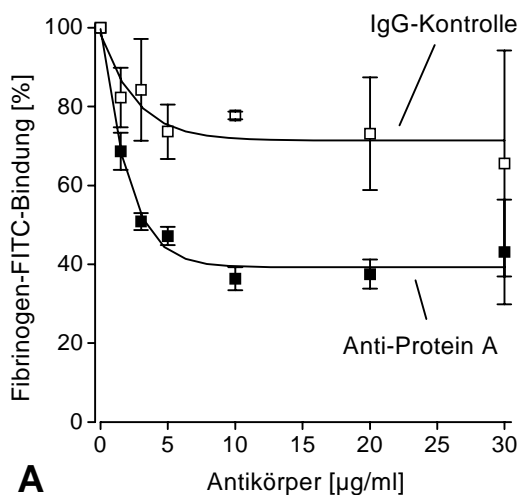


Abb. 4-18: Hemmung der Fibrinogen-FITC-Bindung an *S. aureus* durch Zugabe von polyklonalem anti-Protein-A-Antikörper und IgG-Kontroll-Antikörper. Die Messung der gebundenen Moleküle erfolgte mittels der Durchflußzytometrie. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm S.D. (n=3).

A: *S. aureus* Newman

B: *S. aureus* 8325-4

C: *S. aureus* Cowan1

4.3.3.4.2 Untersuchungen an Map - Deletionsmutanten

Ein auf der *S. aureus*-Oberfläche befindliches 72 kDa Protein, welches hohe Homologie mit dem MHC Klasse II-analogen Protein (Map) besitzt, sollte mittels Durchflußzytometrie auf seine Fähigkeit, Fibrinogen in Lösung zu binden, untersucht werden. Hierzu standen Map-Deletionsmutanten (Δ map-9A, Δ map-9B) des Wildstammes Newman zur Verfügung. Weiterhin wurden die Mutanten SA113(1) und SA113(2) mit dem Wildtyp *S. aureus* SA113 verglichen. Diese beiden

Mutanten entstanden durch Insertion des Plasmids pCX19, welches das Map-Gen enthält. Für die Untersuchung wurden die Bakterien mit steigenden Konzentrationen Fibrinogen-FITC versetzt und die Fibrinogenbindung im Durchflußzytometer bestimmt.

Im Vergleich mit dem Wildtyp Stamm Newman zeigten die Deletionsmutanten Δ map-9A und Δ map-9B keine verringerte Fibrinogenbindung (Abb. 4-19/A). Durch Einfügen des Plasmids pCX19 in *S. aureus* SA113 (SA113(1); SA113(2)) konnte, verglichen mit dem Wildtyp-Stamm SA113, keine vermehrte Fibrinogenbindung erreicht werden (Abb. 4-19/B).

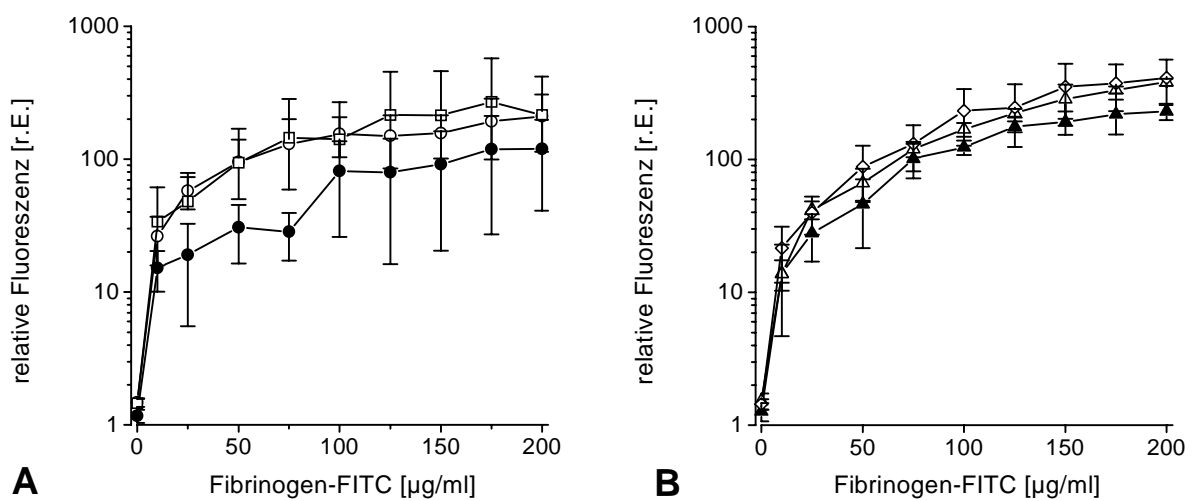


Abb. 4-19 Fibrinogenbindung an Δ map-Mutanten und pCX19 komplementierte *S. aureus* SA113. Die Bakterien (120.000/µl) wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Fibrinogenbindung im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der Mediane \pm S.D. (n=3).

A: ● *S. aureus* Newman

○ Δ map-Mutante 9A

□ Δ map-Mutante 9B

B: ▲ Wildtyp-SA113

△ komplementierte Mutante SA113(1)

◇ komplementierte Mutante SA113(2)

4.3.3.4.3 Untersuchungen an „clumping factor“- und Koagulase- Deletionsmutanten

Die auf der *S. aureus*-Oberfläche exprimierte Adhäsine „clumping factor“ und Koagulase und sollten auf ihre Fähigkeit Fibrinogen in Lösung zu binden, untersucht werden. Dazu wurden „clumping factor“- und Koagulase- Deletionsmutanten vom Stamm 8325-4 und Newman mit den jeweiligen Wildtyp-Stämmen verglichen. Die Versuchsdurchführung erfolgte durch Inkubation der Keime mit steigenden Mengen FITC gekoppelten Fibrinogens und der Messung der Fibrinogenbindung im Durchflußzytometer.

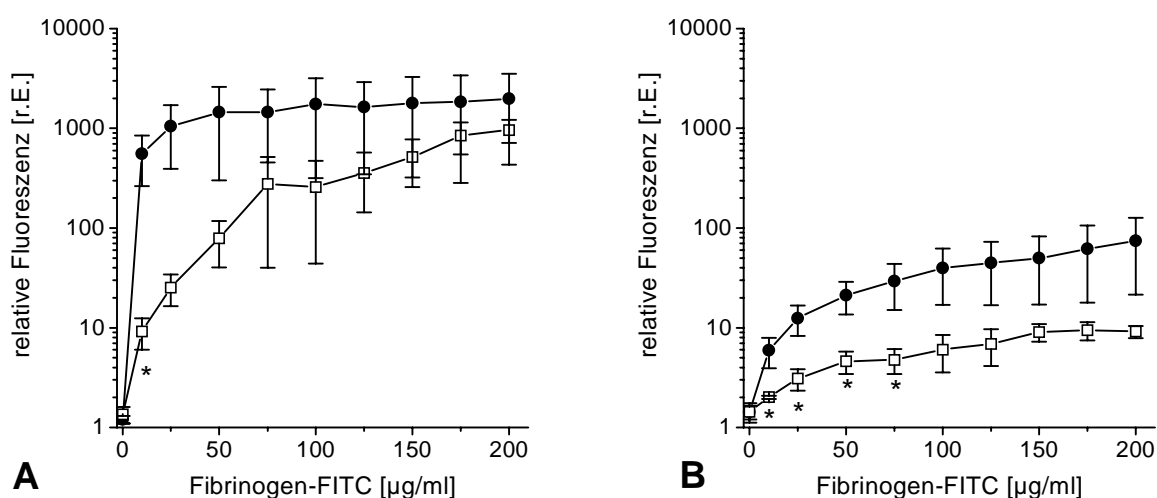


Abb. 4-20 Fibrinogenbindung an „clumping factor“-Deletionsmutanten und dessen Wildstämme. Die Bakterien (120.000/µl) wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Fibrinogenbindung im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der linearen Mediane ± S.D. (n=3). *p < 0,05

A: Deletionsmutante *clfA1* vom Wildstamm *S. aureus* Newman

B: Deletionsmutante *clfA2* vom Wildstamm *S. aureus* 8325-4

● Wildtyp-Stämme

□ Deletionsmutanten

Abb. 4-20 zeigt, daß der „clumping factor“ für die Fibrinogenbindung von Stamm zu Stamm von unterschiedlichem Bedeutungsgrad ist. Die Deletionsmutante von *S. aureus* Newman band im Vergleich zum Elternstamm bei einer Fibrinogenkonzentration von 10 µg/ml bis 50 µg/ml bis zu 60mal weniger Fibrinogenmoleküle. Während ab einer Fibrinogenkonzentration von 75 µg/ml bei dem Wildtyp die Sättigung erreicht war, konnte bei der Mutante durch die Erhöhung der Fibrinogen-FITC-Konzentration die Fibrinogenbindung noch gesteigert werden.

Bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ wurden von der Mutante die Hälfte Fibrinogenmoleküle gebunden als vom Wildtyp (Abb. 4-20/A). Bei *S. aureus* 8325-4 band der Wildtyp bis zu 8mal mehr Fibrinogenmoleküle als die „clumping factor“-Deletionsmutante (Abb. 4-20/B).

Abb. 4-21 zeigt die Fibrinogenbindung an Koagulase-Deletionsmutanten und deren Wildstämme. Obwohl die Fibrinogenbindung des Wildtyps vom Stamm Newman bis zu 3fach höher als die der Deletionsmutante war, konnte kein signifikanter Unterschied in der Fibrinogenbindung von Wildtyp und Mutante festgestellt werden ($p > 0,2$; Abb. 4-21/A). Bei *S. aureus* Stamm 8325-4 war die Fibrinogenbindung des Wildtyps bis zur Hälfte niedriger als die der Deletionsmutante (Abb. 4-21/ B). Ein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp konnte nicht festgestellt werden ($p > 0,1$).

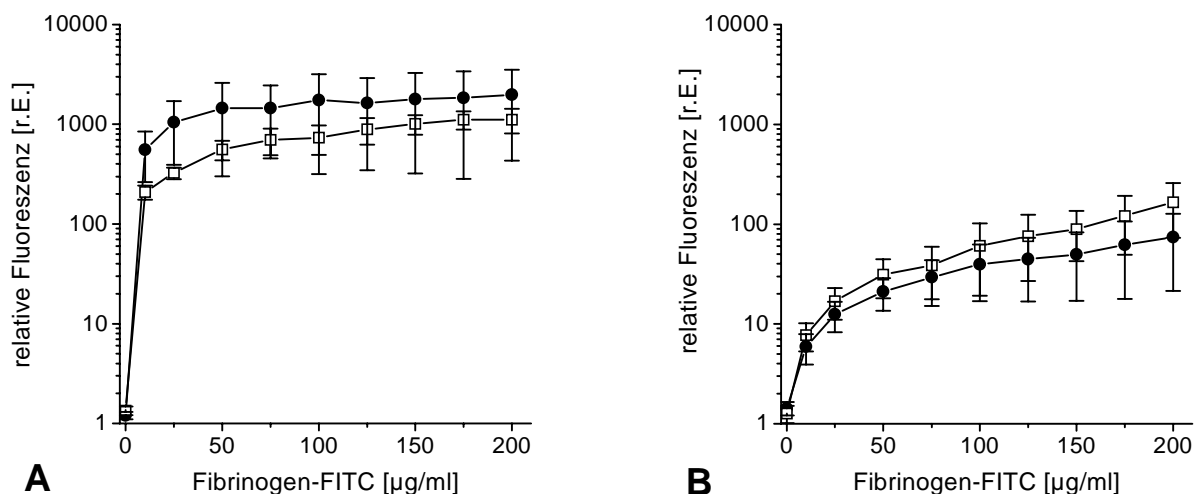


Abb. 4-21: Fibrinogenbindung an Koagulase-Deletionsmutanten und dessen Wildstämme. Die Bakterien ($120.000/\mu\text{l}$) wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Fibrinogenbindung im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der linearen Mediane \pm S.D. ($n=3$).

A: Deletionsmutante DU5855 vom Wildstamm *S. aureus* Newman

B: Deletionsmutante DU5809 vom Wildstamm *S. aureus* 8325-4

- Wildtyp-Stämme
- Deletionsmutanten

4.3.4 von Willebrand Faktor als Brückenbildner

Parallel zu der Untersuchung von Fibrinogen als Brückenbildner, sollte nun auch die Rolle des von Willebrand Faktors (vWF) für die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten untersucht werden.

4.3.4.1 von Willebrand Faktor-Bindung an Thrombozyten

Die Bindung von vWF an Plättchen wurde durch Zusatz von FITC-gekoppelten vWF im Durchflußzytometer nachgewiesen. Plättchen im PRP wurden mit FITC-gekoppeltem vWF (100 µg/ml) versetzt, mit steigenden Mengen Ristocetin für 3 min aktiviert und die Aktivierung mit Formaldehyd abgestoppt.

Wie aus Abb. 4-22 ersichtlich wird, ergab sich ein dosisabhängiger Anstieg der vWF-Bindung an die Plättchen.

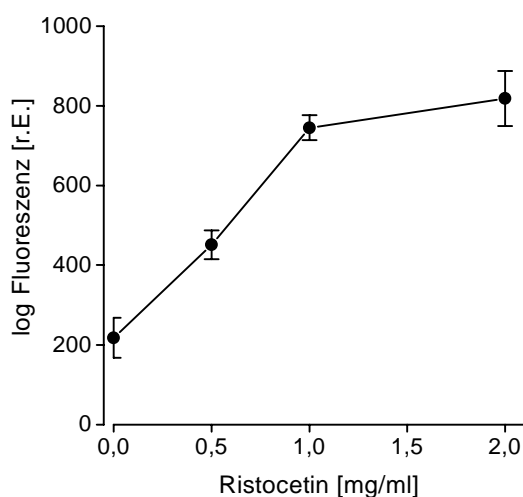


Abb. 4-22: Ristocetin-induzierte vWF-Bindung an Thrombozyten. Die Plättchen (25.000/µl) wurden vor der Aktivierung mit FITC-konjugiertem vWF in einer Konzentration von 100 µg/ml inkubiert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3).

4.3.4.2 von Willebrand Faktor - Bindung an Bakterien

Die Bindung von vWF an Bakterien wurde durch Inkubation der Bakterien mit steigenden Konzentrationen FITC-konjugiertem von Willebrand Faktor durchflußzytometrisch bestimmt. Neben den *S. aureus*-Stämmen Cowan1, Newman, 8325-4 und Wood 46 wurde *S. epidermidis* Stamm RP62A verwendet. Für alle Stämme ergab sich ein dosisabhängiger Anstieg der vWF-Bindung. Nahezu gleich viele vWF-Moleküle banden die *S. aureus*-Stämme Newman und Cowan1. Im Vergleich dazu konnte *S. aureus* 8325-4 nur 1/10tel vWF-Moleküle binden. Eine minimale Bindungsfähigkeit wiesen der *S. epidermidis*-Stamm RP62A und der Protein A negative *S. aureus* Stamm Wood 46 auf (Abb. 4-23).

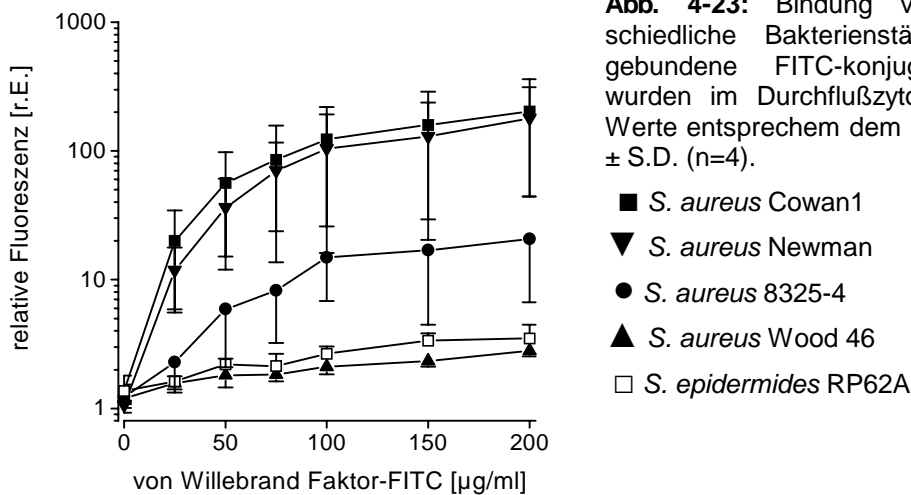


Abb. 4-23: Bindung von vWF an unterschiedliche Bakterienstämme. An Bakterien gebundene FITC-konjugierte vWF-Moleküle wurden im Durchflußzytometer detektiert. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane \pm S.D. (n=4).

- *S. aureus* Cowan1
- ▼ *S. aureus* Newman
- *S. aureus* 8325-4
- ▲ *S. aureus* Wood 46
- *S. epidermidis* RP62A

Um zu testen, ob die Bindung des von Willebrand Faktors an Bakterien spezifisch ist, wurden FITC gekoppelte vWF-Moleküle durch unmarkierten vWF aus ihrer Bindung verdrängt. Bei Zugabe von 2000 $\mu\text{g/ml}$ ungekoppelten vWF zu dem mit 150 $\mu\text{g/ml}$ vWF-FITC vorinkubierten Bakterien, konnten bei *S. aureus* Newman 38 % der vWF-FITC-Moleküle, bei *S. aureus* Cowan1 52 % der vWF-FITC-Moleküle verdrängt werden (Abb. 4-24).

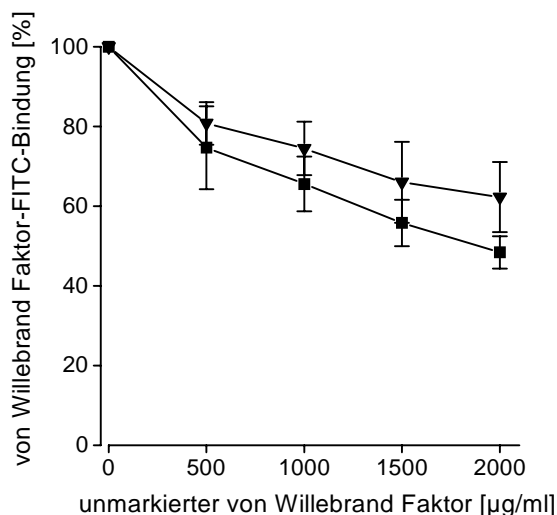


Abb. 4-24: Nachweis der spezifischen Bindung von vWF-FITC an *S. aureus* Newman und Cowan1. Die Keime (120.000/µl) wurden mit 150 µg/ml vWF-FITC und steigenden Mengen ungekoppelten von Willebrand Faktors inkubiert. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert ± S.D. (n=3).

▼ *S. aureus* Newman

■ *S. aureus* Cowan1

4.3.4.3 Inhibierung der von Willebrand Faktor - Bindung an Thrombozyten durch Antikörper: Einfluß auf die Assoziation

Zur Untersuchung, welche Rolle der vWF als Brückenmolekül bei der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation spielt, wurde ein die vWF-Bindung an das Plättchenglykoprotein Ib inhibierender Antikörper (anti-GPIb, Klon SZ2) und ein an den C-Terminus des vWF bindender Antikörper (anti-vWF, Klon AVW1) eingesetzt. Da sowohl Thrombozyten als auch Bakterien Antikörper über ihren Fc-Teil binden können, wurden F(ab')₂-Fragmente des anti-vWF-Antikörpers hergestellt. So konnte vermieden werden, daß der am vWF sitzende Antikörper über seinen freien Fc-Teil an die Thrombozyten bzw. Bakterien anbinden konnte. Vor der Koinkubation der Thrombozyten mit *S. aureus* Newman wurden diese mit 2 mg/ml Ristocetin aktiviert und mit den entsprechenden Antikörpern vorinkubiert. Die Bestimmung der Assoziationsrate erfolgte im Durchflußzytometer.

Es zeigte sich, daß keiner der eingesetzten Antikörper zu einer Abnahme der Assoziationsrate führte. Der Einsatz ganzer IgG-Moleküle führte jedoch zu einer Zunahme der Assoziate um bis zu 9 % bei Verwendung des anti-vWF-Antikörpers (Abb. 4-25/A) bzw. bis zu 15 % bei Verwendung des anti-GPIb-Antikörpers (Abb. 4-25/B). Durch Einsatz des F(ab')₂-Fragments (Abb. 4-25/C) konnte keinerlei Einfluß auf die Assoziation genommen werden.

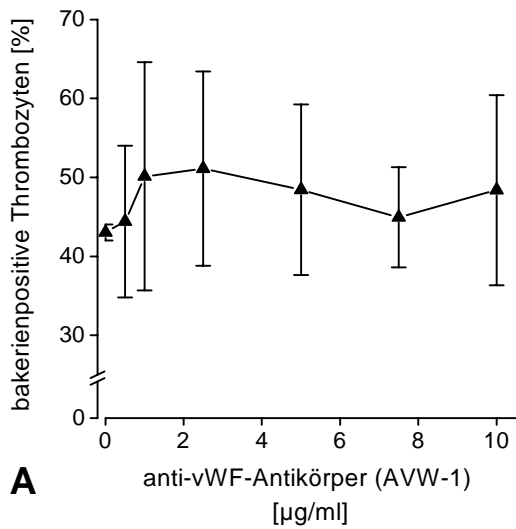
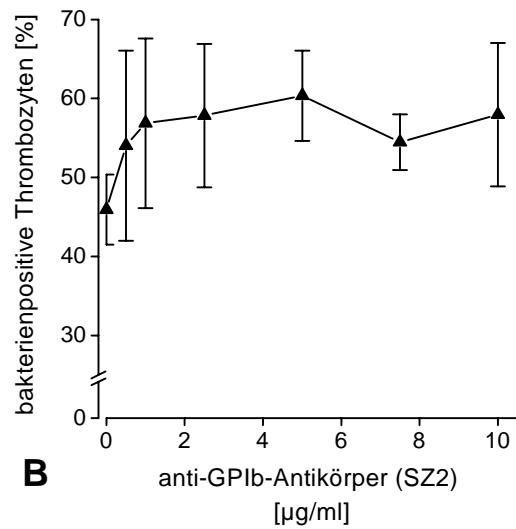
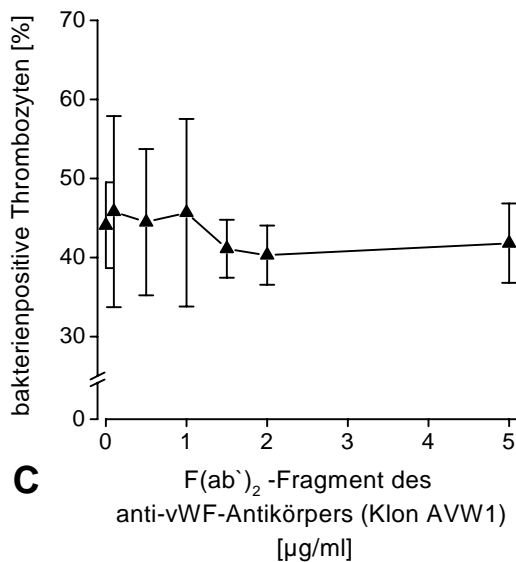
**A****B****C**

Abb. 4-25: Inhibierung der von Willebrand Faktor-Bindung an Thrombozyten durch Antikörper und dessen Einfluß auf die Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation. Mit 2 mg/ml Ristocetin aktivierte Plättchen wurden mit den folgenden Antikörpern vorinkubiert, mit *S. aureus* Newman kokkubiert und die Assoziate im Durchflußzytometer bestimmt.
 A: ein an den C-Terminus des vWF-bindender Antikörper (anti-vWF, Klon AVW1)
 B: ein die vWF-Bindung an das Plättchenglykoprotein GPIIb blockierender Antikörper (anti-GPIIb, Klon SZ2)
 C: das F(ab')₂-Fragment des anti-vWF-Antikörpers (Klon AVW1)

Um sicher zu stellen, daß die Ergebnisse bei Einsatz der F(ab')₂-Fragmente nicht durch das Vorhandensein ganzer IgG-Moleküle verfälscht wurden, wurde die Reinheit der gewonnenen Fragmente mittels einer SDS-Page und nachfolgender Silberfärbung überprüft.

Aus Abb. 4-26 wird ersichtlich, daß sämtliche IgG-Moleküle (MG= 150.000 Da) entweder in F(ab')₂-Fragmente (MG= 100.000 Da) oder in die Einzelfragmente Fab und Fc (MG je 50.000 Da) gespalten wurden.

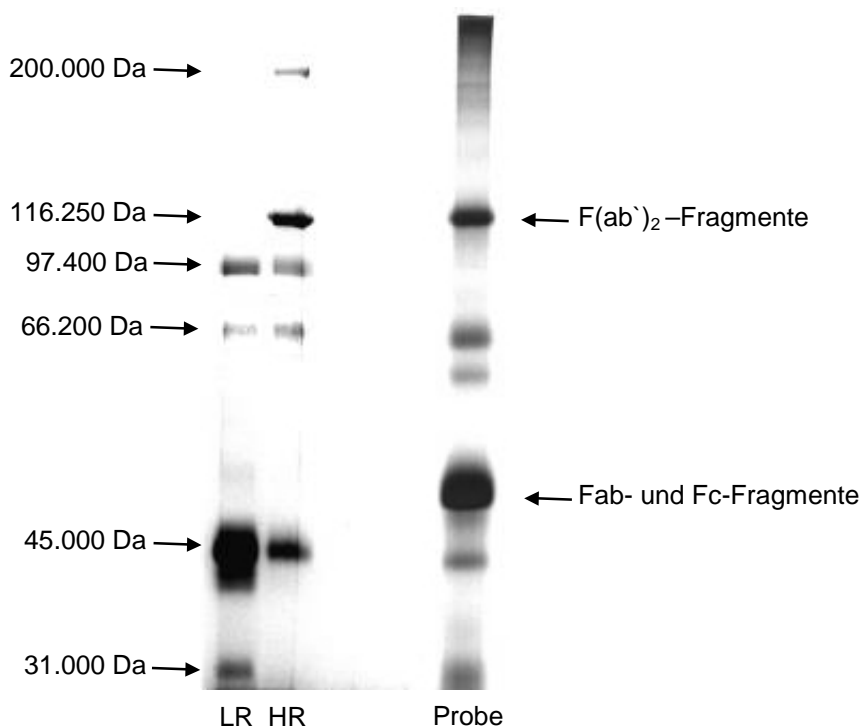


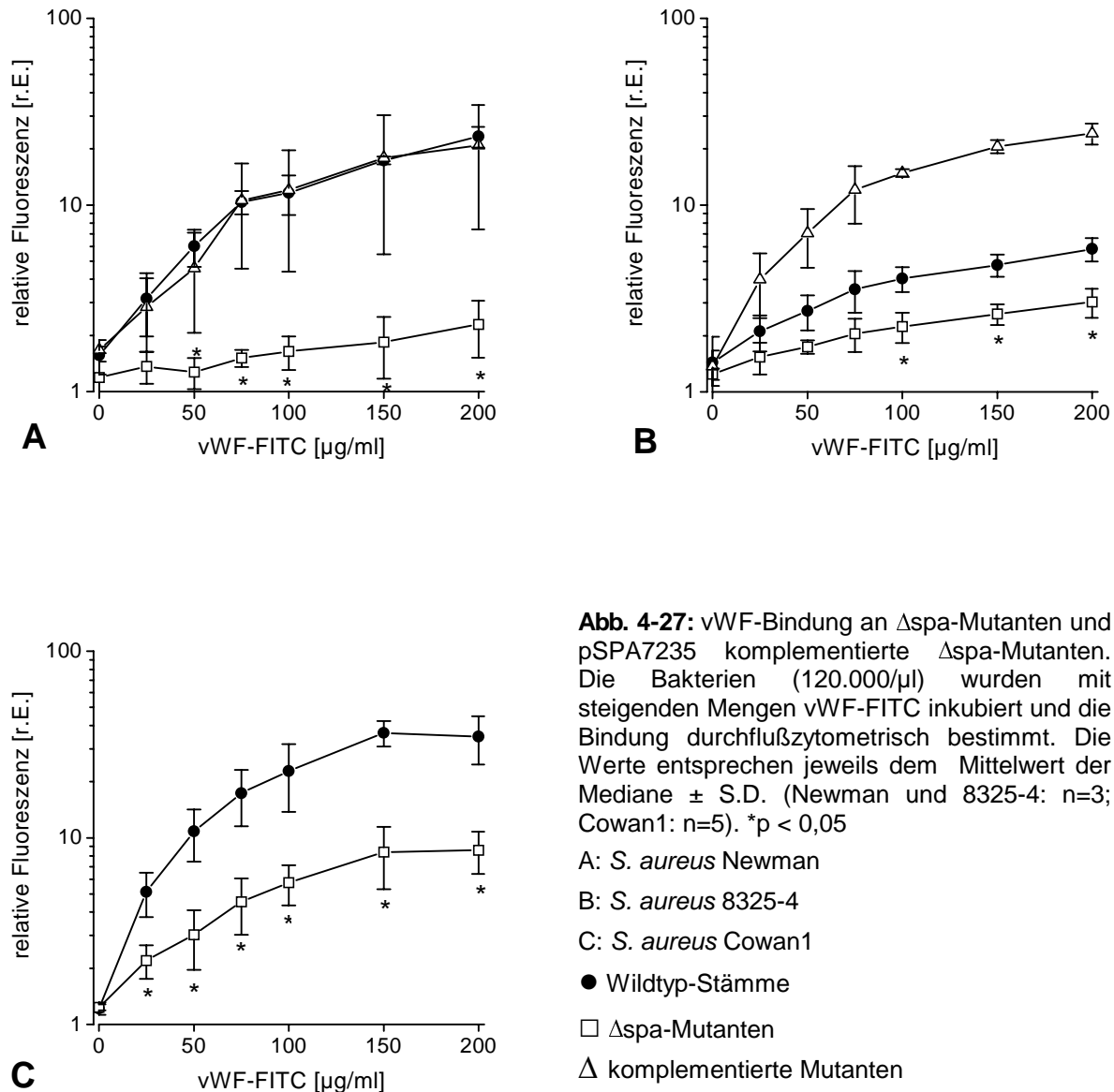
Abb. 4-26: Reinheit der $F(ab')_2$ -Fragmente des anti-vWF-Antikörpers. Die Proteine wurden mittels SDS-Page (7,5%iges Polyacrylamidgel) aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. LR: Marker mit niedrigem Molekulargewichtsbereich HR: Marker mit hohem Molekulargewichtsbereich

4.3.4.4 Protein A - ein Oberflächenadhäsion für die Bindung des von Willebrand Faktors an *Staphylococcus aureus*

In Kapitel 4.3.4.2 konnte gezeigt werden, daß die *S. aureus* Stämme Newman und Cowan1 bis zu 60fach und *S. aureus* 8325-4 bis zu 10fach mehr vWF-FITC binden als der Protein A defiziente Stamm Wood 46. Eine genauere Untersuchung von Protein A als Bindungsadhäsion auf der Oberfläche von *S. aureus* sollte mit Hilfe der im Kapitel 4.3.3.4.1.1 aufgezählten Protein A-Deletionsmutanten (Δspa -Mutanten) der Stämme Newman, Cowan 1 und 8325-4 und der durch Einführung des Plasmids pSPA7235 in die Stämme Newman und 8325-4 komplementierten Mutanten durchgeführt werden.

4.3.4.4.1 Untersuchung an Protein A - Deletionsmutanten

Im Vergleich der Δspa -Mutanten mit ihren Wildtyp-Stämmen zeigten alle Mutanten eine deutliche Verringerung der vWF-Bindung. Die Δspa -Mutante von Newman erreichte nur 1/10tel, die von 8325-4 nur 1/2 und die von Cowan1 nur 1/4tel der Fluoreszenzintensität der Wildtyp-Stämme. Durch Komplementierung der Deletion konnte die vollständige Bindungsfähigkeit wieder hergestellt werden. Während die Bindung bei *S. aureus* Newman von komplementierter Mutante und Wildtyp nahezu identisch war, band die komplementierte Mutante des Stammes 8325-4 die 4fache Menge vWF-FITC verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 4-27).



4.3.4.4.2 Einsatz eines anti - Protein - A - Antikörpers

Der Einsatz eines anti-Protein-A-Antikörpers erfolgte analog zu dem in Kapitel 4.3.3.4.1.2 für Fibrinogen beschriebenen.

Die an die Bakterien gebundenen vWF-FITC Moleküle konnten durch Zusatz des anti-Protein-A-Antikörpers bei Stamm Newman bis zu $78 \pm 8 \%$, Stamm 8325-4 bis zu $70 \pm 13 \%$ und bei Stamm Cowan1 bis zu $85 \pm 11 \%$ aus ihrer Bindung verdrängt werden. Der Kontroll-IgG-Antikörper konnte die vWF-Bindung um $50 \pm 36,6 \%$ bei *S. aureus* Newman, um $54,5 \pm 12,6\%$ bei *S. aureus* 8325-4 und um $72 \pm 4 \%$ bei *S. aureus* Cowan1 verdrängen (Abb. 4-28 A/B/C).

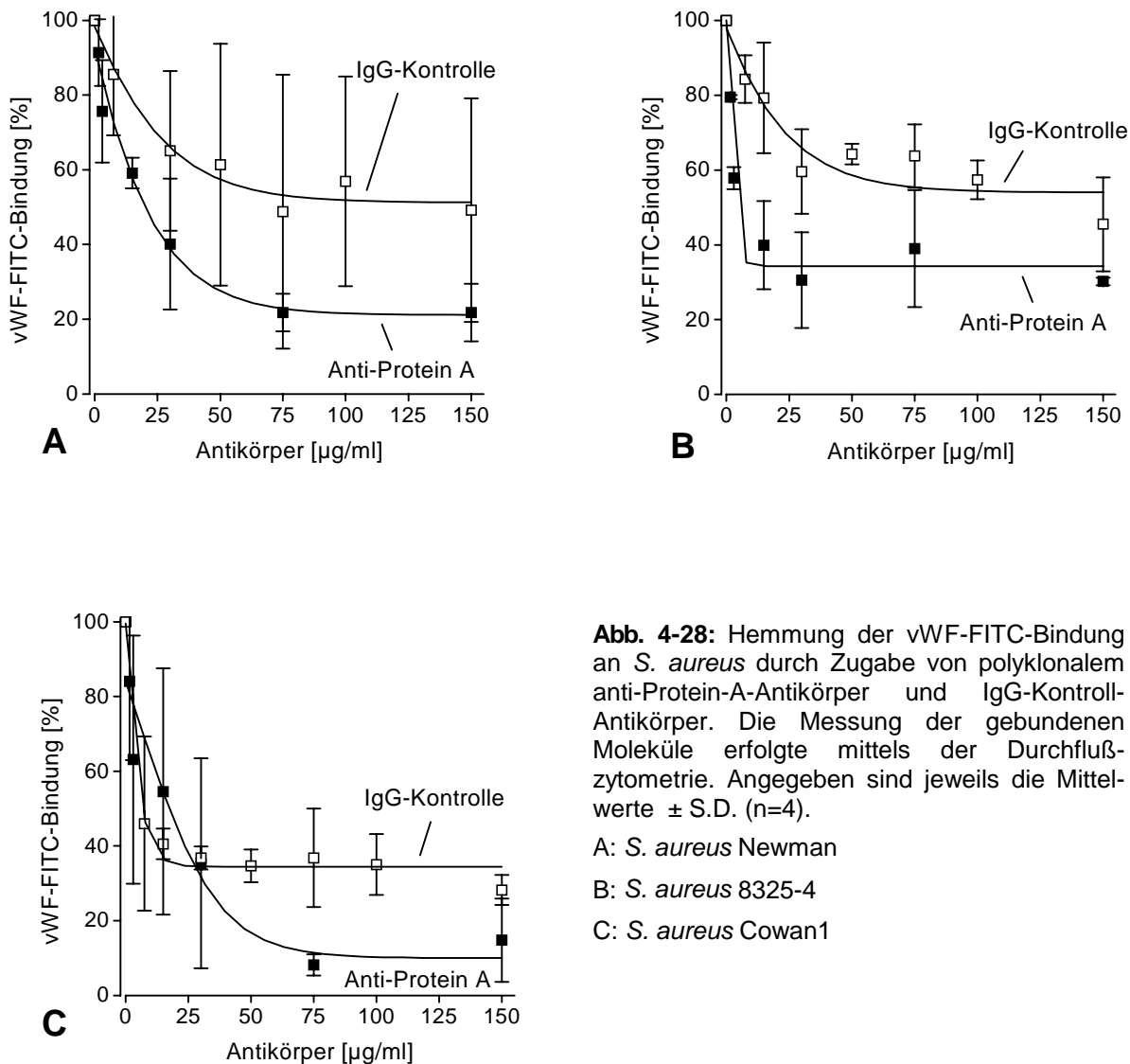


Abb. 4-28: Hemmung der vWF-FITC-Bindung an *S. aureus* durch Zugabe von polyklonalem anti-Protein-A-Antikörper und IgG-Kontroll-Antikörper. Die Messung der gebundenen Moleküle erfolgte mittels der Durchflußzytometrie. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm S.D. (n=4).

A: *S. aureus* Newman

B: *S. aureus* 8325-4

C: *S. aureus* Cowan1

4.4 Rolle der Thrombozytenproteine für die *Staphylococcus aureus* - Thrombozyten - Assoziation

4.4.1 Assoziation zwischen *Staphylococcus aureus* und Thrombozyten mit Speicherfunktionsstörungen der Granula

Zur Klärung, inwieweit die Granulainhaltsstoffe der Plättchen für die Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten von Bedeutung sind, wurden an den Patienten A.P. und W.K. mit „Gray-platelet-syndrome“ und an einer Patientin J.E. mit „ α -, δ -storage pool disease“ Untersuchungen durchgeführt. Patienten mit „Gray-platelet-syndrome“ fehlen die Inhaltsstoffe der Thrombozyten- α -Granula die in den Megakaryozyten hergestellt werden, bei Vorhandensein der Granulamembran und der

vom Plasma endozytierten Proteine. Patienten mit „ α -, δ -storage pool disease“ fehlen neben dem α -Granuladefekt zusätzlich die Inhaltsstoffe der „dense-bodies“. Die nicht aktivierten und mit Thrombin (0,2 U/ml bzw. 1 U/ml) aktivierten Thrombozyten aus dem PRP wurden mit *S. aureus* Newman und Cowan1 koinkubiert und die Assoziate im Durchflußzytometer quantitativ bestimmt.

4.4.1.1 „ α -, δ - storage pool disease“

Bei der Patientin J.E. mit „ α -, δ -storage pool disease“ waren die Assoziate nicht aktivierter Plättchen im Vergleich zur Kontrolle bei beiden *S. aureus*-Stämmen signifikant erniedrigt (*S. aureus* Newman $p < 0,01$; *S. aureus* Cowan1 $p < 0,005$). Während bei der Kontrolle eine durch 0,2 U/ml Thrombin erzielte Vollaktivierung der Plättchen eine Zunahme der Assoziate bewirken konnte, wurde bei der Patientin durch Aktivierung der Plättchen keine Erhöhung der Assoziationsrate erzielt (Abb. 4-29). Auch bei aktivierten Plättchen unterschied sich die Assoziationsrate von Kontrolle und Patientin signifikant ($p < 0,0001$ bei beiden *S. aureus* Stämmen).

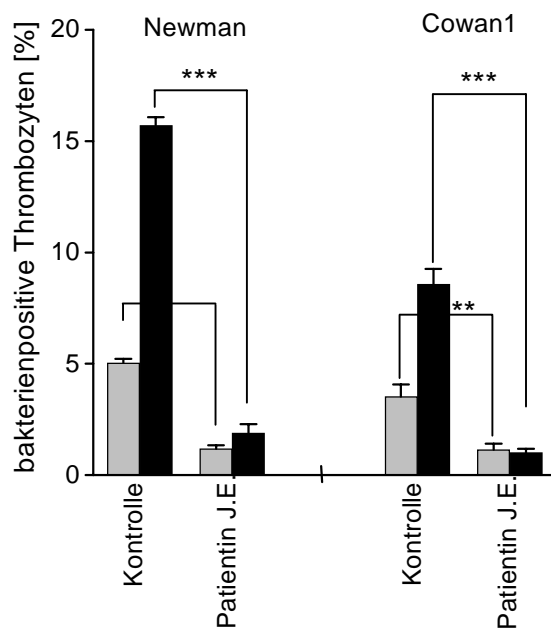


Abb. 4-29: *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation bei einer Patientin J.E. mit „ α -, δ -storage pool disease“ und Kontrollpersonen im PRP. Die Werte stellen den Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten zur Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) dar.

* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

- nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)

4.4.1.2 „Gray-platelet-syndrom“

Bei den Patienten A.P. und W.K., bei denen eine Speicherfunktionsstörung der α -Granula vorliegt, die „dense-bodies“ jedoch normal sind, konnten im Vergleich mit der Patientin mit „ α -, δ -storage pool disease“ analoge Ergebnisse erzielt werden. Mit nicht aktivierten Plättchen konnten sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Patienten nur wenige Assoziate detektiert werden. Im Gegensatz zur Kontrolle konnte durch Thrombinaktivierung (1U/ml) der Thrombozyten bei den Patienten kein Zuwachs der Assoziate beobachtet werden. Die Assoziationsrate zwischen Kontrolle und Patienten unterschied sich bei aktivierten Thrombozyten signifikant ($p < 0,0001$; Abb. 4-30).

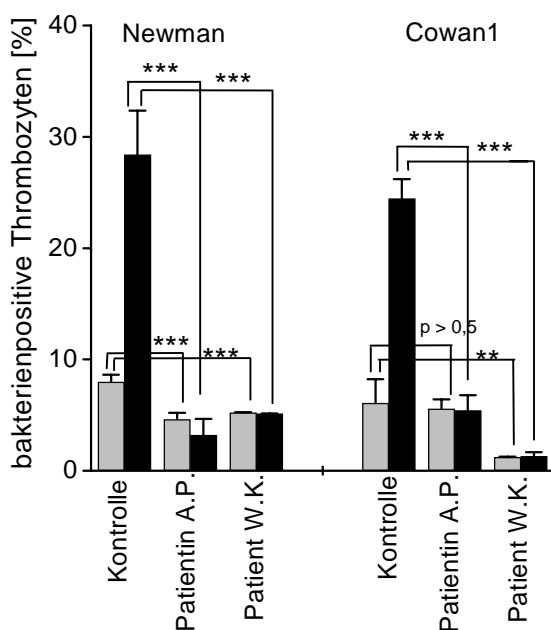


Abb. 4-30: *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation bei den Patienten A.P. und W.K. mit „Gray-platelet-syndrom“ und Kontrollpersonen im PRP. Die Werte stellen den Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten zur Thrombozyten-gesamtpopulation \pm S.D. (Kontrolle n=3; Patientin A.P. n=6; Patient W.K. n=3) dar.

** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

- nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (1 U/ml Thrombin)

4.4.2 Rolle von P-Selektin (CD62) für die Assoziation

In Kapitel 4.2 konnte festgestellt werden, daß mit Aktivierung der Thrombozyten eine Zunahme der Thrombozyten-Bakterien-Assoziate einhergeht. Ein lediglich nach der Aktivierung auf der Plättchenoberfläche erscheinendes Glykoprotein ist das α -Granulatransmembranprotein P-Selektin. Inwieweit dieses Membranprotein für den oben genannten Effekt von Bedeutung ist, sollte im folgenden geklärt werden.

4.4.2.1 Inhibierung von P-Selektin mittels Sialyl-Lewis-X

Sialyl-Lewis-X ist ein sialysiertes und fukosyliertes Tetrasaccharid, welches als terminale Struktur von Zuckerketten auf Selektin-Liganden wie z.B dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) auf Leukozyten vorkommt. Über die Bindung von P-Selektin der Plättchen an Sialyl-Lewis-X wird z. B. die direkte Zell-Zell-Adhäsion zwischen Thrombozyten und Leukozyten ermöglicht.

Zur Inhibierung von P-Selektin wurde aktivierten (1 U/ml Thrombin) Thrombozyten im PRP steigende Konzentrationen Sialyl-Lewis-X zugesetzt. Nach Koinkubation der Plättchen mit *S. aureus* Newman bzw. Cowan1 wurden die Assoziate im Durchflußzytometer bestimmt.

Aus Abb. 4-31 wird ersichtlich, daß der Einsatz von bis zu 10 µg/ml Sialyl-Lewis-X bei keinem der eingesetzten *S. aureus*-Stämme eine Veränderung der Assoziationsrate bewirken konnte.

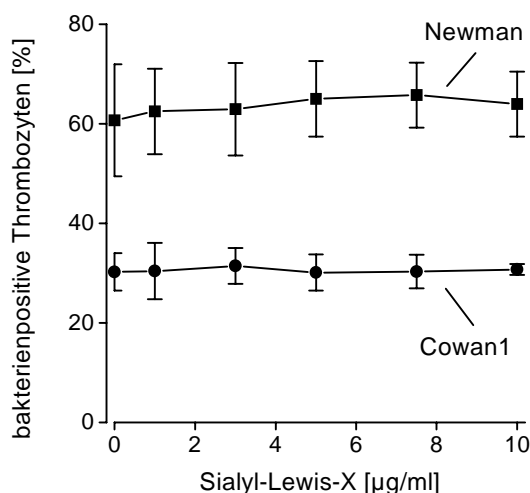


Abb. 4-31: Einfluß von Sialyl-Lewis-X auf die Thrombozyten - *S. aureus*-Assoziation. Die Thrombozyten wurden mit 1 U/ml Thrombin aktiviert, mit dem entsprechenden *S. aureus*-Stamm koinkubiert und die Assoziate durchflußzytometrisch bestimmt. Die Werte geben den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten gemessen an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) wieder.

4.4.2.2 Untersuchungen an P-Selektin - knockout - Mäusen

Um die oben aufgeführte Vermutung, daß CD62 als Adhäsion für die Anheftung von *S. aureus* an Thrombozyten keine Rolle spielt, zu überprüfen, wurden Assoziationsversuche an mit 1 U/ml Thrombin aktivierten, CD62-defizienten murinen Thrombozyten durchgeführt und durchflußzytometrisch ausgewertet. Sowohl bei Koinkubation der Plättchen mit *S. aureus* Newman (Abb. 4-32/A) als auch mit Cowan1 (Abb. 4-32/B) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Bindung der Bakterien an Kontrollplättchen und P-Selektin-defizienten Plättchen festgestellt werden.

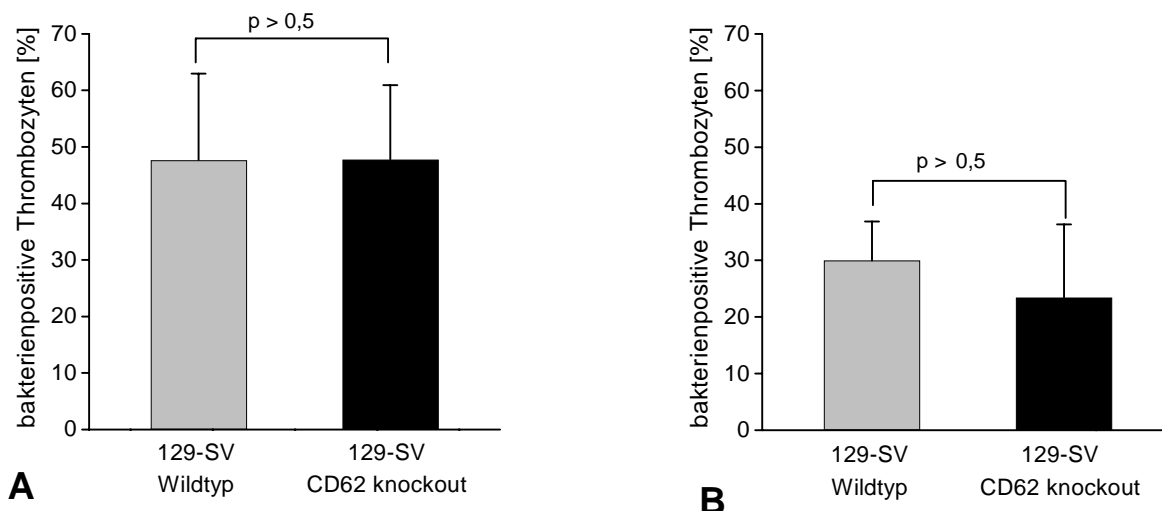


Abb. 4-32: Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten von CD62-knockout-Mäusen und dessen Wildstamm (129-SV). Die Thrombozyten wurden mit 1 U/ml Thrombin aktiviert und die Assoziante nach Koinkubation mit *S. aureus* im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten gemessen an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=4) dar.

A: *S. aureus* Newman

B: *S. aureus* Cowan1

4.4.3 Assoziation zwischen *Staphylococcus aureus* und CD36 - defizienten Plättchen

CD36, auch als Glykoprotein IIIb oder Glykoprotein IV bezeichnet, ist ein auf der Plasmamembran und der α -Granulamembran der Thrombozyten vorkommendes Glykoprotein. Ob CD36 für die Assoziation zwischen *S. aureus* und Thrombozyten von Wichtigkeit ist, wurde an Thrombozyten des Probanden Y.A., dessen Thrombozyten kein CD36 besitzen, untersucht.

Die gefilterten Thrombozyten wurden nicht aktiviert und mit 1 U/ml Thrombin aktiviert und mit den *S. aureus*-Laborstämmen Cowan1 und 8325-4, und den aus Patienten isolierten *S. aureus*-Stämmen 4074 und 15286 koinkubiert. Die Bestimmung der Assoziationsrate erfolgte im Durchflußzytometer.

Im Vergleich der einzelnen Stämme zeigte sich eine unterschiedlich starke Fähigkeit der Stämme an Thrombozyten zu binden. Bei allen Stämmen konnte bei Patient und Kontrolle nach Aktivierung der Thrombozyten eine im Vergleich zu nicht aktivierten Plättchen erhöhte Assoziationsrate gemessen werden. Die CD36-defizienten Plättchen des Probanden Y.A. bildeten dabei geringgradig mehr Assoziante als Plättchen der Kontrollperson (Abb. 4-33).

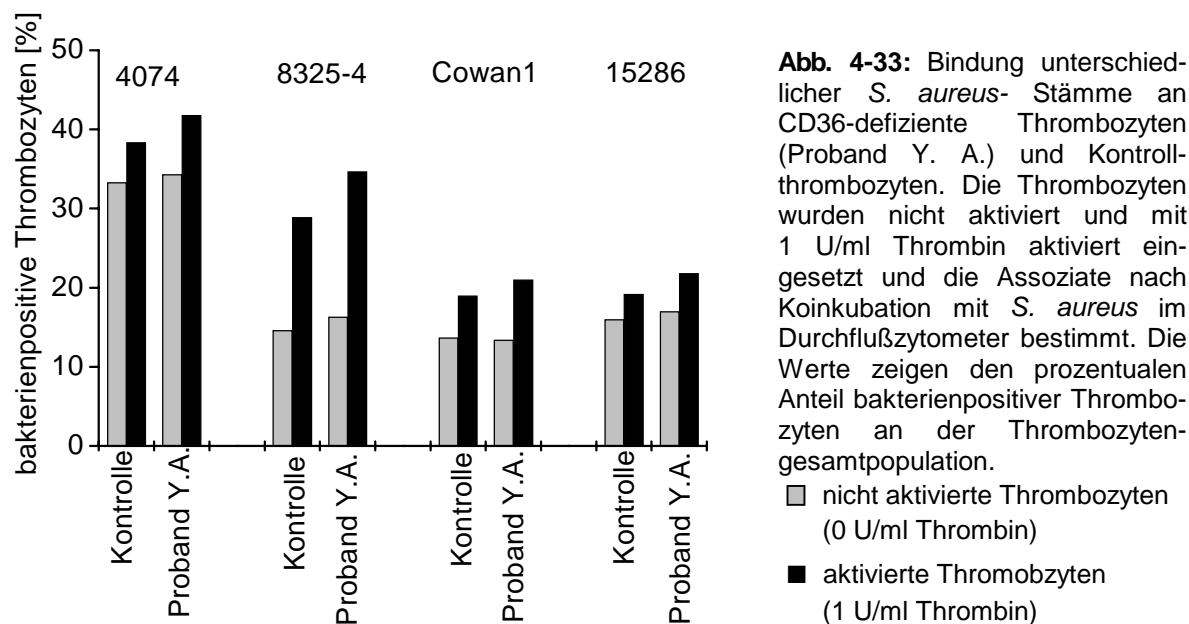


Abb. 4-33: Bindung unterschiedlicher *S. aureus*-Stämme an CD36-defiziente Thrombozyten (Proband Y. A.) und Kontrollthrombozyten. Die Thrombozyten wurden nicht aktiviert und mit 1 U/ml Thrombin aktiviert eingesetzt und die Assoziante nach Koinkubation mit *S. aureus* im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte zeigen den prozentualen Anteil bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozyten-gesamtpopulation.

■ nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
 ■ aktivierte Thrombozyten (1 U/ml Thrombin)

4.4.4 Assoziation zwischen *Staphylococcus aureus* und GPIIb/IIIa - defizienten Plättchen

Ein weiteres auf der Thrombozytenmembran vorkommendes Glykoprotein ist der GPIIb/IIIa-Komplex. Seine Rolle für die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation konnte an Plättchen der an Morbus Glanzmann Typ I erkrankten Patientin A.M. durchflußzytometrisch untersucht werden. Bei an dieser Erkrankung leidenden Patienten fehlt der GPIIb/IIIa-Komplex auf den Thrombozyten fast vollständig (<1%). Thrombozyten aus dem PRP und nach Gelfiltration wurden nicht aktiviert und mit 0,2 U/ml Thrombin aktiviert verwendet. Als Assoziationspartner wurden *S. aureus* Newman und Cowan1 eingesetzt.

Abb. 4-34/A zeigt die mit gelfiltrierten Thrombozyten durchgeführte Untersuchung. An nicht aktivierte Thrombozyten der Patientin konnte *S. aureus* geringfügig weniger (Stamm Newman) bzw. vergleichbar (Stamm Cowan) anbinden als an nicht aktivierte Thrombozyten der Kontrolle. An aktivierte Plättchen der Patienten konnte *S. aureus* Newman mehr, *S. aureus* Cowan1 gleich stark anbinden als an die Plättchen der Kontrollperson. Im PRP (Abb. 4-34/B) konnte *S. aureus* Newman an nicht aktivierte Plättchen der Patientin A.M. geringfügig weniger binden als an Plättchen der Kontrollperson. *S. aureus* Cowan1 hingegen zeigte in seiner Bindung an nicht aktivierte Plättchen der Kontrollperson und der Patientin keinen Unterschied. Nach Aktivierung der Plättchen konnten im PRP keine signifikanten

Unterschiede in der Bindung von *S. aureus* Newman und Cowan1 an Kontrollplättchen und an GPIIb/IIIa-defiziente Plättchen festgestellt werden.

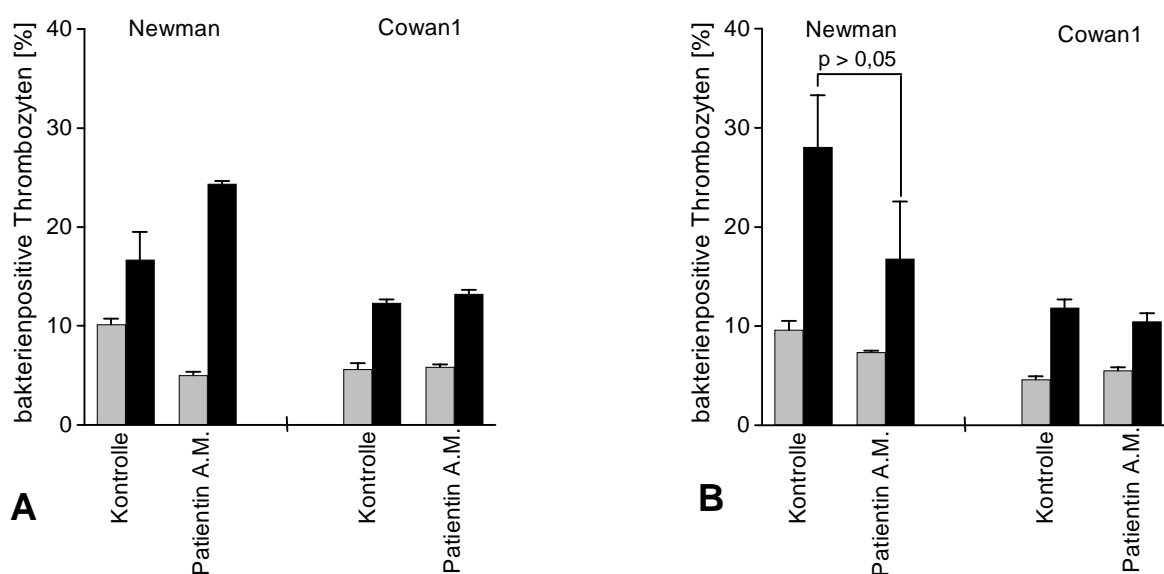


Abb. 4-34 Bindung von *S. aureus* Newman und Cowan1 an GPIIb/IIIa-defiziente Thrombozyten (Patientin A.M.) und Kontrollthrombozyten. Die Thrombozyten wurden mit 0 U/ml und 1 U/ml Thrombin vorbehandelt und die Assoziante nach Koinkubation mit *S. aureus* im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte geben den Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten an der Thrombozytengesamtpopulation wieder. Der Mittelwert wurde bestimmt aus einem einmalig durchgeführten Experiment mit Dreifachbestimmung.

A: Thrombozyten nach Gelfiltration

B: Thrombozyten im PRP

□ nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)

■ aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)

4.4.5 Assoziation zwischen *Staphylococcus aureus* und Thrombozyten von Knockout-Mäusen der Fc γ -Kette

Mit Hilfe von Knockout-Mäusen der Fc γ -Kette konnte untersucht werden, welchen Einfluß die γ -Kette von Fc-Rezeptoren der Thrombozyten für die Interaktion Thrombozyt/*S. aureus* hat.

Um Unterschiede in der Assoziationsrate durch unterschiedliche Voraktivierungen der Plättchen zu vermeiden, wurden die Thrombozyten mit 1 U/ml Thrombin aktiviert und mit *S. aureus* Newman und Cowan1 koinkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Assoziante im Durchflußzytometer.

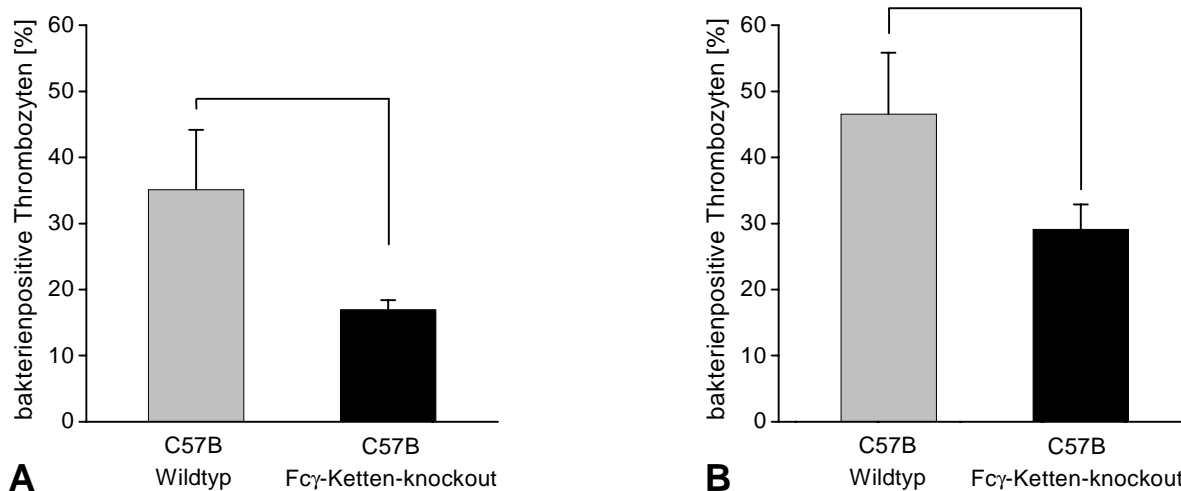


Abb. 4-35: Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten von Knockout-Mäusen der Fcγ-Kette und dessen Wildstamm (C57B). Die Thrombozyten wurden mit 1 U/ml Thrombin aktiviert und die Assoziante nach Koinkubation mit *S. aureus* im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte geben den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten gemessen an der Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=4) wieder. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ im Vergleich zu jeweiliger Kontrolle.

A: *S. aureus* Newman

B: *S. aureus* Cowan1

Von der Gesamtthrombozytenpopulation des Wildstammes C57B banden bei Koinkubation mit *S. aureus* Newman bis zu 35 % der Thrombozyten Bakterien. Von den Thrombozyten der Knockout-Mäuse der Fcγ-Kette waren dagegen nur 17 % bakterienpositiv (Abb. 4-35/A). Während durch Koinkubation der Thrombozyten des Wildstammes C57B mit *S. aureus* Cowan1 eine Assoziationsrate von 46 % erreicht werden konnte, betrug die der Thrombozyten der Knockout-Mäuse lediglich 29 % (Abb. 4-35/B). Verglichen mit dem Wildtyp banden die Plättchen der Knockout-Mäuse der Fcγ-Kette nach Koinkubation mit *S. aureus* Newman signifikant ($p < 0,05$) weniger Bakterien. Ebenso signifikant ($p < 0,01$) weniger wurde nach Koinkubation mit *S. aureus* Cowan1 gebunden.

4.4.6 Rolle des von Willebrand Faktors für die Assoziation

Um zu testen, ob der vWF an der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten beteiligt ist, wurden Plättchen eines an „von Willebrand Disease“ Typ3 („severe von Willebrand disease“) erkrankten Patienten P.R. durchflußzytometrisch und im Adhäsionsassay untersucht. Bei diesem Patienten fehlt der vWF sowohl im Plasma als auch in den Thrombozytengranula (Kehrel et al, 1998; Zippel, 1999). Die Untersuchung im Adhäsionsassay erfolgte durch Bindung von *S. aureus* Cowan1 an unbeschichtete, an mit Plasma bzw. Thrombozyten und an mit Plasma und Thrombozyten beschichtete Polymethylmethacrylat (PMMA)-Scheibchen. Im Adhäsionsassay konnte *S. aureus* Cowan1 auf unbeschichteten PMMA-Scheibchen kaum anhaften. Durch Inkubation der Scheibchen mit Plasma oder Thrombozyten konnte bei Patient und Kontrolle die Adhäsion der Bakterien an die Oberfläche leicht gesteigert werden. Die gleichzeitige Inkubation der Scheibchen mit Plasma und Plättchen brachte bei Fehlen des vWF keine erhöhte Bakterienadhärenz. Bei der Kontrolle dagegen konnte die Bindungsrate der Bakterien um ca. 30 % erhöht werden (Abb. 4-36).

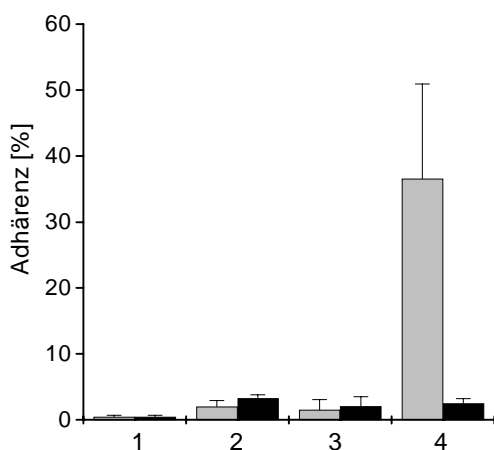


Abb. 4-36: Adhäsion von radioaktiv markierten *S. aureus* Cowan1 an PMMA-Scheibchen. Die Scheibchen wurden unbeschichtet, mit 0,5% (v/v) Plasma, mit Thrombozyten (150.000/μl) und mit Plasma und Thrombozyten beschichtet eingesetzt. Die Werte geben den Mittelwert ± S.D. (n=5) wieder.

- 1: Puffer
- 2: Puffer + Plasma
- 3: Puffer + Thrombozyten
- 4: Puffer + Plasma + Thrombozyten

□ Kontrolle
 ■ „von Willebrand Disease“ Typ3-Patient P.R.

Die durchflußzytometrische Untersuchung der mit *S. aureus* Cowan1 koinkubierten, gefilterten Plättchen von Patient P.R. ergab trotz Fehlen des vWF bei nicht aktivierten und bei aktivierten (0,2 U/ml Thrombin) Thrombozyten eine mit der Kontrolle vergleichbare Assoziationsrate (Abb. 4-37).

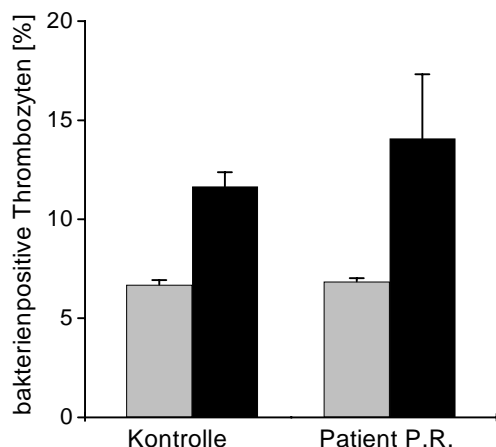


Abb. 4-37: *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation bei einem Patienten P.R. mit von Willebrand Disease“ Typ3 und einer Kontrollperson. Die gefilterten Thrombozyten wurden mit *S. aureus* Cowan1 koinkubiert und die Assoziate im Durchflußzytometer detektiert. Die Werte des Patienten stellen den Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten zur Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) dar.

- nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)

4.4.7 Rolle des Gerinnungsfaktors VIII für die Assoziation

Da der vWF in vivo an den Gerinnungsfaktor VIII gekoppelt vorliegt, war es von weiterem Interesse zu untersuchen, wie sich das Fehlen dieses Faktors auf die Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation auswirken würde. Dies konnte sowohl im Durchflußzytometer als auch im Adhäsionsassay mit Thrombozyten des an Hämophilie A erkrankten Patienten M.S. untersucht werden.

Dazu wurde der Adhäsionsassay parallel zu dem in Kapitel 4.4.6 beschriebenen durchgeführt. In einem weiteren Ansatz konnte durch Zugabe von Beriate[®] HS1000 (1000 I.E. Faktor VIII/66 I.E. vWF) der fehlende Faktor VIII/vWF substituiert werden. Aus Abb. 4-38 wird ersichtlich, daß bei gleichzeitiger Beschichtung der PMMA-Scheibchen durch Plasma und Thrombozyten bei der Kontrolle eine Zunahme der Adhärenz von *S. aureus* Cowan1 bis zu 67 % erreicht werden konnte. Bei dem Patienten M.S. konnte in diesem Ansatz lediglich eine Adhärenz von 2 % erreicht werden. Durch Substitution des fehlenden Faktor VIII konnte jedoch eine mit der Kontrolle vergleichbare Bindung von *S. aureus* Cowan1 an die PMMA-Oberfläche erreicht werden.

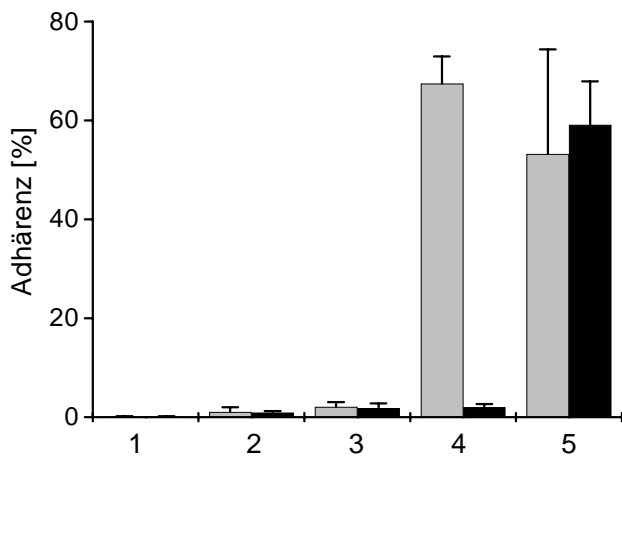


Abb. 4-38: Adhäsion von radioaktiv markierten *S. aureus* Cowan1 an PMMA-Scheibchen. Die Scheibchen wurden unbeschichtet, mit 0,5 % (v/v) Plasma, mit Thrombozyten (150.000/ μ l) und mit Plasma und Thrombozyten beschichtet eingesetzt. Die Werte geben den Mittelwert \pm S.D. (n=4) wieder.

1: Puffer
 2: Puffer + Plasma
 3: Puffer + Thrombozyten
 4: Puffer + Plasma + Thrombozyten
 5: Puffer + Plasma + mit Faktor VIII/vWF vorinkubierte Thrombozyten

□ Kontrolle

■ Hämophilie A-Patient M.S.

Zur Untersuchung der Assoziate im Durchflußzytometer wurden gelfiltrierte Plättchen nicht aktiviert und nach Aktivierung mit 0,2 U/ml Thrombin oder 2 mg/ml Ristocetin eingesetzt. Die Koinkubation erfolgte mit *S. aureus* Cowan1. Um den bei dem Patienten M.S. fehlenden Faktor VIII zu ersetzen, wurde den Proben in einem zweiten Versuchsansatz 1 I.E./ml Faktor VIII + 0,06 U/ml vWF zugesetzt.

Abb. 4-39 zeigt, daß die Thrombozyten des Patienten M.S. eine mit den Kontrollthrombozyten vergleichbare Bindung von *S. aureus* Cowan1 aufweisen. Die Substitution von Faktor VIII/vWF bedingte sowohl bei Kontrolle als auch bei Patient eine Zunahme der Assoziate.

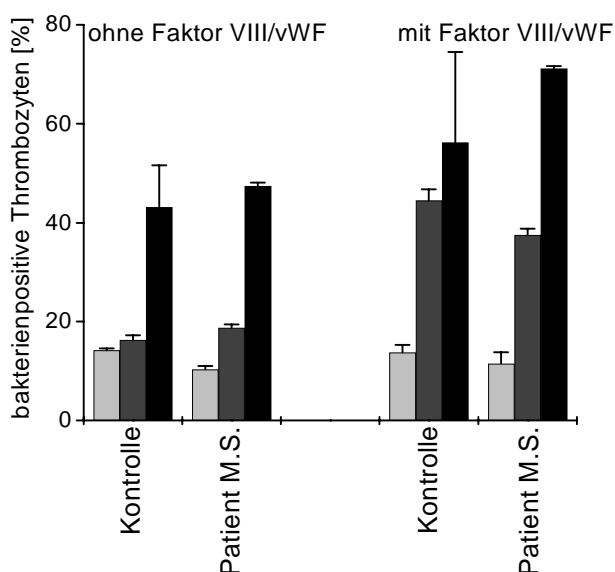


Abb. 4-39: *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation bei einem Patienten M.S. mit Hämophilie A und einer Kontrollperson. Die gelfiltrierten Thrombozyten wurden mit *S. aureus* Cowan1 koinkubiert und die Assoziate im Durchflußzytometer detektiert. Die Werte geben den Mittelwert der prozentualen Anteile bakterienpositiver Thrombozyten zur Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) wieder.

□ nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)

■ aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)

■ aktivierte Thrombozyten (2 mg/ml Ristocetin)

4.4.8 Rolle von Thrombospondin - 1 (TSP-1) für die Assoziation

Inwieweit das in den α -Granula der Thrombozyten sezernierte Thrombospondin-1 zur Bindung von *S. aureus* an die Thrombozyten beiträgt, sollte durch Substitution von Thrombospondin-1 in Versuchsansätzen mit α -Granula-defizienten Thrombozyten ermittelt werden. Das Thrombospondin-1 wurde vor der Koinkubation mit *S. aureus* Cowan1 den gefilterten und mit 0,2 U/ml Thrombin aktivierten Thrombozyten zugefügt.

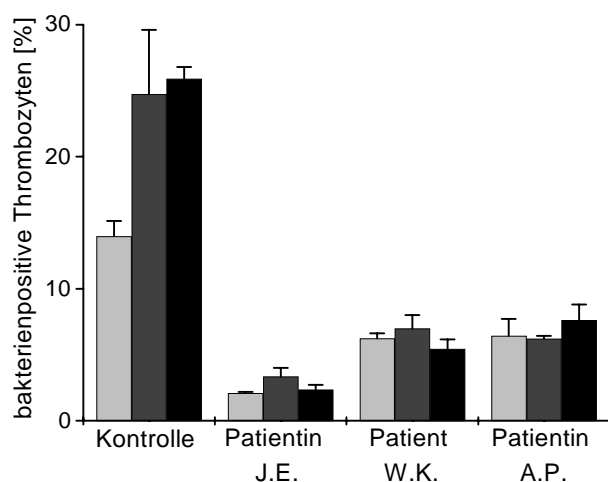


Abb. 4-40: Einfluß von Thrombospondin-1 auf die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation. α -Granula-defiziente Thrombozyten der Patienten J.E. (" α -, δ -storage pool disease"), W.K. und A.P. ("Gray-platelet-syndrome") wurden gefiltert, mit 0,2 U/ml Thrombin aktiviert und der Ansatz mit 30 μ g/ml Thrombospondin-1 substituiert. Nach Koinkubation mit *S. aureus* Cowan1 wurden die Assoziate im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte geben den Mittelwert des prozentualen Anteils bakterienpositiver Thrombozyten zur Thrombozytengesamtpopulation \pm S.D. (n=3) an.

- nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (0,2 U/ml Thrombin) + Thrombospondin-1

Bei allen drei Patienten konnte durch Aktivierung mit 0,2 U/ml Thrombin kein Anstieg der Assoziate erreicht werden. Auch die Substitution von TSP-1 konnte keine Erhöhung der Assoziationsrate bewirken. Thrombozyten der Kontrollperson zeigten nach ihrer Aktivierung einen Anstieg der Assoziationsrate, der jedoch durch Zugabe von Thrombospondin-1 nicht verändert werden konnte (Abb. 4-40).

4.5 Untersuchungen zur Aktivierung von Thrombozyten durch *Staphylococcus aureus*

4.5.1 Expression von CD62 auf Thrombozyten durch Interaktion mit *Staphylococcus aureus*

Zur Untersuchung, inwieweit *S. aureus* als Agonist für die Aktivierung von Thrombozyten in Frage kommt, wurde die Expression des aktivierungsabhängigen α -Granulamembranproteins CD62 auf den Thrombozyten im Durchflußzytometer quantitativ bestimmt.

Zuvor wurden Thrombozyten aus dem PRP mit *S. aureus* Newman bzw. Cowan1 für 10 min koinkubiert. Die Detektion der CD62-Expression erfolgte durch Einsatz eines FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen CD62.

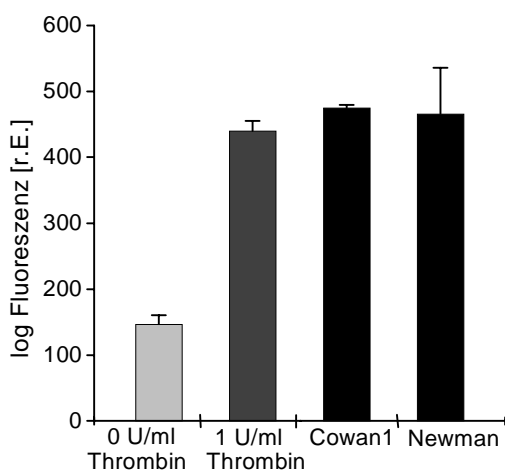


Abb. 4-41: *S. aureus*- bzw. Thrombin-induzierte CD62-Expression auf Thrombozyten. Die Plättchen (25.000/ μ l) wurden mit 1 U/ml Thrombin bzw. durch Koinkubation mit *S. aureus* Newman bzw. Cowan1 (120.000/ μ l) aktiviert und die CD62-Expression durch Einsatz eines FITC-konjugierten anti-CD62-Antikörpers im Durchflußzytometer bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (Thrombinaktivierung $n=5$; Bakterienaktivierung $n=3$) dar.

- nicht aktivierte Thrombozyten (0 U/ml Thrombin)
- aktivierte Thrombozyten (1 U/ml Thrombin)
- durch Bakterien aktivierte Thrombozyten

Abb. 4-41 stellt die Aktivierung von Thrombozyten durch Bakterien, verglichen mit der Aktivierung der Thrombozyten durch den Agonisten Thrombin dar. Durch Koinkubation der Thrombozyten sowohl mit *S. aureus* Newman als auch mit Cowan1 wird im Vergleich zu Thrombozyten ohne Bakterienzugabe eine erhöhte Expression von CD62 auf der Plättchenoberfläche erreicht, was sich in einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals widerspiegelt. Die Aktivierung durch die Bakterien ist dabei mit dem Aktivierungsgrad von mit 1 U/ml Thrombin aktivierten Plättchen vergleichbar.

4.5.2 Interindividuelle Thrombozytenaktivierung

Auf die Aktivierbarkeit ihrer Thrombozyten durch *S. aureus* Newman wurden insgesamt 55 gesunde Probanden untersucht. Bei 5 von 55 der untersuchten Personen erhöhte sich nach der Inkubation der Thrombozyten mit *S. aureus* Newman die CD62-Expression signifikant, während bei 35 von 55 der Probanden keinerlei Zunahme zu beobachten war. Bei 15 von 55 der Spender konnte lediglich eine geringe, jedoch keine eindeutige Aktivierung der Thrombozyten festgestellt werden. Tabelle 4-2 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Aktivierbarkeit der Thrombozyten	nicht aktivierbar	aktivierbar	etwaige Aktivierbarkeit
Anzahl der Personen (n=55)	35	5	15

Tabelle 4-2: Aktivierbarkeit von Thrombozyten gesunder Probanden durch Koinkubation mit *S. aureus* Newman

Um zu verifizieren, inwieweit die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* ein personenspezifisches Merkmal ist, wurden die Thrombozyten von 6 Probanden mehrfach auf ihre Aktivierbarkeit überprüft.

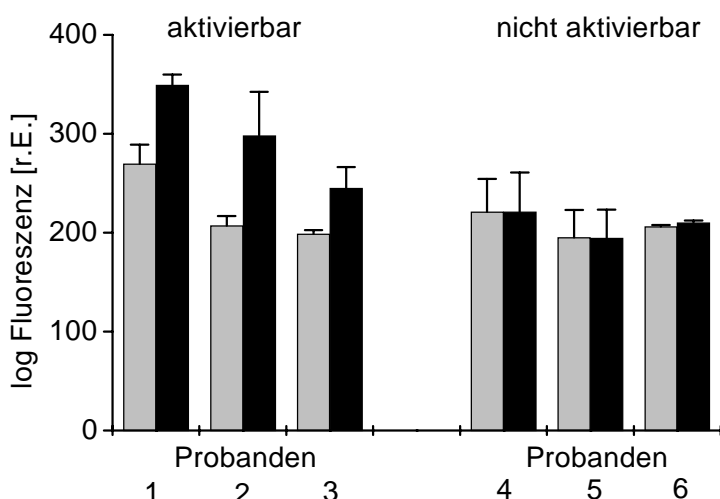


Abb. 4-42: CD62-Expression auf Thrombozyten von Probanden, deren Thrombozyten aktivierbar waren (Proband 1-3) und Probanden, deren Thrombozyten nicht aktivierbar waren (Proband 4-6). Die Thrombozyten (25.000/ μ l) wurden mit *S. aureus* Newman (120.000/ μ l) koinkubiert, mit FITC-gekoppeltem anti-CD62-Antikörper markiert und die CD62-Expression im Durchflußzytometer erfasst. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3).

■ Thrombozyten ohne *S. aureus*
 ■ Thrombozyten nach Koinkubation mit *S. aureus*

Abb. 4-42 zeigt, daß bei Vorliegen der Aktivierbarkeit eines Spenders durch *S. aureus* diese Beobachtung ausnahmslos reproduziert werden konnte. Umgekehrt ließen sich Plättchen von Spendern ohne Aktivierbarkeit ausnahmslos nie aktivieren.

4.5.3 Rolle des FcRIIA - Rezeptors für die Aktivierung

Da die Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* nach Kapitel 4.5.2 ein personenspezifisches Merkmal ist, stellte sich die Frage, in welcher Eigenschaft sich die Plättchen von Personen, deren Thrombozyten aktivierbar waren, von Plättchen der Personen, deren Thrombozyten nicht aktivierbar waren, voneinander unterscheiden. Bekannt ist ein Genpolymorphismus für den FcRIIA-Rezeptor auf Plättchen. Ob der Rezeptor für die Aktivierung der Thrombozyten relevant ist und ob der Polymorphismus mit der Aktivierbarkeit der Thrombozyten in Zusammenhang stehen könnte, sollte in folgenden Versuchen geklärt werden.

4.5.3.1 Hemmung der Aktivierung durch Einsatz eines anti – FcRIIA - Antikörpers (Klon IV.3 - Fab)

Um zu untersuchen, ob der FcRIIA-Rezeptor an der Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* beteiligt ist, wurden Thrombozyten aus dem PRP mit steigenden Mengen Fab-Fragments des inhibierenden anti-FcRIIA-Antikörpers (Klon IV.3) vorinkubiert, die Thrombozyten durch Koinkubation mit *S. aureus* Newman aktiviert und die CD62-Expression auf den Thrombozyten durchflußzytometrisch bestimmt. Als Vergleichswerte der CD62-Expression dienten nicht aktivierte und mit 0,2 U/ml Thrombin aktivierte Thrombozyten ohne Antikörperzugabe.

Abb. 4-43 zeigt, daß die durch *S. aureus* induzierte Aktivierung der Plättchen durch Zugabe von Fab-Fragmenten des anti-FcRIIA-Antikörpers (Klon IV.3) konzentrationsabhängig gehemmt werden kann. Die CD62-Expression erreichte dabei zunächst die Größenordnung von mit 0,2 U/ml Thrombin aktivierten Plättchen, konnte aber bei Zugabe von 1 µg/ml des Antikörpers nahezu auf das Niveau nicht aktivierter Plättchen reduziert werden.

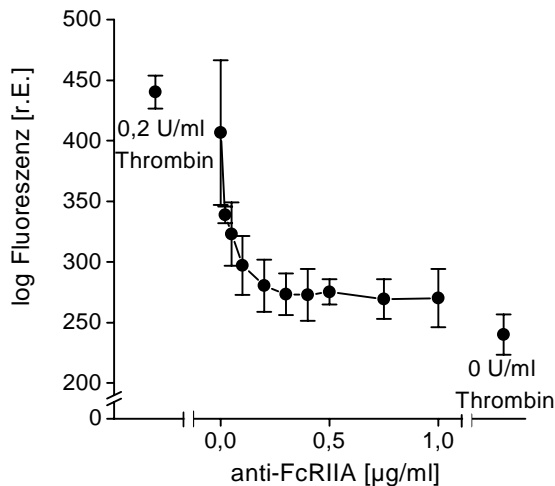


Abb. 4-43: *S. aureus*-induzierte CD62-Expression auf Thrombozyten nach Inkubation der Plättchen mit dem Fab-Fragment des anti-FcR1IA-Antikörpers. Als Referenzwerte diente die CD62-Expression auf mit 0 U/ml und 0,2 U/ml Thrombin aktivierten Thrombozyten. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3).

4.5.3.2 Rolle des FcR1IA - Genpolymorphismus

Ein bekannter FcR1IA-Genpolymorphismus besteht in einer Variation der Aminosäuren an Position 131 des für den Rezeptor kodierenden Gens. Dabei wird durch eine Punktmutation die Aminosäure Arginin durch Histidin getauscht, was zum Entstehen der drei Genotypen FcR1IA-Arg/Arg, FcR1IA-His/His und FcR1IA-Arg/His führt. Für die Untersuchung des FcR1IA-Genpolymorphismus wurde die DNA von 47 Personen isoliert und in der Polymerasekettenreaktion untersucht.

Für die FcR1IA-spezifische Amplifizierung wurden die Primer P52 und P63 eingesetzt. Für die allelspezifische Amplifizierung aus diesem Produkt wurden die Primer P5G (spezifisch für Arginin) und P4A (spezifisch für Histidin) kombiniert mit Primer P13 eingesetzt. Als interne Kontrolle diente ein 440 bp-Produkt, welches durch Einsatz der Primer CRP-I und CRP-II aus dem C-reaktiven Protein (CRP)-Gen erhalten werden konnte.

Abb. 4-44 zeigt exemplarisch die Darstellung der drei unterschiedlichen Genotypen in der PCR. Die Amplifizierung der DNA von Proband 1 (Bande 1 + 2) ergab durch Einsatz des Primers P4A ein 278 bp-Produkt, während bei Einsatz des Primers P5G kein Produkt amplifiziert werden konnte. Dies entspricht dem homozygoten Genotyp FcR1IA-His/His. Bei Proband 2 (Bande 3 + 4) hingegen konnte durch beide Primer ein 278 bp-Produkt amplifiziert werden. Dies entspricht dem heterozygoten Genotyp FcR1IA-Arg/His. Die Amplifizierung der DNA des Spenders 3 (Bande 5 + 6) brachte nur bei Einsatz des Primers P5G ein 278 bp-Produkt, was einen homozygoten Genotyp FcR1IA-Arg/Arg bedeutet. Die Kontrolle, ein 440 bp-Produkt, war in allen Fällen positiv.

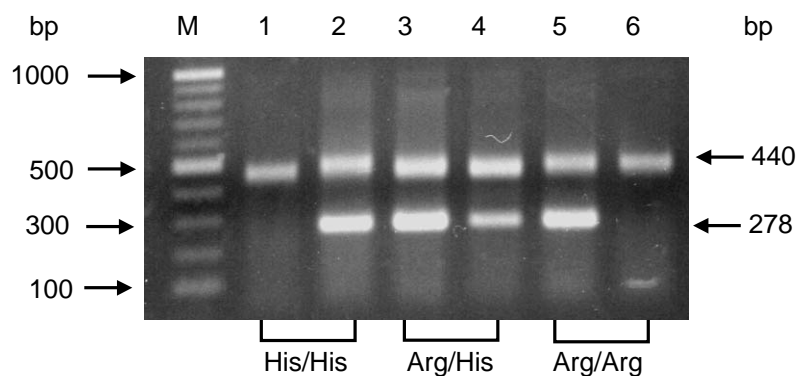


Abb. 4-44: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Darstellung der drei Genotypen FcRIIA-Arg/Arg, FcRIIA-His/His und FcRIIA-Arg/His des FCRIIA-Polymorphismus. Als interne Kontrolle diente ein 440 bp-Produkt aus dem CRP-Gen. Die aus 278 bp bestehenden Amplikons repräsentieren die allelspezifische Amplifizierung der eingesetzten DNA.

M: Molekulargewichtsstandard

Bande 1,3 und 5: Einsatz der Primer P5G (spezifisch für Arginin) und P13

Bande 2,4 und 6: Einsatz der Primer P4A) (spezifisch für Histidin) und P13

Die aus der PCR erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Die Probanden wurden dabei nach der Aktivierbarkeit ihrer Thrombozyten in die in Kapitel 4.5.2 erwähnten Gruppen aufgeteilt. Da in der Pathogenese der Staphylokokkenendokarditis die Aktivierung der Thrombozyten eine bedeutende Rolle spielt, sollte in einer weiteren Gruppe geklärt werden, inwieweit das Vorkommen eines bestimmten Genotypes für das Auftreten einer durch Staphylokokken bedingten Endokarditis von Bedeutung ist. Dazu wurde die DNA von neun an einer *Staphylococcus aureus*-Endokarditis leidenden Patienten untersucht.

Aktivierbarkeit der Thrombozyten	n	FCRIIA-Allelhäufigkeit [%]		FCRIIA-Genotyp		
		Arginin	Histidin	Arg/Arg	Arg/His	His/His
aktivierbar	4	12,5	87,5	-	1	3
nicht aktivierbar	22	66	34	11	7	4
etwaige Aktivierbarkeit	8	50	50	1	6	1
Endokarditis-Patienten	9	78	22	6	2	1

Tabelle 4-3: Häufigkeitsverteilung des Vorkommens der FcRIIA-Genotypen und der Allele bei Probanden mit unterschiedlicher Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* und Endokarditispatienten.

Im Vergleich der Häufigkeit eines Allels zeigte sich, daß in der Gruppe der Personen mit durch *S. aureus* aktivierbaren Thrombozyten Histidin, in der Gruppe der nicht aktivierbaren Thrombozyten und der Endokarditispatienten jedoch Arginin überwog. Gleich stark waren beide Allele in der Gruppe der Personen vertreten, bei denen keine eindeutige Aktivierbarkeit zu beobachten war.

In der Häufigkeit des Vorkommens eines bestimmten Genotyps war in jeder Gruppe ein jeweils anderer Genotyp am stärksten vertreten. Signifikant unterschied sich jedoch lediglich die Gruppe der Personen mit aktivierbaren von der Gruppe der Personen mit nicht aktivierbaren Thrombozyten ($p < 0,05$; siehe Tabelle 4-4).

Im Vergleich der Gruppe der Endokarditis-Patienten mit den gesunden Probanden verhielten sich die Thrombozyten im Bezug auf ihre Aktivierbarkeit ähnlich der Personengruppe mit nicht aktivierbaren bzw. etwaig aktivierbaren Plättchen ($p > 0,05$). Der FcRIIA-Genotyp von der Gruppe gesunder Probanden, deren Thrombozyten sich durch *S. aureus* aktivieren ließen, unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von der Gruppe der *S. aureus*-Endokarditis-Patienten.

	aktivierbare Thrombozyten	Endokarditis- Patienten	etwaige Aktivierbarkeit der Thrombozyten
nicht aktivierbare Thrombozyten	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,1$
etwaige Aktivierbarkeit der Thrombozyten	$p > 0,05$	$p > 0,05$	—
aktivierbare Thrombozyten	—	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Tabelle 4-4: Darstellung der Signifikanzen zwischen den untersuchten Personengruppen.

4.5.4 Aktivierung von GPIIb/IIIa - defizienten Thrombozyten durch *Staphylococcus aureus*

Untersuchungen an den GPIIb/IIIa-defizienten Plättchen der bereits in Kapitel 4.4.4 erwähnten Patientin A.M. sollten Aufschluß darüber geben, ob dieses Glykoprotein für die Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* Newman von Bedeutung ist.

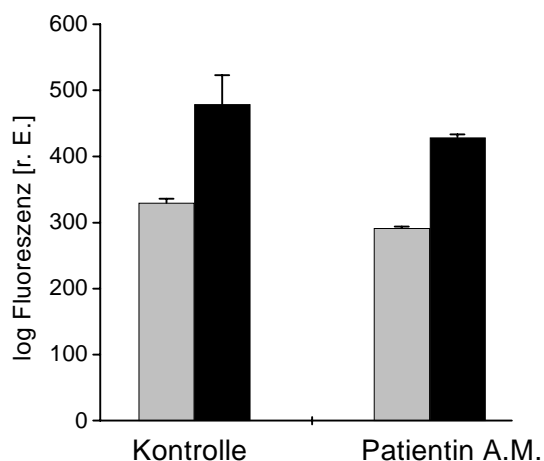


Abb. 4-45: CD62-Expression auf GPIIb/IIIa defizienten Thrombozyten und Kontrollthrombozyten vor und nach Aktivierung der Plättchen durch *S. aureus* Newman. Die Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert der durchflußzytometrisch ermittelten Mediane \pm S.D. (n=3). Der Mittelwert wurde bestimmt aus einem einmalig durchgeführten Experiment mit Dreifachbestimmung.

□ Thrombozyten ohne *S. aureus*
 ■ Thrombozyten nach Koinkubation mit *S. aureus*

Aus Abb. 4-45 wird ersichtlich, daß die GPIIb/IIIa-defizienten Thrombozyten der Patientin A.M. nach Koinkubation mit *S. aureus* Newman eine deutlich höhere CD62-Expression zeigten als Plättchen, denen keine Bakterien zugesetzt wurden. Die Werte sind dabei mit denen der Positivkontrolle vergleichbar. Eine Aktivierung kann also auch bei Fehlen dieses Membranglykoproteins stattfinden.

4.5.5 Aktivierung von Thrombozyten eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 durch *Staphylococcus aureus*

Um zu testen, ob für die Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* das Vorkommen des von Willebrand Faktors notwendig ist, wurden Thrombozyten des in Kapitel 4.4.6 beschriebenen Patienten P.R. untersucht.

Die Thrombozyten wurden dabei ohne Zugabe von vWF und nach Substitution des vWF durch Vorinkubation mit 1 I.E./ml Hämate[®]HS500 eingesetzt.

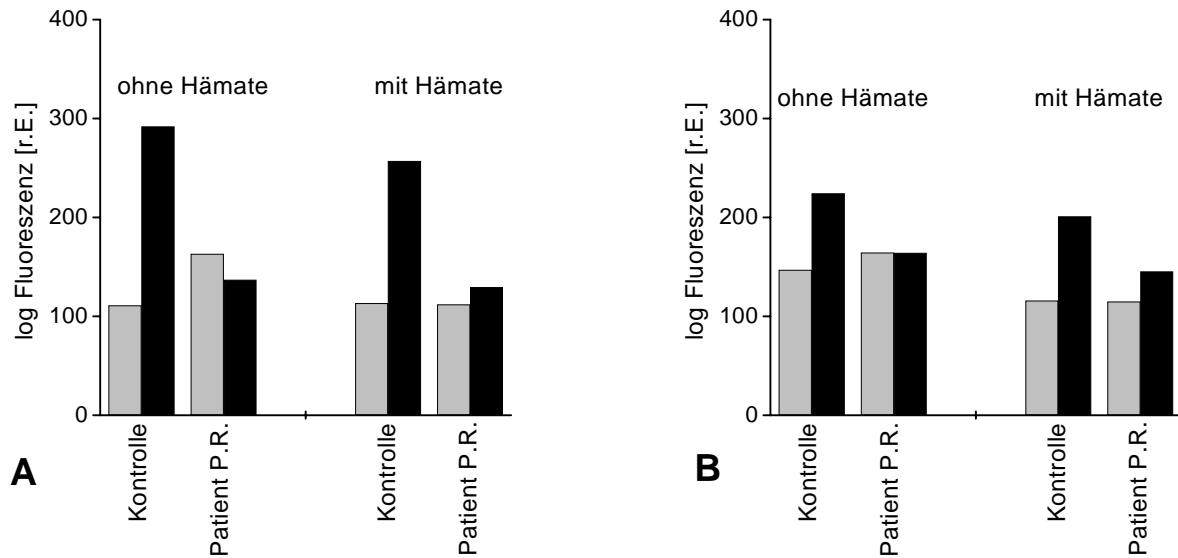


Abb. 4-46: CD62-Expression auf Thrombozyten eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 und Kontrollthrombozyten vor und nach Aktivierung der Plättchen durch *S. aureus*. Die Thrombozyten wurden ohne und mit Substitution von vWF durch Hämate[®] HS500 eingesetzt.

A: *S. aureus* Cowan1

B: *S. aureus* Newman

□ Thrombozyten ohne *S. aureus*

■ Thrombozyten nach Koinkubation mit *S. aureus*

Aus Abb. 4-46 wird ersichtlich, daß die Thrombozyten des Patienten P.R. durch *S. aureus* nicht aktiviert werden konnten. Wurde dem Ansatz jedoch vWF hinzugefügt, konnte eine Aktivierung der Plättchen erreicht werden. Die CD62-Expression blieb jedoch unter den Werten der Kontrollplättchen.

5 Diskussion

5.1 Untersuchung der Thrombozyten - *Staphylococcus aureus* - Assoziation

Die Interaktion zwischen Thrombozyten und *Staphylococcus aureus* stellt ein zentrales Element für die Entstehung endovaskulärer Infektionen dar. Dabei ermöglichen die an vorgeschädigtes Endothel oder Endokard anhaftenden Plättchen die Anbindung der zirkulierenden Bakterien durch Bereitstellung von Bindungsstellen (Sullam et al, 1996; Ford and Douglas, 1997). Mit Hilfe der Durchflußzytometrie soll in dieser Arbeit untersucht werden, über welche Rezeptoren bzw. Adhäsine die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten ermöglicht wird. Die Methode der Durchflußzytometrie ermöglicht dabei die Untersuchung des Adhäsionsmechanismus in Suspension. Durch die quantitative Bestimmung der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziate wird eine Charakterisierung der für die Interaktion relevanten Rezeptoren auf Seiten der Thrombozyten und der Bakterien möglich. Desweiteren kann untersucht werden, welche Rolle Plasmabestandteile als „Brückenmoleküle“ spielen.

Ein Problem der durchflußzytometrischen Bestimmung der Thrombozyten-Bakterien-Assoziate ist die deutliche Trennung der Assoziate von den Einzelpopulationen der Thrombozyten und Bakterien. In vorangegangenen Untersuchungen benötigten Yeaman et al (1992) und Sullam et al (1990) dazu ein Durchflußzytometer mit zwei Anregungslasern. Durch die in dieser Arbeit gewählte Markierung der Thrombozyten mit Phycoerythrin konjugierten, plättchenspezifischen Antikörpern und Markierung der Bakterien mit dem Farbstoff Syto 13, konnte erstmals eine Trennung der Zellpopulationen bei Verwendung eines Durchflußzytometers mit nur einem Anregungslaser ermöglicht werden (Abb. 4-1).

Yeaman et al (1992) und Sullam et al (1990) konnten in ihren Untersuchungen eine direkte, rasche, reversible und sättigbare Bindung von Bakterien an Thrombozyten nachweisen und diskutierten dahingehend die Bakterien-Thrombozyten-Assoziation als eine Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand. Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigten die rasche und direkte (d. h. ohne Vorhandensein von Plasmabestandteilen) Anheftung der Bakterien an Thrombozyten (Abb. 4-6),

konnten jedoch bis zu einem *S. aureus*-Bakterien-Verhältnis von 20:1 keine Sättigung in der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten erreichen (Abb. 4-4).

Die Koinkubation von Thrombozyten mit *S. aureus*, welche unterschiedlich lange bebrütet worden waren, zeigte, daß *S. aureus*, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (Bebrütungszeit 2 Stunden) und *S. aureus*, welche sich in der stationären Phase befanden (Bebrütungszeit 1 Tag) sich in ihrer Bindungsfähigkeit an aktivierte Thrombozyten kaum unterschieden. Nach einer Bebrütungszeit von 5 Tagen und 10 Tagen konnte jedoch eine deutliche Abnahme der Bindungsfähigkeit von Bakterien an Thrombozyten beobachtet werden (Abb. 4-7).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß die Bindung von *S. aureus* an Plättchen in Form einer Rezeptor-Liganden-Bindung verläuft. Sie lassen jedoch auch vermuten, daß mehrere Rezeptoren für die Interaktion notwendig sind. Die Expression von Adhäsinen variiert bei *S. aureus* stark zwischen der logarithmischen und der stationären Phase (Patel et al 1987, 1992; Coleman et al, 1978). So konnten Tompkins et al (1992) vier Proteine auf *S. aureus* nachweisen, welche vermehrt in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wurden und damit die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen in dieser Phase ermöglichten. Die in dieser Arbeit gezeigte Unabhängigkeit der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation zwischen der exponentiellen und der stationären Phase läßt somit vermuten, daß mehrere Adhäsine auf *S. aureus* an der Interaktion beteiligt sind. Die verminderte Expression eines für die Interaktion wichtigen Adhäsins während einer Wachstumsphase könnte durch die verstärkte Expression eines anderen Adhäsins ausgeglichen werden. Die reduzierte Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten nach einer Bebrütungszeit von 5 und 10 Tagen könnte dadurch bedingt sein, daß sich die Bakterien nach dieser Zeit nicht mehr in der stationären Phase, sondern bereits in der Absterbephase befinden.

Für eine spezifische Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten spricht auch, daß verschiedene *S. aureus*-Stämme eine unterschiedliche Bindungsfähigkeit für Thrombozyten aufweisen (Abb. 4-33). So erreicht der Stamm Cowan1 z. B. stets eine niedrigere Assoziationsrate als Stamm Newman (Abb. 4-29; Abb. 4-34). Während Cowan1 als Protein A reicher Stamm beschrieben wird, besitzt Newman hingegen eine hohe Anzahl an Adhäsinen für Fibrinogen. Die unterschiedliche Expression dieser Adhäsine könnte die Ursache für die unterschiedliche Bindungsfähigkeit dieser Stämme an Thrombozyten sein.

5.2 Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten können durch unterschiedliche Agonisten wie z. B. Thrombin, ADP oder durch die Bindung an subendotheliale Matrix aktiviert werden. Dadurch kommt es zu weitgehenden Veränderungen der Plättchen. Neben dem Formwandel („shape change“) kommt es durch die Verschmelzung der α -Granula- und „dense-body“- Membran mit der Zellmembran zur Ausschüttung der Granulainhaltsstoffe und zur Präsentation zusätzlicher Glykoproteine wie CD62 (P-Selektin) und CD63. Ausgeschüttete Granulaproteine wie Fibrinogen, vWF und Thrombospondin können teilweise an die Plättchenmembran zurückgebunden werden. Weiterhin kommt es zur vermehrten Expression und Formwandel des Glykoproteines GPIIb/IIIa, wodurch die Anbindung von Proteinen wie z.B. Fibrinogen, vWF und Thrombospondin ermöglicht bzw. verbessert wird. Die Untersuchung der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation an gefilterten Plättchen und an Plättchen im PRP zeigen, daß mit zunehmender Plättchenaktivierung die Bindung von Bakterien an die Plättchen zunimmt (Abb. 4-8). Thrombozyten erfahren während ihrer Aktivierung also Veränderungen, welche es *S. aureus* ermöglicht, verstärkt an diese anzubinden. Dies kann sowohl in plasmafreien Milieu als auch im PRP beobachtet werden. Allerdings können im Vorhandensein von Plasmaproteinen ca. 20 % mehr Thrombozyten *S. aureus* binden als dies bei fehlenden Plasmaproteinen der Fall ist. Dies läßt vermuten, daß die Bakterien über die bei der Aktivierung verstärkt bzw. erstmals erscheinenden Glykoproteine wie CD36, CD62, CD63, GPIIb/IIIa anbinden könnten, bzw. die Konformitätsänderung von GPIIb/IIIa eine Anbindung möglich machen könnte. Auch die Assoziation über die an die Plättchenmembran rückbindenden Granulaproteine wie Fibrinogen, vWF und Thrombospondin scheint möglich.

5.3 Plasmaproteine

Aufgrund des unmittelbaren Kontaktes von intravaskulären *S. aureus* und Thrombozyten im Blut geschieht in vivo die Adhäsion in Gegenwart von Plasmabestandteilen, welche zwischen Thrombozytenrezeptoren und Staphylokokkenadhäsinen als Brückenmoleküle dienen können. Untersuchungen der *S. aureus*-Thrombozyten-Interaktion in Suspension wurden jedoch stets an Thrombozyten durchgeführt, welche sich in plasmafreier Lösung befanden (Yeaman et al, 1992). Durch den Vergleich der Assoziation von *S. aureus* mit Plättchen im PRP (in Gegenwart von Plasmaproteinen) und nach Gelfiltration (nach Entfernung der Plasmaproteine) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß in Gegenwart von

Plasmafaktoren mit Thrombin aktivierte Plättchen nahezu doppelt so viele Bakterien binden als Plättchen in plasmaproteinfreiem Medium (Abb. 4-9). Diese Beobachtung bestätigen Untersuchungen von Herrmann et al (1993), bei denen durch Zugabe von Plasma die Bindung von Bakterien an immobilisierte Thrombozyten erheblich erhöht werden konnte. Dies läßt darauf schließen, daß Plasmaproteine Einfluß auf die Bindung von *S. aureus* an die Plättchen nehmen. Es stellte sich nun die Frage, welche Plasmaproteine für die verstärkte Anbindung der Bakterien an die Thrombozyten verantwortlich sind. Dies konnte durch Zugabe einzelner Plasmaproteine zu gefilterten Plättchen und anschließender Koinkubation mit *S. aureus* Newman geklärt werden (Abb. 4-10/A). Neben der Bindung an Thrombozyten war für die ausgewählten Proteine Fibrinogen (Boden und Flock, 1989), vWF (Herrmann et al, 1997), Fibronectin (Proctor et al, 1982), Vitronectin (Liang et al, 1993) und Thrombospondin (Herrmann et al, 1991) die Bindung an *S. aureus* bekannt.

Während die Zugabe von Fibrinogen und vWF/Faktor VIII die Assoziationsrate zwischen Bakterien und aktivierten Thrombozyten deutlich erhöhte, konnte durch Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin-1 keine verstärkte Anbindung erreicht werden. An nicht aktivierten Plättchen konnte auch durch Fibrinogen und vWF/Faktor VIII keine verstärkte Bindung von *S. aureus* erreicht werden. Dies liegt darin begründet, daß nicht aktivierte Plättchen Fibrinogen und vWF nicht binden können und somit eine Interaktion nicht stattfinden kann. Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung von Fibrinogen und eine Beteiligung des vWF bzw. des Gerinnungsfaktor VIII an der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation nahe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation ein komplexer Vorgang ist bei dem 1) die Bakterien an Thrombozyten direkt d.h. über eine Rezeptor-Liganden-Interaktion binden können, 2) die Bindung durch Plasmaproteine wie Fibrinogen und vWF bzw. Faktor VIII verstärkt werden kann und 3) der Aktivierungszustand der Plättchen eine Rolle spielt.

5.3.1 Fibrinogen

Fibrinogen ist ein im Plasma und in den α -Granula der Thrombozyten vorkommendes Protein. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, daß Fibrinogen sowohl die Bindung von Bakterien an Oberflächen, als auch die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten vermittelt (Herrmann et al, 1993; Hamill et al, 1986; Ford und Douglas, 1997). In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der Durchflußzytometrie

geklärt werden, inwieweit Fibrinogen für die Assoziation zwischen *S. aureus* und Thrombozyten notwendig ist und welche Adhäsine auf Seiten der Bakterien für die Fibrinogenbindung relevant sind.

Durch Einsatz von FITC-konjugiertem Fibrinogen konnte dessen Bindung zunächst separiert auf Thrombozyten und Bakterien in Suspension nachgewiesen werden. Auf Plättchen zeigte sich nach Aktivierung mit Thrombin eine konzentrationsabhängige Bindung von Fibrinogen (Abb. 4-11). Durch die Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin wird der Rezeptor für Fibrinogen, GPIIb/IIIa, in die Lage versetzt lösliches Fibrinogen zu binden (Hynes, 1992), wozu er auf nicht aktivierten Thrombozyten nicht in der Lage ist.

Die Bindung von FITC-konjugiertem Fibrinogen an Bakterien zeigte den Verlauf einer Sättigungskinetik, und war, da durch unmarkiertes Fibrinogen hemmbar, spezifisch (Abb. 4-12; Abb. 4-13). Durch den Vergleich unterschiedlicher *S. aureus*-Stämme mit *E. coli* ATCC 25922 und *S. epidermidis* RP62A konnte deutlich gemacht werden, daß *S. aureus* im Gegensatz zu Nicht-*S. aureus*-Stämmen in der Lage ist, wesentlich mehr Fibrinogen zu binden, was für das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen für Fibrinogen auf *S. aureus* spricht.

Der Nachweis, daß sowohl Thrombozyten als auch *S. aureus* in der Lage sind Fibrinogen zu binden, sagt noch nichts darüber aus, ob Fibrinogen tatsächlich an der Interaktion zwischen *S. aureus* und Plättchen beteiligt ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde der Einfluß zweier Peptide, die die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten bzw. *S. aureus* hemmen, auf die Assoziation getestet. Durch Einsatz des RGDS-Peptids wurde die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten über die zwei RGD-Sequenzen der α -Kette gehemmt. Dabei konnte die Assoziation von *S. aureus* und aktivierten Thrombozyten um bis zu 20 % gehemmt werden (Abb. 4-14). Durch Einsatz des „fibrinogen-binding inhibitor peptids“ wurde die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten und an *S. aureus* über die Dodekapeptidsequenz aus der γ -Kette des Fibrinogens verhindert. Die Assoziation von aktivierten Thrombozyten und *S. aureus* konnte hierbei um bis zu 45 % verringert werden (Abb. 4-15). Da Fibrinogen an nicht aktivierte Plättchen nicht oder nur gering anbinden kann, konnte, wie erwartet, an ruhenden Thrombozyten kein Einfluß der beiden Peptide auf die Assoziationsrate festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Fibrinogen für die Bindung von *S. aureus* an Plättchen von Bedeutung ist, wobei sowohl die Anbindung von Fibrinogen über die RGDS-Sequenz als auch über die Dodekapeptidsequenz eine Rolle spielt. Da die

Assoziatbildung durch Einsatz der Peptide jedoch nicht vollständig unterbunden werden konnte, müssen weitere Faktoren für die Assoziatbildung wichtig sein.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie sollte geklärt werden, inwieweit verschiedene, auf *S. aureus* exprimierte Oberflächenadhäsine für die Bindung von Fibrinogen in Suspension in Frage kommen. Im Vergleich der Fibrinogenbindung an unterschiedliche Bakterienstämme fiel auf, daß Wood 46, ein Protein A defizienter Stamm, deutlich weniger Fibrinogen als die Vergleichsstämme binden konnte (Abb. 4-16). Dies gab erste Hinweise darauf, daß Protein A als mögliches Bindungsadhäsine für *S. aureus* fungieren könnte.

Untersuchungen mit Protein-A-Deletionsmutanten der Stämme Newman, 8325-4 und Cowan1 ergaben, daß die Deletionsmutanten der drei verwendeten *S. aureus*-Stämme weniger als die Hälfte, bei Stamm 8325-4 lediglich ein Viertel der Fibrinogenmoleküle binden konnten, als die entsprechenden Wildtyp-Stämme (Abb. 4-17/A/B/C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß *S. aureus* in der Lage ist, Fibrinogen über Protein A zu binden. Bei *S. aureus* Newman und 8325-4 konnte durch Komplementierung eine erhöhte Fibrinogenbindung im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Die Tatsache, daß bei *S. aureus* 8325-4 die Fibrinogenbindung der komplementierten Mutante um das 15fache höher als beim Wildtyp lag, kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß die Komplementierung eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression an Protein A bewirkt und Fibrinogen so vermehrt anbinden kann.

Durch Einsatz eines anti-Protein-A-Antikörpers konnte Protein A als Bindungsadhäsine für Fibrinogen auf *S. aureus* bestätigt werden. So konnten bei *S. aureus* Newman durch den anti-Protein-A-Antikörper bis zu 41 %, bei *S. aureus* 8325-4 bis zu 25 % und bei *S. aureus* Cowan1 bis zu 30 % mehr Fibrinogenmoleküle aus ihrer Bindung verdrängt werden, als durch Einsatz eines unspezifisch bindenden Antikörpers (Abb. 4-18/A/B/C).

Anhand von Westernblots konnte Jörg Hartleib aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Münster, ebenfalls die Fibrinogenbindung an Protein A nachweisen und die obigen Ergebnisse hiermit bestätigen (mündliche Mitteilung).

1993 konnten McGavin und seine Mitarbeiter ein 72-kDa-Protein reinigen, welches im Westernblot, neben anderen Proteinen, auch Fibrinogen binden konnte. Die Fähigkeit dieses von Jönsson et al (1995) als Map-Protein charakterisierten Adhäsins zur Fibrinogenbindung, konnten Hussain et al (1998) durch die Bindung von Map-Deletionsmutanten an oberflächengebundenes Fibrinogen bestätigen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen im Durchflußzytometer konnten jedoch zeigen, daß die Bindung von gelösten Fibrinogen an Map-Deletionsmutanten von *S. aureus* Newman im Vergleich zum Wildtyp nicht verringert waren (Abb. 4-19/A). Durch Einfügen des das Map-Gen enthaltenden Plasmids pCX19 in *S. aureus* SA113 wurde eine dem Wildtyp-Stamm SA113 vergleichbare Fibrinogenbindung erreicht (Abb. 4-19/B). Für die Bindung von Fibrinogen an *S. aureus* in Suspension scheint das Map-Protein somit nicht von Bedeutung zu sein. Ergebnisse, die durch Untersuchungen über die Bindung von oberflächengebundenem Fibrinogen gewonnen werden, lassen jedoch nicht notwendigerweise auch Rückschlüsse auf die Bindung von gelöstem Fibrinogen zu, da Fibrinogen durch Adsorption an Oberflächen eine Konformitätsänderung erfährt, welches die Interaktion mit Zellen verändern kann (Lindon et al, 1986). Es wäre somit möglich, daß das Map-Protein gelöstes Fibrinogen nicht binden kann, an Oberflächen adhäriertes Fibrinogen aber zu binden in der Lage ist.

Ein weiteres, auf *S. aureus* exprimiertes Adhäsins für die Fibrinogenbindung ist der „clumping factor“ (Boden und Flock, 1989). Untersuchungen mit „clumping factor“-Deletionsmutanten ergaben, daß die Mutante von *S. aureus* Newman bei geringen Konzentrationen von Fibrinogen wesentlich weniger Fibrinogen binden konnte als der Wildtyp. Durch Erhöhung der Fibrinogenkonzentration näherte sich die Anzahl der an die Mutante gebundenen Fibrinogenmoleküle jedoch der des Wildtyps an (Abb. 4-20/A). Dieses Ergebnis spricht für das Vorhandensein von mindestens zwei Fibrinogenbindungsproteinen auf *S. aureus*, welche jedoch unterschiedliche Affinität für Fibrinogen besitzen. Bei der Deletionsmutante fehlt das Adhäsins mit hoher Affinität, in diesem Fall der „clumping factor“. Erst durch Einsatz größerer Mengen Fibrinogen kann ein zweites Adhäsins mit niedriger Fibrinogenaffinität die Bindung von Fibrinogen an *S. aureus* Newman erhöhen. Bei *S. aureus* 8325-4 zeigte die Deletionsmutante eine durchgehend niedrigere Fibrinogenbindung als der Wildtyp (Abb. 4-20/B). Auch bei diesem Stamm scheint der „clumping factor“ also ein Adhäsins mit hoher Affinität für Fibrinogen zu sein. McDevitt et al (1994) konnten den „clumping factor“ als Bindungsprotein für Fibrinogen bestätigen, indem sie eine reduzierte Bindung von „clumping factor“-Negativmutanten an mit Fibrinogen beschichtete PMMA-Scheibchen nachweisen konnten.

Boden und Flock (1989) und McDevitt et al (1992) konnten anhand von Westernblots ein fibrinogenbindendes Protein, die Koagulase, auf der Zellwand von *S. aureus* identifizieren. Bei der durchflußzytometrischen Untersuchung der Fibrinogenbindung an *S. aureus* Newman konnte der Wildtyp nicht signifikant mehr Fibrinogen binden als die Koagulase-Deletionsmutante (Abb. 4-21/A). Bei Stamm 8325-4 lag die Fibrinogenbindung der Mutante sogar über der des Wildtyps (Abb. 4-21/B). McDevitt et al (1992) konnten in der Bindung von Mutante und Wildtyp an oberflächengebundenes Fibrinogen ebenfalls keinen Unterschied zeigen. Proteine verlieren durch die Behandlung im Westernblot jedoch ihre räumliche Struktur. Dabei wird es möglich, daß Domänen präsentiert werden, welche im ganzheitlichen Molekül mit räumlicher Struktur für Liganden nicht zugänglich sind. Dies könnte erklären, warum Koagulase im Westernblot als fibrinogenbindendes Protein identifiziert wurde, auf *S. aureus* exprimierte Koagulase jedoch nicht in der Lage ist, Fibrinogen zu binden. Somit kann davon ausgegangen werden, daß Koagulase für die Bindung von Fibrinogen auf *S. aureus* wahrscheinlich nicht von Bedeutung ist.

Daß die vorhandene bzw. fehlende Fibrinogenbindung an „clumping factor“ bzw. Koagulase von *S. aureus* auch von klinischer Relevanz ist, konnten Moreillon et al (1995) und Baddour et al (1994) durch den Nachweis zeigen, daß der „clumping factor“, nicht jedoch die Koagulase die Entstehung einer Endokarditis bei Ratten fördert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß als Adhäsine für die Bindung von gelöstem Fibrinogen auf *S. aureus* Protein A und „clumping factor“, nicht jedoch Koagulase und Map in Frage kommen.

5.3.2 von Willebrand Faktor

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.2 deuten auf eine Beteiligung des vWF an der Interaktion zwischen Bakterien und Thrombozyten hin. Durch Einsatz von FITC-konjugiertem vWF konnte dessen Bindung zunächst, entsprechend der Fibrinogenbindung in Kapitel 5.3.1, separiert auf Thrombozyten und Bakterien in Suspension nachgewiesen werden. Ristocetin-aktivierte Plättchen zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung von vWF (Abb. 4-22). Ristocetin ermöglicht dabei über eine Konformitätsänderung des von Willebrand Faktors die Anbindung von vWF an Plättchen.

Während die Bindung von vWF an Thrombozyten ein gut untersuchter Vorgang ist, ist über die Bindung von vWF an *Staphylococcus aureus* noch sehr wenig bekannt. Herrmann et al (1997) konnten die Bindung von *Staphylococcus aureus* an mit vWF beschichtete PMMA-Scheibchen und die Bindung von löslichem, radioaktiv markiertem vWF an *S. aureus* nachweisen. Durch Markierung des vWF mit dem Fluorochrom FITC ist es in dieser Arbeit gelungen, die Bindung von löslichem vWF an *S. aureus* mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachzuweisen. Diese Methode bietet durch ihre hohe Sensibilität die Möglichkeit, genaue Bindungsstudien durchzuführen. Die Bindung von vWF an *S. aureus* Newman, Cowan1 und 8325-4 war gekennzeichnet durch einen dosisabhängigen Anstieg gebundener vWF-Moleküle (Abb. 4-23). Desweiteren erwies sich die Bindung als spezifisch, da verdrängbar (Abb. 4-24). Von Willebrand Faktor ist ein Protein, welches auf der Oberfläche geschädigter Endothelzellen präsentiert wird und dort bei hohem Scherstreß die Anheftung von Plättchen ermöglicht. Durch den Nachweis, daß *S. aureus* in der Lage ist vWF zu binden, wird die Möglichkeit eröffnet, daß eine Bindung der Bakterien an die subendotheliale Matrix bzw. an Plättchen über den vWF vermittelt wird. Die Wichtigkeit des vWF für die Entstehung einer Endokarditis konnten Johnson und Bowie (1992) nachweisen, indem sie zeigten, daß bei Schweinen mit „severe von Willebrand disease“ keine Streptokokkenendokarditis ausgelöst werden konnte.

Durch Einsatz von Antikörpern, welche die Bindung von vWF an die Thrombozyten bzw. an *S. aureus* hemmen, sollte in dieser Arbeit die Rolle des von Willebrand Faktors als Brückenmolekül untersucht werden. Durch den Einsatz dieser Antikörper konnte keine verminderte Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten erzielt werden (Abb. 4-25/A/B/C). Im Gegenteil, durch Einsatz der Antikörper anti-vWF (Klon AVW1) und anti-GPIIb (Klon SZ2) konnte sogar eine leichte Steigerung der Assoziationsrate erzielt werden, die bei Einsatz von F(ab')₂-Fragmenten des anti-vWF-Antikörpers unterblieb. Bekannt ist, daß einige Antikörper in der Lage sind, über die Interaktion mit dem Fc-Rezeptor der Plättchen diese zu aktivieren (Horewood et al, 1991; Bachelot et al, 1995; Perutelli und Mori, 1993). Wie bereits beschrieben, sind aktivierte Plättchen in der Lage, vermehrt *S. aureus* zu binden. Dies könnte erklären, warum die eingesetzten IgG-Moleküle zu einer Zunahme der Assoziate führten, nicht jedoch die F(ab')₂-Fragmente. Obwohl der Einsatz der Antikörper keinen Einfluß auf die Assoziationsrate zeigte, kann nicht davon ausgegangen werden, daß der vWF für die Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation unbe-

deutend ist. Sowohl *S. aureus* als auch Plättchen sind über Protein A bzw. den Fc-Rezeptor in der Lage, Antikörper über ihren Fc-Teil zu binden. Der an GPIIb sitzende anti-GPIIb-Antikörper könnte also mit seinem freien Fc-Teil über Protein A an *S. aureus* angebunden haben und die durch den Antikörper unterbundene Anheftung von *S. aureus* über den vWF überdecken. Bindet der Antikörper jedoch an das Brückenmolekül, wie im Fall des anti-vWF-Antikörpers, der an den C-Terminus des vWF bindet, kann es ebenfalls zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen. Da der vWF mit seiner A1-Domäne an GPIIb anbindet, kann der Antikörper die Bindung von vWF an die Thrombozyten nicht verhindern. Der nun freie Fc-Teil des Antikörpers könnte wiederum mit Protein A von *S. aureus* interagieren. Dieser Fall sollte durch Einsatz von F(ab')₂-Fragmenten vermieden werden. Mit welcher Domäne der vWF an *S. aureus* bindet ist noch nicht bekannt. Da vWF ein sehr großes, multimeres Protein darstellt, ist es wahrscheinlich, daß die am C-Terminus gebundenen Antikörper nicht verhindern, daß der vWF über andere Domänen an *S. aureus* und Thrombozyten anbindet und so eine Verbindung der beiden Zellen herstellt. Dies könnte auch bei Einsatz von F(ab')₂-Fragmenten der Fall sein.

Über einen Vergleich der vWF-Bindung an unterschiedliche Bakterienstämme konnte gezeigt werden, daß der Protein A negative Stamm Wood 46 wie auch *S. epidermidis* RP62A lediglich eine minimale Anbindung von vWF-Molekülen aufweisen (Abb. 4-23). Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Bindung von vWF an *S. aureus* über eine spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktion geschehen muß, wobei durch die fehlende Bindung des vWF an den Protein A negativen *S. aureus* Wood 46 Protein A als mögliches Bindungsadhäsion für vWF wahrscheinlich wird. *S. epidermidis* RP62A scheint, im Gegensatz zu den *S. aureus*-Stämmen, kein Adhäsion für die Bindung von vWF zu besitzen.

Durch Untersuchungen mit Protein-A-Deletionsmutanten und Einsatz eines anti-Protein-A-Antikörpers konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Durchflußzytometrie Protein A als Bindungsadhäsion für vWF charakterisiert werden. Die Protein-A-Deletionsmutanten der *S. aureus*-Stämme Newman, 8325-4 und Cowan1 zeigten eine deutlich niedrigere Bindung FITC-konjugierter vWF-Moleküle als die Wildstämme. Die komplementierten Stämme hingegen zeigten volle Bindungsfähigkeit (Abb. 4-27/A/B/C). Durch Einsatz eines anti-Protein-A-Antikörpers konnte die Bindung des von Willebrand-Faktors an *S. aureus* Newman, 8325-4 und Cowan1

jeweils stärker verdrängt werden als durch Einsatz eines unspezifisch bindenden Antikörpers (Abb. 4-28). In Zusammenarbeit mit dem Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Münster, konnten weitere Untersuchungen Protein A als Bindungsadhäsion für vWF bestätigen (Veröffentlichung im Druck). Bisher konnten auf *S. aureus* fünf Oberflächenproteine auf molekularer Ebene charakterisiert werden und aufgrund gemeinsamer Charakteristika der MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) Familie zugeordnet werden. Protein A, obwohl die molekularen Charakteristika dieser Familie teilend, wurde aufgrund der Tatsache, daß eine Bindung für Matrixmoleküle bisher nicht nachgewiesen wurde, der MSCRAMM-Familie nicht zugeordnet. Durch den Nachweis der Fibrinogen- und vWF-Bindung an Protein A konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß Protein A in der Lage ist, adhäsive Matrixmoleküle zu erkennen und somit der MSCRAMM-Familie zugeordnet werden sollte.

Durch die Möglichkeit mit der Bindung von Fibrinogen und vWF zur Entstehung endovaskulärer Infektionen beizutragen, ist, neben für Protein A bekannten Virulenzfaktoren wie z.B. Verminderung der Opsonophagozytose von Bakterien durch Bindung des Fc-Teils von Antikörpern, ein weiterer Virulenzfaktor beschrieben worden.

Johnson und Bowie (1992) konnten, wie bereits erwähnt, bei Schweinen mit „severe von Willebrand disease“ keine durch Streptokokken der Gruppe C verursachte Endokarditis auslösen. Sullam und Sande (1992) brachten diesen Effekt mit der bei „von Willebrand Disease“ neben dem Fehlen des vWF verminderten Faktor VIII-Aktivität und der ebenfalls reduzierten Plättchenadhäsion an die subendotheliale Matrix in Verbindung. Da der vWF im Blut stets als Komplex mit Faktor VIII vorliegt, sollte anhand eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 („severe von Willebrand disease“) und eines an Hämophilie A leidenden Patienten in dieser Arbeit näher untersucht werden, inwieweit der vWF für die Plättchen-*S. aureus*-Interaktion eine Rolle spielt, und ob Faktor VIII an dieser Aktion beteiligt ist. Bei dem Patienten P.R. mit „von Willebrand Disease“ Typ3 fehlt der vWF sowohl im Plasma auch in den Thrombozytengranula (Kehrel et al, 1998; Zippel, 1999). Als Folge davon ist bei dieser Erkrankung auch die Konzentration des Gerinnungsfaktors VIII auf 2-10 % des Normalwertes erniedrigt (Ruggeri, 1991). Der Hämophilie-A-Patient besitzt normale Werte des von Willebrand Faktors bei Fehlen des Gerinnungsfaktors VIII.

Die Thrombozyten eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 zeigten in Suspension eine mit der Kontrolle vergleichbare Assoziationsrate von *S. aureus* (Abb. 4-37). Da gelöster vWF lediglich mit Modulatoren wie Ristocetin in die Lage versetzt wird, an Thrombozyten zu binden, läßt sich die vergleichbare Assoziationsrate bei Patient und Kontrolle an mit Thrombin aktivierten Plättchen auf andere Adhäsionsmechanismen wie z.B. über das bei der Aktivierung ausgeschüttete Fibrinogen zurückführen. Untersuchungen an mit Ristocetin aktivierten Thrombozyten dieses Patienten stehen noch aus.

Plättchen des Hämophilie-A-Patienten wiesen im Assoziationsversuch in Suspension ebenfalls eine mit der Kontrolle vergleichbare Assoziationsrate auf (Abb. 4-39). Auch hier zeigte sich an thrombinaktivierten Plättchen ein leichter Anstieg der Assoziate bei Patient und Kontrolle, der bei einer Aktivierung mit Ristocetin jedoch gesteigert werden konnte. Dies läßt darauf schließen, daß die durch Ristocetin ermöglichte Bindung des vWF die Adhäsion von *S. aureus* an aktivierte Thrombozyten noch steigern kann. Dies macht deutlich, daß für die Adhäsion von *S. aureus* an Thrombozyten in Suspension der vWF von Bedeutung ist. Durch Zugabe von Faktor VIII/vWF konnte die Assoziationsrate sowohl bei Patient als auch bei Kontrolle an Thrombin- und Ristocetin-aktivierten Thrombozyten gesteigert werden. Auf die Assoziation an nicht aktivierten Plättchen hatte die Zugabe jedoch keinen Einfluß. Dies läßt vermuten, daß neben dem vWF auch Faktor VIII an der Adhäsion von *S. aureus* an Thrombozyten beteiligt ist.

Untersuchungen an immobilisierten Plättchen des an „von Willebrand Disease“ Typ3 erkrankten Patienten in Gegenwart von Plasmaproteinen gaben weitere Hinweise auf die Notwendigkeit des vWF für die Assoziation (Abb. 4-36). Im Adhäsionsversuch konnte gezeigt werden, daß bei fehlendem vWF und verminderter Faktor VIII *S. aureus* kaum an die Thrombozyten anhaften konnten. Dies deutet auf eine Beteiligung des vWF bei der *S. aureus*-Thrombozyten-Interaktion hin. Möglich wäre jedoch auch, daß die verminderte Assoziation durch den erniedrigten Faktor VIII-Wert dieses Patienten bedingt ist. Dies sollte mit Thrombozyten eines Hämophilie-A-Patienten weiter geklärt werden. Im Adhäsionsassay mit Plättchen dieses Patienten konnte *S. aureus* an immobilisierte Thrombozyten unter Vorhandensein von vWF und fehlendem Faktor VIII nicht binden. Nach Substitution von Faktor VIII konnte jedoch die Bindung signifikant erhöht werden (Abb. 4-38). Dieses Ergebnis spricht für eine Beteiligung des Gerinnungsfaktors VIII an der *S. aureus*-Thrombozyten-Interaktion. Da Faktor VIII auch ohne vWF an

aktivierte Plättchen anbinden kann (Suzuki et al, 1998) wäre eine direkte Funktion von Faktor VIII als Brückenmolekül denkbar. Die Bindung von Faktor VIII an *S. aureus* ist jedoch noch nicht nachgewiesen worden. Möglich wäre auch, daß Faktor VIII durch seine Funktion als Gerinnungsfaktor in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen von Bedeutung ist. Faktor VIII ist Teil des endogenen Gerinnungssystems, nach dessen Aktivierung es schließlich zur Bildung von Thrombin und damit zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin kommt. Dieser Vorgang ist Teil der Bildung einer nichtbakteriellen thrombotischen Vegetation, welche den Bakterien die Anheftung an Gewebe bzw. Fremdoberflächen ermöglicht (siehe Einleitung). Untersuchungen über die Adhärenz von Staphylokokken an Fremdoberflächen konnten zeigen, daß Fibrin als Mediator für die Anheftung der Bakterien an Oberflächen dient (Baumgartner und Cooper, 1996, 1998; Cheung und Fischetti, 1990). Herrmann und seine Mitarbeiter (1993) diskutierten ebenfalls, daß die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und die Bildung von Fibrin eine Rolle bei der Adhäsion von *S. aureus* an immobilisierte Plättchen spielt.

5.4 Bedeutung der Thrombozytenproteine

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Plättchenbestandteile für die Bindung von *S. aureus* an die Plättchen von Bedeutung sind. Experimente mit Plättchen von einer Patientin mit „ α - δ -storage pool disease“ konnten zeigen, daß das Fehlen der „dense-bodies“ und der α -Granula der Plättchen zu einer verminderten *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation an ruhenden Plättchen führt. Im Gegensatz zur Kontrolle konnte die Aktivierung der defizienten Plättchen durch Thrombin keine Steigerung der Assoziationsrate erzielen (Abb. 4-29). Das Vorhandensein dieser beiden Speichergranula scheint demnach Voraussetzung für die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten zu sein. Untersuchungen an Plättchen mit Speicherfunktionsstörung der α -Granula und physiologischen „dense bodies“ zeigten jedoch mit den Plättchen der an „ α - δ -storage pool disease“ erkrankten Patienten vergleichbare Ergebnisse (Abb. 4-30). Diese Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß nicht das Vorhandensein der „dense bodies“, sondern das der α -Granula für die Bindung von *S. aureus* an Plättchen essentiell ist.

Durch weitere Untersuchungen an Plättchen dieser Patienten sollte die Rolle des Thrombospondin-1 (TSP-1) für die *S. aureus*-Thrombozyten-Interaktion geklärt werden. Thrombospondin-1 ist ein in den α -Granula gespeichertes Glykoprotein. Durch Aktivierung der Plättchen wird es ins Plasma ausgeschüttet, wobei es ein Viertel des sezernierten Gesamtproteins ausmacht (Kehrel et al, 1996). Ein Teil davon wird über Rezeptoren an die Plättchenmembran zurückgebunden (Wolff et al, 1986). Die Bindung von TSP-1 an *S. aureus* wurde von Herrmann et al (1991) beschrieben, und heute ist die Existenz TSP-1-bindender Proteine von *S. aureus* bekannt (McGavin et al, 1993; Jönsson et al, 1995). Voraussetzung für die adhäsiven Eigenschaften von TSP-1 ist die Anwesenheit von Kalzium. Thrombospondin besitzt Ca^{2+} -sensitive Strukturen (Lawler et al, 1982). Wird dem Protein das Kalzium entzogen, kommt es zu einer irreversiblen Konformationsänderung (Lawler, 1986; Slane et al, 1988), durch welche die Adhäsion von TSP-1 an Zellen (Lawler et al, 1988), andere Proteine (Lawler, 1986) und an *S. aureus* (Herrmann et al, 1991) vermindert wird. Das bei der Blutentnahme als Antikoagulanzen verwendete Natriumcitrat bindet Ca^{2+} -Ionen, so daß das zu dem Versuchsansatz zugegebene gereinigte TSP-1 in dem kalziumfreien Milieu in die nicht adhäsive Form übergeht. TSP-1 in diesem Konformationszustand konnte in dieser Arbeit als Brückenmolekül zwischen *S. aureus* und Thrombozyten nicht nachgewiesen werden. Dieses TSP-1 konnte keine vermehrte Bindung von *S. aureus* an die α -Granula-defizienten, gefilterten und mit Thrombin aktivierten Plättchen der Patienten induzieren (Abb. 4-40). Die Experimente schließen aber aufgrund der Problematik der verschiedenen wirksamen Konformationszustände des TSP-1 eine Rolle des TSP-1 bei der Brückenbildung nicht aus.

P-Selektin (CD62) ist ein in den α -Granula von Thrombozyten und in Endothelzellen vorkommendes Protein, welches nach Aktivierung der Zellen auf deren Oberfläche exprimiert wird. Dort vermittelt es den Kontakt mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten über deren Sialyl-Lewis-X-Gruppen-tragende Proteine (Hamburger und McEver, 1990; Geng et al, 1990). Da neben der Bindung von Granulozyten und Monozyten auch eine direkte Anbindung von *S. aureus* an CD62 der Plättchen möglich erscheint, sollte durch Einsatz von Sialyl-Lewis-X versucht werden, die Adhäsion von *S. aureus* an Thrombozyten zu hemmen. Bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ Sialyl-Lewis-X konnte keine Verdrängung der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten nachgewiesen werden (Abb. 4-31). Untersuchungen an P-Selektin-knockout-Mäusen konnten ebenfalls keinen Unter-

schied in der Bindung von *S. aureus* an CD62-defiziente Plättchen und Kontrollplättchen zeigen (Abb. 4-32). Eine Bindung von *S. aureus* über P-Selektin an Thrombozyten kann somit ausgeschlossen werden.

Durch Assoziationsexperimente mit CD36-defizienten Thrombozyten des Probanden Y.A. (Kehrel et al, 1993) konnte eine Beteiligung dieses Glykoproteins an der *S. aureus*-Thrombozyten-Interaktion ausgeschlossen werden. CD36-defiziente Plättchen wiesen die gleiche Bindungsfähigkeit für unterschiedliche *S. aureus*-Stämme auf wie Kontrollplättchen (Abb. 4-33). Eine direkte Bindung von *S. aureus*, aber auch die Bindung von *S. aureus* über das an diesen Rezeptor anbindende Kollagen V (Kehrel et al, 1993), findet demnach nicht statt. Neben Kollagen V dient CD36 auch als Rezeptor für Thrombospondin. Da die Bindung von Thrombospondin an CD36-defiziente Plättchen im Gegensatz zu Kollagen V jedoch vergleichbar mit dessen Bindung an Plättchen gesunder Personen ist (Kehrel et al, 1991), ist eine Aussage über die Adhäsion von *S. aureus* an Thrombospondin über diesen Versuchsansatz nicht möglich.

In Kapitel 4.3.3.3 wurde beschrieben, daß durch Inhibierung der Fibrinogenbindung an GPIIb/IIIa eine deutliche Reduktion der Assoziationsrate erreicht werden konnte. Herrmann et al (1993) konnten durch Einsatz monoklonaler anti-GPIIb/IIIa-Antikörper die Adhäsion von *S. aureus* an immobilisierte Thrombozyten verringern. Dies spricht dafür, daß das Vorhandensein dieses Rezeptors auf Plättchen die Bindung von *S. aureus* an die Plättchen beeinflusst. Erstaunlicherweise ergab die Untersuchung der Assoziation zwischen Thrombozyten einer Morbus Glanzmann Patientin A.M. (Fehlen des GPIIb/IIIa-Komplexes) und *S. aureus* Newman bzw. Cowan¹, daß die Assoziationsrate der Patientin im Vergleich zur Kontrolle nicht, bzw. an nicht aktivierten Plättchen nur geringfügig, erniedrigt war (Abb. 4-34/A/B). Somit hatte das Fehlen von GPIIb/IIIa in dieser Arbeit keinen Einfluß auf die Bindung von *S. aureus* an Plättchen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß die fehlende Bindung von *S. aureus* über GPIIb/IIIa bei dieser Patientin durch andere Adhäsionsmechanismen ausgeglichen werden kann. Dies wäre denkbar, wenn neben dem Fehlen des GPIIb/IIIa-Komplexes andere Glykoproteine vermehrt exprimiert würden. Untersuchungen an weiteren Morbus Glanzmann Patienten könnten klären, ob dieses Ergebnis patientenabhängig ist. Da diese Erkrankung sehr selten ist, konnte die Untersuchung nur ein einziges

Mal durchgeführt werden. Um eine genaue Aussage zu treffen, müßte die Untersuchung wiederholt werden.

Anhand von Untersuchungen mit Knockout-Mäusen der Fc γ -Kette konnte die Rolle der Fc γ -Kette für die Bindung von *S. aureus* an Plättchen untersucht werden. Die Fc γ -Kette kommt auf Thrombozyten assoziiert mit dem Glykoprotein VI vor, wo sie für die kollageninduzierte Aktivierung der Plättchen essentiell ist (Tsuji et al, 1997). Weiterhin ist sie Teil der auf Plättchen befindlichen Fc ϵ -Rezeptoren, über welche Thrombozyten durch die Bindung von IgE und darauffolgender Aktivierung an allergischen Reaktionen beteiligt sind (Joseph et al, 1986 und 1997; Hasegawa et al, 1999). Thrombozyten von Knockout-Mäusen der Fc γ -Kette konnten signifikant weniger *S. aureus* Newman und Cowan1 binden als die Plättchen von Kontrollmäusen (Abb. 4-35). Dies weist auf eine Bindung von *S. aureus* an die Fc γ -Kette hin. Inwieweit diese Bindung zu Aktivierung der Plättchen beiträgt, sollte über die Messung des Aktivierungsmarkers CD62 auf Plättchen bestimmt werden. Dabei konnten jedoch sowohl die Kontroll- als die Fc γ -Ketten-defizienten Thrombozyten durch *S. aureus* nicht aktiviert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ob die Bindung von *S. aureus* an die Fc γ -Kette eine Aktivierung der Plättchen bewirkt, bleibt damit weiterhin unklar.

5.5 Aktivierung von Thrombozyten durch *Staphylococcus aureus*

Wie bereits beschrieben, lassen sich Thrombozyten durch unterschiedliche Agonisten aktivieren. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß eine Aktivierung von Thrombozyten auch über den Kontakt mit *S. aureus* möglich ist. So zeigten Thrombozyten nach Zugabe von *S. aureus* eine mit Thrombin aktivierten Plättchen vergleichbare Expression des Aktivierungsmarkers CD62 auf ihrer Oberfläche (Abb. 4-41). Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese endovaskulärer Infektionen. Bakterien, welche im Rahmen der Infektion direkt oder über Plättchen an die subendotheliale Matrix gebunden sind, können nun ihrerseits Plättchen aus dem Plasma „fangen“ und aktivieren. Aktivierte Thrombozyten wiederum können *S. aureus* besser binden als nicht aktivierte Zellen. Die Aktivierung von Thrombozyten durch *S. aureus* führt damit zur Verstärkung des Pathomechanismus endovaskulärer Infektionen. Da Bakterien jedoch nicht nur an adhärenzte, sondern auch an frei im Blut schwimmende Thrombozyten binden (Rusovick und Johnson, 1991), können diese schon vor ihrer Adhäsion aktiviert werden. Dadurch gewinnt

ein von Henn et al, 1998 beschriebener Vorgang an Bedeutung. Durch Aktivierung von Plättchen kommt es zur Expression des auch auf anderen Zellen nachgewiesenen Transmembranproteins CD40L (CD40 Ligand). Über dieses Protein wird es aktivierten Thrombozyten möglich, direkt über den auf Endothelzellen befindlichen Rezeptor CD40 diese zu aktivieren. Dies führt zur Expression von Bindungsproteinen auf der Endothelzelloberfläche und damit zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion- und -aktivierung (siehe Abb. 2-2/B). Dies bedeutet, daß die bereits im Rahmen der Bakteriämie auftretende Thrombozytenaktivierung zur Entwicklung einer lokalen endovaskulären Infektion beitragen kann.

Neben der Verstärkung des Pathomechanismus endovaskulärer Infektionen kann die Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* jedoch auch die Funktion der Thrombozyten als Abwehrzellen verstärken. Thrombozyten können auf sehr vielfältige Weise in die körpereigene Abwehr von Pathogenen eingreifen (Zusammenfassung Yeaman, 1997). Durch die Aktivierung der Plättchen werden eine Reihe von Substanzen wie z. B. der Plättchenfaktor-4 (PF-4) oder der „platelet-derived growth factor“ (PDGF) freigesetzt, welche positiv chemotaktisch auf Abwehrzellen wie Monozyten und Neutrophile wirken und aktivierte Plättchen sind weiterhin in der Lage, diese Zellen zu binden (Deuel et al, 1981; Tzeng et al, 1984; Jungi et al, 1986). Weiterhin ist bekannt, daß Thrombozyten nach Aktivierung mit Thrombin kleine, kationische Proteine, sogenannte „platelet microbicidal proteins“ (PMP`s) sezernieren, welche bakterio-statische und bakterizide Wirkung auf unter anderem *S. aureus* zeigen (Yeaman et al, 1997a). Die Wirkung beruht dabei auf der Zerstörung der zytoplasmatischen Membran der Bakterien, einer verminderten Bakterienadhärenz, sowie einer Verstärkung der Wirkung eingesetzter Antibiotika (Koo, et al, 1997, Yeaman, et al, 1992, 1994). Tierexperimentell zeigten PMP-resistente Bakterienstämme besonders heftige Ausbildung von Endokarditiden mit hoher Dichte der bakteriellen Vegetationen (Dhawan, et al, 1997).

Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten erwies sich als ein personenspezifisches Merkmal (Abb. 4-42), welche über den Fc-Rezeptor der Thrombozyten, FcR11a, vermittelt wird (Abb. 4-43). Der humane FcR11A-Rezeptor wird über ein einzelnes Gen kodiert. Durch eine Punktmutation an Position 131 kommt es zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Histidin, was zum entstehen der drei Genotypen FcR11A-Arg/Arg, FcR11A-His/His und FcR11A-Arg/His führt. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten PCR zeigen, daß Personen, deren Thrombozyten sich durch *S. aureus* aktivieren lassen, hauptsächlich dem His/His-Genotyp zuzuordnen sind, während bei Personen mit nicht aktivierbaren Thrombozyten der

Arg/Arg-Genotyp überwiegt. Diese beiden Genotypen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit IgG-Subklassen zu binden (Warmderdam et al, 1991; Parren et al, 1992). Der His/His-Genotyp weist für humanes IgG2 und IgG3 eine hohe Bindungsfähigkeit auf. Der Arg/Arg-Genotyp hingegen zeigt für die genannten Immunglobuline gegenteilige Affinitäten. Möglich wäre, daß die beiden Genotypen sich auch in ihrer Fähigkeit *S. aureus* über den FcRIIA-Rezeptor zu binden unterscheiden. In diesem Fall würde der FcRIIA-Rezeptor der Individuen mit His/His-Genotyp eine starke Bindungsfähigkeit für *S. aureus* besitzen und eine Aktivierung der Thrombozyten käme durch die direkte Bindung der Bakterien an den FcRIIA-Rezeptor der Thrombozyten zustande. Denkbar wäre jedoch auch, daß der Kontakt des Organismus mit *S. aureus* zur Bildung von Antikörpern führt. *S. aureus* könnte nun über die Bindung dieser Immunglobuline an den FcRIIA-Rezeptor der Plättchen anbinden und diese aktivieren, wobei die Bindung aufgrund der hohen Affinität zu Immunglobulinen bei Personen mit His/His-Genotyp verstärkt auftreten würde. Dies würde voraussetzen, daß die in dieser Arbeit untersuchten Probanden mit Genotyp His/His Antikörper gegen *S. aureus* gebildet haben müssen. Ein vergleichbarer Vorgang ist für die Entstehung der Heparin-induzierten-Thrombozytopenie (HIT) bekannt. Dabei kommt es nach Anwendung von Heparin zur Bildung heparin-induzierter IgG, welche mit Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4) einen Komplex bilden. Über die Bindung dieses Komplexes an den FcRIIA-Rezeptor kommt es zu Aktivierung der Plättchen (Greinacher et al, 1994; Kelton et al, 1994 und Visentin et al, 1994). Patienten, bei denen der Komplex zur Plättchenaktivierung führte, wiesen dabei meistens den Genotyp His/His auf (Burgess et al, 1995; Brandt et al, 1995 und Denomme et al, 1997).

Die Bestimmung des Genotyps von Patienten mit einer *S. aureus*-verursachten Endokarditis sollte zeigen, inwieweit Personen eines bestimmten Genotyps für diese Erkrankung prädisponiert sind. Endokarditispatienten wiesen hauptsächlich den Genotyp Arg/Arg auf und ließen sich dadurch mit der Gruppe von Personen vergleichen, deren Thrombozyten sich nicht durch *S. aureus* aktivieren ließen (Tab. 4-3). Sander et al (1995) und Fijen et al (1993) konnten zeigen, daß Patienten mit dem Genotyp Arg/Arg eine geringere Phagozytosefähigkeit für Bakterien und eine erhöhte Inzidenz für Meningokokkeninfektionen aufwiesen. Dies erklärt sich daraus, daß gegen die Kapselpolysaccharide von Bakterien hauptsächlich IgG2 gebildet wird. Personen des Genotyps Arg/Arg können diese jedoch kaum binden. Beim Genotyp His/His dagegen können die IgG2-tragenden Bakterien

über den FcRIIA-Rezeptor auf Granulozyten gebunden, phagozytiert und damit schnell vom Organismus eliminiert werden.

Untersuchungen über die Normalverteilung der drei Genotypen in der Bevölkerung zeigen, daß 46-56 % der kaukasischen Bevölkerung den heterozygoten Arg/His-Genotyp aufweisen. Wesentlich seltener treten die beiden homozygoten Genotypen auf. So ist der Arg/Arg-Genotyp bei 18-32 % und der His/His-Genotyp bei 19-36 % der Bevölkerung vertreten (Bachelot et al, 1995; Arepally et al, 1997; Brandt et al, 1995; Carlsson et al; 1998; Osborne et al, 1994 und Denomme et al, 1997). In dieser Arbeit zeigten sechs von neun untersuchten Endokarditispatienten den in der Normalbevölkerung relativ selten vorkommenden Genotyp Arg/Arg, zwei Patienten wiesen den Genotyp Arg/His und ein Patient den Genotyp His/His auf. Die Verteilung der Genotypen bei Endokarditispatienten unterscheidet sich somit deutlich von der Verteilung der Genotypen gesunder Personen. *S. aureus* ist ein ubiquitär vorkommender Keim und die Wahrscheinlichkeit einer Infektion ist relativ hoch. Trotzdem ist die Ausbildung einer *S. aureus*-bedingten endovaskulären Infektion relativ selten. Personen, welche den Genotyp Arg/Arg besitzen scheinen für die Ausbildung einer *S. aureus*-Endokarditis prädisponiert zu sein. Dieser Genotyp tritt in der Bevölkerung jedoch relativ selten auf. Inwieweit diese Ergebnisse in Zusammenhang mit der Tatsache stehen könnten, daß die Ausbildung einer *S. aureus*-bedingten endovaskulären Infektion eine für die hohe Infektionsrate relativ selten vorkommende Erkrankung ist, müßte durch weitere Untersuchungen an Endokarditispatienten geklärt werden.

Untersuchungen über die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* an GPIIb/IIIa-defizienten Plättchen zeigten, daß sich GPIIb/IIIa-defiziente Plättchen durch *S. aureus* aktivieren ließen (Abb. 4-45). Eine Beteiligung des Glykoproteins IIb/IIIa an der Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* kann damit ausgeschlossen werden.

Untersuchungen mit Plättchen eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 d. h. mit fehlendem vWF, legten dagegen die Beteiligung des Glykoproteins Ib-IX-V nahe. So konnten die Plättchen des Patienten erst nach Substitution von vWF durch *S. aureus* aktiviert werden (Abb. 4-46). Untersuchungen von Sullam et al (1998) konnten zeigen, daß der Fc-Rezeptor IIA und GPIb-IX-V auf Plättchen sowohl räumlich als auch funktionell in enger Verbindung stehen. So kann der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen GPIb die durch FcRIIA vermittelte Aggregation von Plättchen hemmen und umgekehrt. Möglich wäre damit, daß die Aktivie-

rung der Thrombozyten über den Fc-Rezeptor nur bei gleichzeitiger Aktivierung des GPIIb durch Bindung des vWF möglich wird. Genauere Untersuchungen hierzu stehen jedoch noch aus.

6 Zusammenfassung

In der Pathogenese endovaskulärer Infektionen wie z. B. der Endokarditis, spielt die Assoziation von Bakterien und Thrombozyten eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Aufklärung des Adhäsionsmechanismus von *Staphylococcus aureus* an Thrombozyten durchgeführt. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei sowohl auf die Identifizierung der für die Interaktion relevanten Rezeptoren auf thrombozytärer und bakterieller Seite, als auch auf die Untersuchung von Plasmaproteinen als Brückenmoleküle gelegt.

Für die durchflußzytometrische Untersuchung der *S. aureus* - Thrombozyten - Assoziation konnte eine Methode erarbeitet werden, bei der die Markierung der Zellen es ermöglichte, Thrombozyten- und Bakterienpopulation in einem Durchflußzytometer mit nur einem Anregungslaser getrennt voneinander darstellen zu können und die Assoziate quantitativ zu erfassen.

Untersuchungen zur *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation lieferten Hinweise, daß die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten in Form einer spezifischen Rezeptor-Liganden-Bindung verläuft, an der mehrere Rezeptoren bzw. Adhäsine beteiligt sind. Dabei ist der Aktivierungszustand der Plättchen und die damit einhergehenden Veränderungen der Plättchen von entscheidender Bedeutung. So zeigten nicht aktivierte Plättchen eine deutlich geringere *S. aureus*-Bindung als mit Thrombin aktivierte Zellen.

Assoziationsversuche in plasmafreiem und plasmahaltigem Milieu ergaben, daß die Anwesenheit von Plasmabestandteilen die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten deutlich erhöhte. Dabei konnte die Zugabe von Fibrinogen oder des von Willebrand Faktors/Faktor VIII in Abwesenheit anderer Plasmabestandteile die Assoziationsrate signifikant steigern.

Mittels Fluorochrom-markierten Fibrinogens konnte eine spezifische Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten und Bakterien gezeigt werden.

Inhibierungsversuche mit Peptiden, welche die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten bzw. an *S. aureus* hemmen, konnten eine deutliche Reduzierung der Assoziationsrate zeigen. Hiermit ließ sich nachweisen, daß Fibrinogen als

Brückenmolekül für die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten dient, wobei sowohl die Bindung von Fibrinogen über die RGDS-Sequenz, als auch die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten und *S. aureus* über die Dodekapeptidsequenz von Bedeutung ist.

Anhand durchflußzytometrischer Untersuchungen mit Protein A-, „clumping factor“-, Koagulase-, und MAP-Deletionsmutanten konnten Protein A und der „clumping factor“, nicht jedoch Koagulase und MAP als Adhäsine für die Bindung von Fibrinogen in Suspension auf *S. aureus* nachgewiesen werden. Blockierungsexperimente mit einem inhibierenden Antikörper gegen Protein A konnten Protein A als fibrinogenbindendes Adhäsins auf *S. aureus* bestätigen.

Die Reinigung und FITC-Markierung des von Willebrand Faktors (vWF) ermöglichte den Nachweis der spezifischen Bindung dieses Proteins an Thrombozyten und Bakterien im Durchflußzytometer.

Mit Antikörpern und deren F(ab')₂-Fragmenten, welche die Bindung des von Willebrand Faktors an die Thrombozyten bzw. an *S. aureus* hemmen, konnte keine Inhibierung der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten erreicht werden. Untersuchungen eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 und eines an Hämophilie A erkrankten Patienten gaben jedoch Hinweise auf eine Beteiligung sowohl des von Willebrand Faktors als auch des Gerinnungsfaktors VIII an der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation.

Bindungsstudien an Protein A-Deletionsmutanten und Blockierungsexperimente mit einem anti-Protein-A-Antikörper im Durchflußzytometer konnten Protein A als Adhäsins für die Bindung des von Willebrand Faktors auf *S. aureus* identifizieren.

Mittels durchflußzytometrischer Untersuchungen an Patienten mit Speicherfunktionsstörungen der Granula („ α -, δ -storage pool disease und „Gray-platelet-syndrom“) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Proteine der α -Granula die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten vermitteln. Beide Patienten zeigten eine deutlich verminderte Assoziationsrate, welche sich auch durch Aktivierung der Plättchen nicht erhöhen ließ.

Der Zusatz von gereinigtem Thrombospondin-1 (TSP-1) zu den Assoziationsversuchen mit Plättchen dieser Patienten brachte keine Steigerung der Assoziationsrate zwischen *S. aureus* und Plättchen. Dieses, im kalziumfreien Milieu in die nicht adhäsive Form übergegangene TSP-1, konnte als Brückenmolekül für die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten nicht nachgewiesen werden. Da die adhäsive

Eigenschaft von TSP-1 von dessen Konformitätszustand abhängt, konnte anhand der Experimente eine Rolle des TSP-1 als Brückenmolekül jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Inhibierungsversuche mit Sialyl-Lewis-X, welches die Bindung von CD62 (P-Selektin) auf Plättchen an PSGL-1 hemmt, konnten keine Verminderung der Assoziationsrate zeigen. Assoziationsversuche an P-Selektin-knockout-Mäusen zeigten keinen Unterschied in der Bindung von *S. aureus* an CD62-defiziente Plättchen und Kontrollplättchen. Eine Bindung von *S. aureus* über P-Selektin an Thrombozyten konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Glykoproteine CD36 und GPIIb/IIIa wurde mit Plättchen von Patienten durchgeführt, denen diese Glykoproteine fehlen. In beiden Fällen zeigten die defizienten Plättchen eine mit Kontrollplättchen vergleichbare Assoziationsrate. Dies deutet darauf hin, daß CD36 und GPIIb/IIIa für die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation nicht, oder nur von geringer Bedeutung sind.

Mittels Untersuchungen an Plättchen von Knockout-Mäusen der Fc γ -Kette, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Fc γ -Kette an der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten beteiligt ist. Die Plättchen der Knockout-Mäuse banden signifikant weniger *S. aureus* als Plättchen der Kontrolltiere.

In einem weiteren Teil der Arbeit konnte über den Aktivierungsmarker CD62 die Aktivierung von Thrombozyten durch *S. aureus* nachgewiesen werden. Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten erwies sich als personenspezifisch. Blockierungsexperimente mit einem den FcRIIA-Rezeptor auf Plättchen inhibierenden Antikörper zeigten, daß die Plättchenaktivierung über diesen Rezeptor vermittelt wird. Mittels PCR konnte der Genotyp des FcRIIA-Rezeptors der untersuchten Personen bestimmt werden und gezeigt werden, daß die Aktivierbarkeit der Thrombozyten in Zusammenhang mit dem für diesen Rezeptor bekannten Polymorphismus steht. So wiesen Personen mit durch *S. aureus* aktivierbaren Thrombozyten hauptsächlich den Genotyp FcRIIA-His/His131, Personen mit nicht aktivierbaren Plättchen den Genotyp FcRIIA-Arg/Arg131 und Personen, mit nicht eindeutig aktivierbaren Plättchen den Genotyp FcRIIA-Arg/His131 auf.

Weiterhin wurde der Genotyp des FcRIIA-Rezeptors von Patienten bestimmt, welche an einer *S. aureus*-Endokarditis erkrankt waren. Im Vergleich zu gesunden Personen, zeigten diese Patienten deutlich vermehrt den Genotyp FcRIIA-Arg/Arg und waren damit mit der Gruppe der Personen vergleichbar, deren Thrombozyten sich nicht durch *S. aureus* aktivieren ließen. Dies könnte Anlaß zu der Vermutung

geben, daß Personen dieses Genotyps eine Prädisposition für *S. aureus*-induzierte endovaskuläre Erkrankungen besitzen.

Untersuchungen über die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* an GPIIb/III-defizienten Plättchen konnten eine Beteiligung des Glykoproteins IIb/IIIa ausschließen.

Plättchen eines Patienten mit „von Willebrand Disease“ Typ3 ließen sich nach Substitution mit vWF/FaktorVIII aktivieren. Dies legt neben der Rolle des FcRIIa-Rezeptors die Beteiligung des vWF bzw. Faktor VIII nahe.

7 Summary

The association of bacteria and platelets plays a pivotal role in the pathogenesis of vascular inflammatory diseases, particularly in endocarditis. The purpose of this study was to clarify the mechanism by which *S. aureus* adhere to platelets. Of special interest were the identification of the receptors from both, the thrombocytic and the bacterial side, which are relevant for the interaction, and the examination of plasma proteins, which may play a role as bridging molecules.

Therefore, a method was developed to examine the association between *S. aureus* and platelets by flow cytometry. Labelling of both cells with different fluorochromes allowed it to show platelet and *S. aureus* populations as well as platelet-*S. aureus*-associates separately, using a flow-cytometer equipped with only one laser. It was possible to determine the associates quantitatively.

Investigations of the *S. aureus*-platelet-association process provided indication that the attachment of *S. aureus* to platelets takes place in the form of a specific receptor-ligand binding in which several receptors and/or adhesins are involved. At the same time, the activated state of the platelets and the simultaneous changes that take place therein are of decisive importance. Thus, non-activated platelets displayed *S. aureus*-attachment to a markedly lesser degree than cells which were activated with thrombin.

Association experiments in plasma-free and plasmatic milieu showed that the presence of plasma components markedly enhanced the attachment of *S. aureus* to platelets. By adding fibrinogen or von Willebrand factor/factor VIII to the buffer, the rate of association rose significantly in the absence of other plasma proteins.

Fibrinogen and von Willebrand factor were identified as bridging plasma molecules.

Using fluorochrome-labelled fibrinogen it was possible to demonstrate a specific binding of fibrinogen to platelets as well as to bacteria.

Inhibiting experiments using peptides, which inhibit the binding of fibrinogen to platelets and/or to *S. aureus*, showed a definite reduction in the rate of association. It was shown that fibrinogen serves as a bridging molecule for binding

of *S. aureus* to platelets. In that process, both, the binding of fibrinogen via the RGDS-sequence and the binding of fibrinogen to platelets and *S. aureus* via the dodecapeptide-sequence, are of importance.

Using protein A-, clumping factor-, coagulase- and MAP-deficient mutants, it was proved that protein A and the clumping factor act as adhesins in the binding of fibrinogen in suspension to *S. aureus*, whereas coagulase and MAP did not. Blocking experiments using an inhibiting antibody against protein A, confirmed protein A as a fibrinogen-binding adhesin on *S. aureus*.

By purifying and FITC-labelling of von Willebrand factor it was possible to demonstrate the specific binding of this protein to platelets and to bacteria in the flow-cytometer.

However, it was not possible to achieve an inhibition of the binding of *S. aureus* to platelets by using antibodies or their F(ab')₂-fragments, which inhibit the binding of von Willebrand factor to platelets and/or *S. aureus*. The investigation of a patient with von Willebrand disease type 3 and a patient suffering from severe hemophilia A gave indication of the participation of both, von Willebrand factor and blood coagulation factor VIII in the *S. aureus*-platelet-association.

Protein A was identified as von Willebrand factor binding adhesin on *S. aureus*; this was accomplished by studying the binding behaviour of protein A deletion mutants and by means of blocking experiments in a flow-cytometer using an anti-protein A antibody.

Using platelets of patients with α - δ -storage pool disease and Gray-platelet syndrome it was demonstrated that α -granule proteins mediate the binding of *S. aureus* to platelets. The platelets of both patients showed a significantly reduced rate of association in comparison to control platelets. In contrast to controls' platelets, activation of the patients' platelets did not significantly promote the adhesion of *S. aureus*.

Addition of purified thrombospondin-1 (TSP-1) to platelets of those patients did not increase the rate of association between platelets and *S. aureus*. The adhesive function of TSP-1 depends strongly of its conformation. Therefore it cannot completely ruled out by the experiments that TSP-1 acts as a bridging molecule.

Inhibition experiments with Sialyl-Lewis-X, which inhibits the binding of the glycoprotein CD62 (P-selectin) on platelets to its ligand PSGL-1, did not result in a decrease in the association rate. Association experiments with P-selectin-knockout

mice did not show a difference in the adhesion of *S. aureus* to CD62-deficient platelets and control platelets. Thus, P-selectin seems not to play a role in platelet-*S. aureus* interaction.

The investigation of the role of the glycoproteins CD36 and GPIIb/IIIa in platelet-*S. aureus*-association was carried out with platelets from patients lacking these glycoproteins. In both cases the deficient platelets showed a rate of association comparable to that of the control platelets. This indicates that CD36 and GPIIb/IIIa are of no, or only minor, importance in the *S. aureus*-platelet association.

In contrast it was possible to show that the Fc γ -chain participates in the binding of *S. aureus* to platelets. This was done by examining the platelets of Fc γ -chain knockout mice. The platelets of the knockout mice bound significantly less *S. aureus* than did those of the control mice.

The activation of platelets by *S. aureus* using the activating marker CD62 was demonstrated in another part of this thesis. The activating capacity of the platelets was shown to be person-specific. Blocking experiments with an antibody, that inhibited the FcRIIa-receptor on platelets, demonstrated that the activation of platelets by *S. aureus* is mediated by this particular receptor.

The genotype of the FcRIIa-receptor from persons examined above, was carried out by PCR. It was shown that the platelets' activating capability is connected to a polymorphism known in this receptor. Thus, individuals with platelets activatable by *S. aureus* were mainly of genotype FcRIIa-His/His131, persons with non-activatable platelets belonged prevalingly to genotype FcRIIa-Arg/Arg131, whereas persons with platelets not clearly belonging to those groups were predominantly of genotype FcRIIa-Arg/His131.

Patients suffering from endocarditis caused by *S. aureus* were classified in respect to the genotype of the FcRIIa-receptor. Nearly all of these patients possessed genotype FcRII-Arg/Arg131. They were thus comparable to that group of patients whose platelets could not be activated by *S. aureus*. The FcRIIa-Arg/Arg131 is rare in healthy populations. This could lead to the assumption that individuals of this genotype might be predisposed to suffer from endovascular diseases induced by *S. aureus*.

Investigations on the platelets' ability to be activated by *S. aureus* in GPIIb/IIIa-deficient platelets excluded the participation of glycoprotein IIb/IIIa. However, platelets from the patient with von Willebrand disease type 3 could be activated after substitution with von Willebrand factor/factor VIII. This suggests the

participation of von Willebrand factor and/or factor VIII in addition to the role of the FcR11a-receptor in platelet activation by *S. aureus*.

8 Ausblick

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und Ergebnisse zur Interaktion von Staphylokokken mit Thrombozyten ergeben sich weitere Fragestellungen.

Da in dieser Arbeit lediglich die Deletionsmutanten der *S. aureus*-Adhäsine Protein A, „clumping factor“, Koagulase und MAP für die Untersuchung der Fibrinogenbindung in Suspension zur Verfügung standen, wäre die durchflußzytometrische Untersuchung weiterer fibrinogenbindender Adhäsine wie Fib und fbpA mit Deletionsmutanten und deren komplementierten Mutanten von Interesse. Untersuchungen an komplementierten Stämmen der Deletionsmutanten für „clumping factor“ und Koagulase könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen.

Zur weiteren Klärung, inwieweit der von Willebrand Faktor (vWF) als Brückenmolekül für die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten dient, wäre die Durchführung von Inhibierungsversuchen mit Inhibitoren, welche die Bindung des vWF an Plättchen hemmen interessant. Dazu könnte das Schlangengift Echicetin oder ein rekombinantes vWF-Fragment, rvWF445-733, welche die Bindung des von Willebrand Faktors an das Plättchenglykoprotein Ib hemmen verwendet werden.

Protein A konnte als Adhäsine für die Bindung des von Willebrand Faktors identifiziert werden. Durchflußzytometrische Untersuchungen mit Fluoreszenz-markierten rekombinanten vWF-Proteinen, welchen jeweils die A1, A2 oder A3 Domäne fehlt, könnten klären, über welche Bereiche der vWF an Protein A bindet.

Im Hinblick auf die Bedeutung des von Willebrand Faktors und des Gerinnungsfaktors VIII für die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation wären nachfolgende Untersuchungen mit Einsatz von rekombinanten von Willebrand Faktor und rekombinanten Faktor VIII in Assoziationsexperimenten mit gelfiltrierten Plättchen und in Versuchen mit Hämophilie A-Patienten und mit an „von Willebrand Disease“ Typ3 erkrankten Patienten nötig.

In dieser Arbeit konnten durch Versuche mit an „Gray-platelet-syndrome“ und „ α - δ -storage pool disease“ leidenden Patienten gezeigt werden, daß Proteine der α -Granula die Bindung von *S. aureus* an Plättchen vermitteln. Untersuchungen mit Plättchen von Patienten, denen lediglich die „dense bodies“ fehlen („ δ -storage-pool-disease“) könnten dieses Ergebnis bestätigen.

Für die Untersuchung, inwieweit die adhäsive Form von Thrombospondin-1 als Brückenmolekül bei der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation von Bedeutung ist, wäre es notwendig, Untersuchungen in kalziumhaltigen Milieu durchzuführen. Neben der Zugabe von gereinigtem Thrombospondin-1 zu α -Granula defizienten Plättchen wären Assoziationsversuche mit Thrombospondin-1-knockout-Mäusen interessant.

Im Hinblick auf die Bedeutung des GPIb-IX-V-Komplexes der Plättchen für die Aktivierung von Thrombozyten durch *S. aureus* wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Blockierung der von Willebrand Faktor-Bindung an GPIb z. B. durch Echinocetin oder dem rekombinanten vWF-Fragment rvWF445-733 zu einer Hemmung der Aktivierung führen würde.

Die Rolle des Plättchenglykoproteins IIb/IIIa bei der *S. aureus*-Thrombozyten Assoziation konnte nicht eindeutig geklärt werden. Hierzu wären Wiederholungsuntersuchungen an Thrombozyten von Morbus Glanzmann-Patienten nötig. Der Einsatz von F(ab')₂-Fragmenten von Antikörpern, welche gegen GPIIb/IIIa gerichtet sind, z. B. Klon 7E3 (IgG₁), könnte weitere Klärung bringen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der Thrombozyten durch *S. aureus* ein personenspezifisches Merkmal ist, wobei der Genotyp des FcRIIA-Rezeptors für die Aktivierbarkeit eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Patienten, welche an einer durch *S. aureus* ausgelösten Endokarditis erkrankt waren, ließen sich ebenfalls hauptsächlich einem bestimmten Genotyp zuordnen. Dies legt die Frage nahe, ob Personen eines bestimmten Genotyps für *S. aureus*-induzierte endovaskuläre Erkrankungen prädisponiert sind. Hierzu müßte der Genotyp weiterer an diesen Erkrankungen leidenden Patienten bestimmt werden.

9 Literaturverzeichnis

- Arepally, G., McKenzie, S. E., Jiang, X.-M., Poncz, M., Cines, D. B.** 1997. Fc γ RIIa H/R¹³¹ polymorphism, subclass-specific IgG anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Blood*, **89 (2)**: 370-375.
- Asch, A. S., Barnwell, J., Silverstein, R. L. und Nachman, R. L.** 1987. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J. Clin. Invest.*, **79**: 1054-1061.
- Bachelot, C., Saffroy, R., Gandrille, S., Aiach, M. und Rendu, F.** 1995. Role of Fc gamma RIIa gene polymorphism in human platelet activation by monoclonal antibodies. *Thromb Haemost*, **74 (6)**: 1557-63.
- Baddour, L. M., Tayidi, M. M., Walker, E., McDevitt, D. und Foster, T. J.** 1994. Virulence of coagulase-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *J. Med. Microbiol.*, **41**: 259-263.
- Bale, M. D., Westrick, L. G. und Mosher, D. F.** 1985. Incorporation of thrombospondin into fibrin clots. *J. Bio. Chem.*, **260 (12)**: 7502-7506.
- Bancsi, M. J., Veltrop, M. H., Bertina, R. M. und Thompson, J.** 1996. Influence of monocytes and antibiotic treatment on tissue factor activity of endocardial vegetations in rabbits infected with *Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity*, **64**: 448-451.
- Baumgartner, J. N., Cooper, S. L.** 1996. Bacterial adhesion on polyurethane surfaces conditioned with thrombus components. *ASAIO J.*, **42 (5)**: 476-479.
- Baumgartner, J. N., Cooper, S. L.** 1998. Influence of thrombus components in mediating *Staphylococcus aureus* adhesion to polyurethane surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, **40 (4)**: 660-670.
- Bayer, A. S., Sullam, P. M., Ramos, M., Li, C., Cheung, A. L. und Yeaman, M. R.** 1995. *Staphylococcus aureus* induces platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains. *Infection and Immunity*, **63 (9)**: 3634-3641.

- Beekhuizen, H., Gevel van de, J., Olsson, B., Bente van, I. und Furth, v., R.** 1997. Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. *J. Immunol.*, **158**: 774-782.
- Blombäck, B.** 1996. Fibrinogen and fibrin - proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*, **83 (1)**: 1-75.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.
- Boden, M. K. und Flock, J.-I.** 1989. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **57**: 2358-2363.
- Boden, M. K. und Flock, J.-I.** 1994. Cloning and characterization of a gene for a 19kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, **12 (4)**: 599-606.
- Brandt, J. T., Craig, E. I., Osborne, J. M., Ahmed, A. und Anderson, C. L.** 1995. On the role of platelet FcγRIIA phenotype in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.*, **74**: 1564-72.
- Burgess, J. K., Lindeman, R., Chesterman, C. N. und Chong, B. H.** 1995. Single amino acid mutation of Fcγ receptor is associated with the development of heparin-induced thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, **91**: 761-766.
- Carlsson, L. E., Santoso, S., Baurichter, G., Kroll, H., Papenberg, S., Eichler, P., Westerdaal, N. A. C., Kiefel, V., van de Winkel, J. G. J. und Greinacher, A.** 1998. Heparin-Induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the FcγRIIa-R-H131 polymorphism. *Blood*, **92 (5)**: 1526-1531.
- Cheung, A. L. und Fischetti, V. A.** 1990. The role of fibrinogen in staphylococcal adherence on inserted catheters in vitro. *J. Infect. Dis.*, **161**: 1177-1186.
- Cheung, A. L., Krishnan, M., Jaffe, E. A. und Fischetti, V. A.** 1991. Fibrinogen acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **87**: 2236-2245.

- Cheung, A. L., Koomey, J. M., Butler, C. A., Steven, J. P. und Fischetti, V. A.** 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **89**: 6462-6466.
- Cheung, A. I., Projan, S. J., Edelstein, R. E. und Fischetti, V. A.** 1995. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. Infection and Immunity, **63 (5)**: 1914-1920.
- Chien, Y. T. und Cheung, A. L.** 1998. Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., **273**: 2645-2652.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. und Beachey, E. H.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol., **22 (6)**: 996-1006.
- Coleman, G., Jakeman, C., Martin, N.** 1978. Patterns of extracellular protein secretion by a number of clinically isolated strains of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., **107**: 189-192.
- Coligan, J. E. und Slayter, H. S.** 1984. Structure of thrombospondin. J. Biol. Chem., **259**: 3944-3948.
- Cooper, T. W.** 1981. Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Denomme, G. A., Warkentin, T. E., Horsewood, P., Sheppard, J.-A. I., Warner, M. N. und Kelton, J. G.** 1997. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the FcγRIIa "low responder" (*his*₁₃₁) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. J. Lab. Clin. Med, **130**: 278-84.
- Deuel, T. F., Senior, R. M., Chang, D., Griffin, G. L., Henrikson, R. L., Kaiser, E. T.** 1981. Platelet factor-4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**: 4584-4587.

- Dhawan, V. K., Yeaman, M. R., Cheung, A. L., Kim, E., Sullam, P. M. und Bayer, A. S.** 1997. Phenotypic resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in vitro is correlated with enhanced virulence in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **65 (8)**: 3293-3299.
- DiFazio, L. T., Stratoulis, M. D., Greco, R. S. und B., H.** 1994. Multiple platelet surface receptors mediate platelet adhesion to surfaces coated with plasma proteins. *Journal of Surgical Research*, **57**: 133-137.
- Dodds, W. J.** 1978. Platelet function in animals: Species specificities. In: Galtano, G.: *Platelets: a multidisciplinary approach*. Raven Press, New York **45**, 45-59.
- Dodds, W. J. und Kaneko, J. J.** 1989. Hemostasis and blood coagulation. In: Kaneko, J. J. und Cornelius, C. E.: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Acad. Press, San Diego **2**, 179-204.
- Doolittle, R. F.** 1984. Fibrinogen and fibrin. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 195-229.
- Fijen, C. A. P., Bredius, R. G. M. und Kuijper, E. J.** 1993. Polymorphism of IgG Fc receptors in meningococcal disease: risk marker in complement deficient patients. *Ann. Intern. Med.*, **119**: 707.
- Flock, J.-I., Fröman, G., Jönsson, K., Guss, B., Signäs, C., Nilsson, B., Raucci, G., Höök, M., Wadström, T. und Lindberg, M.** 1987. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.*, **6**: 2351-2357.
- Ford, I. und Douglas, I. C. W.** 1997. The role of platelets in infective endocarditis. *Platelets*, **8**: 285-294.
- Fosgren, A., Ghetite, V., Lindmark, R. und Sjöquist, J.** 1983. Protein A and its exploitation. In: F., E. C. S. und C., A.: *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Acad. Press, London , 429-480.
- Foster, J. und Höök, M.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, **6 (12)**: 484-488.

- Foster, T. J., O'Reilly, M., Phonimdaeng, P., Patel, A. H. und Bramley, A. J.** 1990. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. Properties of coagulase and γ -toxin and the role of α -toxin, β -toxin and protein A in the pathogenesis of *S. aureus* infections. In: Novick, R. P.: Molecular Biology of the Staphylococci. VCH, New York, 403-417.
- Froman, G., Switalski, L. M., Speziale, P. und Höök, M.** 1987. Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., **262**: 6564-6571.
- Gartner, T. K. und Bennett, J. S.** 1985. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. J. Biol. Chem., **260**: 11891-11894.
- Gemmell, C. G., Tree, R., Patel, A., O'Reilly, M. und Foster, T. J.** 1990. Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A, α -haemolysin and β -toxin deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele-replacement. Zbl. Bakt., **Suppl. 21**: 232-236.
- Geng, J. G., Bevilacqua, M. P., Moore, K. L., McIntyre, T. m., Prescott, S. M., Kim, J. M., Bliss, G. A., Zimmermann, G. A. und McEver, R. P.** 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. Nature, **343**: 757-760.
- Goto, S., Salomon, D. R., Ikeda, Y. und Ruggeri, Z. M.** 1995. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. J. Biol. Chem., **270 (40)**: 23352-23361.
- Greaves, M., Hampton, K. K., Douglas, C. W. I., Brown, P. R. und Preston, F. E.** 1993. Platelet aggregation by streptococci and poor clinical outcome in subacute bacterial endocarditis. Thromb. Haemostas., **69**: 626.
- Greinacher, A., Pötzsch, B., Admiral, J., Dummel, V., Eichner, A. und Mueller-Eckhardt, C.** 1994. Heparin-associated thrombocytopenia: Isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-Heparin complex as the major antigen. Thrombosis and Haemostasis, **71 (2)**: 247-251.
- Guss, B., Uhlen, M., Nilsson, B., Lindberg, M., Sjöquist, J. und Sjö Dahl, J.** 1984. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. Eur. J. Biochem., **138**: 413-420.

- Hamburger, S. A. und McEver, R. P.** 1990. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*, **75**: 550-554.
- Hamill, R. J., Vann, J. M. und Proctor, R. A.** 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infection and Immunity*, **54**: 833-836.
- Hantgan, R. R., Francis, C. W. und Marder, V. J.** 1994. Fibrinogen structure and physiology. In: Colman, R. W.; Hirsh, J.; Marder, V. J. und Salzman, E. W.: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, Philadelphia, 277-312.
- Hartleib, J., Köhler, N., Dickinson, R. B., Chhatwal, G. S., Sixma, J. J., Hartford, O. M., Foster, T. J., Peters, G., Kehrel, B. E., Herrmann, M.** Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. in press
- Hasegawa, S., Pawankar, R., Suzuki, K., Nakahata, T., Furukawa, S., Okumura, K., Ra, C.** 1999. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) in human platelets and its intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood*, **93 (8)**: 2543-2551.
- Haverstick, D. M., Cowan, J. F., Yamada, K. M. und Santoro, S. A.** 1985. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood*, **66**: 946-952.
- Hawiger, J., Timmons, S., Strong, D. D., Cottrell, B. A., Riley, M. und Doolittle, R. F.** 1982. Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor. *Biochemistry*, **21**: 1407-1413.
- Hemker, H. C., Bas, B. M. und Muller, A. D.** 1975. Activation of a pro-enzyme by a stoichiometric reaction with another protein. The reaction between prothrombin and staphylocoagulase. *Biochim. Biophys. Acta*, **379**: 180-188.
- Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller, B. G. und Kroczeck, R. A.** 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, **391**: 591-594.

- Herrmann, M., Suchard, S. J., Boxer, L. A., Waldvogel, F. A. und Lew, D. P.** 1991. Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infection and Immunity*, **59 (1)**: 279-288.
- Herrmann, M., Lai, Q. J., Albrecht, R. M., Mosher, D. F. und Proctor, R. A.** 1993. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. *J. Infect. Dis.*, **167**: 312-322.
- Herrmann, M., Hartleib, J., Kehrel, B., Montgomery, R. R., Sixma, J. J. und Peters, G.** 1997. Interaction of von Willebrand factor with *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, **176**: 984-991.
- Herzberg, M. c., MacFarlane, G. D., Gong, K. E., Armstrong, N. N., Witt, A. R. und Erickson, P. R.** 1992. The platelet interactivity phenotype of *Streptococcus sanguis* influences the course of experimental endocarditis. *Infection and Immunity*, **60**: 4809-4818.
- Hettasch, J. M., Bolyard, M. G. und Lord, S. T.** 1992. The residues AGDV of recombinant gamma chains of human fibrinogen must be carboxy-terminal to support human platelet aggregation. *Thromb. Haemost.*, **68 (6)**: 701-706.
- Hienz, S. A., Schennings, T., Heindahl, A. und Flock, J. I.** 1996. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.*, **174 (1)**: 83-88.
- Horsewood, P., Hayward, C. P. M., Warkentin, T. E. und Kelton, J. G.** 1991. Investigation of the mechanisms of monoclonal antibody-induced platelet activation. *Blood*, **78 (4)**: 1019-1026.
- Hussain, M., Herrmann, M., Heilmann, C., von Eiff, C. und Peters, G.** 1998. Eine *Staphylococcus aureus* Newman Mutante defizient im "major histocompatibility class II"-analogen Protein (Map) zeigt reduzierte Bindung an polystyrolimmobilisiertes Fibronectin, Fibrinogen und Typ-I-Kollagen. Abstract. 50. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Berlin.
- Hynes, R. O.** 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**: 11-25.

- Ing, M. B., Baddour, L. m. und Bayer, A. S.** 1997. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. In: Crossley, K. B. und Archer, G. L.: *The Staphylococci in Human Disease*, Churchill Livingstone, New York , 331-339.
- Iordanescu, S. und Surdeanu, M.** 1976. Two restriction and modification systems in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *J. Gen. Microbiol.*, **96 (2)**: 277-281.
- Jaffe, E. A., Hoyer, L. W. und Nachman, R. L.** 1974. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 1906-1909.
- Jaffe, E. A., Ruggiero, J. T., Leung, L. L. K., Doyle, M. J., McKeown-Longo, P. J. und Mosher, D. F.** 1983. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 998-1002.
- Jaffe, E. A., Ruggiero, J. T. und Falcone, D. J.** 1985. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood*, **65**: 79-84.
- Johnson, C. M. und Bowie, W. E. J.** 1992. Pigs with von Willebrand Disease may be resistant ot experimental infective endocarditis. *J. Lab. Clin. Med.*, **120**: 553-558.
- Jonsson, P., Lindberg, M., Haraldsson, I. und Wadstrom, T.** 1985. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect. Immun.*,: 765-769.
- Joseph, M., Capron, A., Ameisen, J. C., Capron, M., Vorng, H., Pancre, V., Kusnierz, J. P. und Auriault, C.** 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.*, **16 (3)**: 603-612.
- Joseph, M., Gounni, A. S., Kusnierz, J. P., Vorng, H., Sarfati, M., Kinet, J. P., Tonnel, A. B., Capron, A. und Capron, M.** 1997. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur. J. Immunol.*, **27 (9)**: 2212-8.

- Jönsson, K., Signäs, C., Müller, H.-P. und Lindberg, M.** 1991. Two different genes encode fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* and its use in the synthesis of biologically active peptides. *Eur. J. Biochem.*, **202**: 1041-1048.
- Jönsson, K., McDevitt, d., McGavin, M. H., Patti, J. M. und Höök, M.** 1995. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J. Biol. Chem.*, **270**: 21457-21460.
- Jungi, T. W., Spycher, M. O., Nydegger, U. E., Barandun, S.** 1986. Platelet-leucocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphnuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood*, **67**: 629-636.
- Karchmer, A. W.** 1997. Infective endocarditis. In: Braunwald, E.: Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1077-1104.
- Karczewski, J., Knudsen, K. A., Smith, L., Murphy, A., Rothman, V. L. und Tuszynski, G. P.** 1989. The interaction of thrombospondin with platelet glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.*, **264**: 21322-21326.
- Kaufman, R. J. und Pipe, S. W.** 1999. Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, **82 (2)**: 201-208.
- Kawabata, S., Morita, T., Iwanaga, S. und Igarashi, H.** 1985. Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *J. Biochem.*, **98**: 1603-1614.
- Kehrel, B., Kronenberg, A., Schwippert, B., Niesing-Bresch, D., Niehues, U., Tschöpe, D., van de Loo, J., Clemetson, K. J.** 1991. Thrombospondin binds normally to glycoprotein IIIb deficient platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179 (2)**: 985-991.
- Kehrel, B., Kronenberg, A., Rauterberg, J., Niesing-Bresch, D., Niehues, U., Kardoeus, J., Schwippert, B., Tschöpe, D., van de Loo, J., Clemetson, K. J.** 1993. Platelets deficient in glycoprotein IIIb aggregate normally to collagens type I and III but not to collagen type V. *Blood*, **11**: 3364-3370.

- Kehrel, B., Flicker, E., Wigbels, B., Osterfeld, M., van de Loo, J. und Lüscher, E. F.** 1996. Thrombospondin measured in whole blood - an indicator for platelet activation. *Blood Coag. Fibrin.*, **7**: 202-205.
- Kehrel, B., Wierwille, S., Clemetson, K. J., Anders, O., Steiner, M., Knight, C. G., Farndale, R. W., Okuma, M. und 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, GPIIb/IIIa and vWf do not. *Blood*, **91**: 491-499.
- Kehrel, B., Maas, M., Kardoeus, J.** 1998a. Platelet glycoproteins: function and flowcytometric analysis. In: Gutensohn, K.; Sonneborn, H. H.; Schuenter, F.; Kühnl, P.: *Flowcytometry in transfusion medicine: Clin.-Lab. Publications*, Heidelberg, 1-14
- Kelton, J. G., Smith, J. W., Warkentin, T. E., Hayward, C. P. M., Denomme, G. A. und Horsewood, P.** 1994. Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood*, **83 (11)**: 3232-3239.
- Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T. J. und Hawiger, J.** 1984. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ -chain. *Biochemistry*, **23**: 1767-1774.
- Koo, S. P., Bayer, A. S., Sahl, H. G., Proctor, R. A. und Yeaman, M. R.** 1996. Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein is not solely dependent on transmembrane potential. *Infection and Immunity*, **64**: 1070-1074.
- Koo, S. P., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Bayer, A. S.** 1997. The cytoplasmatic membrane is a primary target for the staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Infection and Immunity*, **65 (11)**: 4795-4800.
- Lahav, J.** 1993. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**: 1-14.
- Lawler, J. W., Chao, F. C., Cohen, C. M.** 1982. Evidence for a calcium-sensitive structure in platelet thrombospondin: isolation and partial characterization of thrombospondin in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.*, **257**: 12257-12265.

- Lawler, J. W., Derick, L. H., Connolly, J. E., Chen, J.-H. und Chao, F. C.** 1985. The structure of human platelet thrombospondin. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3762-3772.
- Lawler, J. W.** 1986. The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood.*, **67**: 1197-1209.
- Lawler, J. W., Weinstein, R., Hynes, R. O.** 1988. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J. Cell. Biol.*, **107**: 2351-2361.
- Leung, L. L. K. und Nachman, R. L.** 1982. Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen. *J. Clin. Invest.*, **70**: 542-549.
- Leung, L. L. K.** 1984. Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1764-1772.
- Liang, O. D., Maccarana, M., Flock, J. I., Paulsson, M., Preissner, K. T. und Wadstrom, T.** 1993. Multiple interactions between human vitronectin and *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1225 (1)**: 57-63.
- Liang, O. D., Flock, J.-I. und Wadström, T.** 1995. Isolation and characterisation of a vitronectin-binding surface protein from *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1250**: 110-116.
- Lindon, J. N., McManama, G., Kushner, L., Merrill, E. W., Salzman, E. W.** 1986. Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces? *Blood*, **68 (2)**: 355-362
- Löfdahl, S., Guss, B., Uhlen, M., Philipson, L. und Lindberg, M.** 1983. Gene for staphylococcal protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 697-701.
- Lüscher, E. F. und Weber, S.** 1993. The formation of the hemostatic plug - a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature. *Thromb. Haemost.*, **70**: 234-237.
- McDevitt, D., Vaudaux, P. und Foster, T. J.** 1992. Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. *Infection and Immunity*, **60 (4)**: 1514-1523.

- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. und Foster, T. J.** 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, **11 (2)**: 1-12.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. und Foster, T. J.** 1995. Identification of the ligand-binding domain of the surface-located fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, **16 (5)**: 895-907.
- McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T. und Höök, M.** 1997. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur. J. Biochem.*, **247**: 416-424.
- McDonagh, J., Kaczmarek, E. und Hee Lee, M.** 1995. Fibrinogen and factor XIII: Biology and disorders of fibrin formation and cross-linking. In: Handin, R. I.;Lux, S. E. und Stossel, T. P.: *Blood: Principles and Practice of Hematology*, Philadelphia , 1219-1225.
- McGavin, M. H., Krajewska, P. D., Ryden, C. und Höök, M.** 1993. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect. Immun.*, **61**: 2479-2485.
- McPherson, J., Sage, H. und Bornstein, P.** 1981. Isolation and characterization of a glycoprotein secreted by aortic endothelial cells in culture: apparent identity with platelet thrombospondin. *J. Biol. Chem.*, **256**: 11330-11336.
- Meyer, D. und Girma, J.-P.** 1993. von Willebrand factor: Structure and function. *Thrombosis and Haemostasis*, **70 (1)**: 99-104.
- Meyers, K. M.** 1986. Species differences. In: Holmsen, H.: *Platelet responses and metabolism*. CRC Press, Boca Raton, Florida **1**, 209-227.
- 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 Coag. Fibrin.*, **5**: 121-131.
- Moks, T., Abrahmsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjöquist, J. und Uhlen, M.** 1986. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.*, **156**: 637-643.

- Moreillon, P., Entenza, J. M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T. J., Francois, P. und Vaudaux, P.** 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infection and Immunity*, **63**: 4738-4743.
- Morgenstern, E.** 1998. Morphologie der Thrombozyten. In: Müller-Berghaus, G. und Pötsch, B.: Hämostaseologie. Molekuläre und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik. Springer-Verlag, Heidelberg, 3-14.
- Mosher, D. F., Doyle, M. J. und Jaffe, E. A.** 1982. Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **93**: 343-348.
- Murphy-Ullrich, J. E. und Mosher, D. F.** 1985. Localization of thrombospondin in clots formed in situ. *Blood*, **66 (5)**: 1098-1104.
- Newton, C. R. und Graham, A.** 1994. PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M. und Foster, T. J.** 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, **30 (2)**: 245-257.
- Novick, R. P.** 1963. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology*, **33**: 155-166.
- Osborne, J. M., Chacko, G. W., Brandt, J. T. und Anderson, C. L.** 1994. Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human FcγRIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. *J. Immunol. Methods*, **173 (2)**: 207-217.
- Packham, M. A.** 1988. The behavior of platelets at foreign surfaces. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **189**: 261-274.
- Parren, P. W., Warmerdam, P. A., Boeijs, L. C., Arts, J., Westerdal, N. A., Vlug, A., Capel, P. J., Aarden, L. A., van de Winkel, J. G.** 1992. On the interaction of IgG subclasses with low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. *J. Clin. Invest.* **90**: 1537-1546.
- Patel, A. H., Nowlan, P., Weavers, E. D. und Foster, T.** 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infection and Immunity*, **55 (12)**: 3103-3110.

- Patel, A. H., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Novick, R. und Foster, T. J.** 1992. Regulation of the protein A-encoding gene in *Staphylococcus aureus*. *Gene*, **114**: 25-34.
- Patti, J. M., Jonsson, H., Guss, B., Switalski, L., Widberg, K., Lindberg, M. und Höök, M.** 1992. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J. Biol. Chem.*, **267**: 4766-4772.
- Patti, J. M., Boles, J. O. und Höök, M.** 1993. Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **32**: 11428-11435.
- Patti, J. M., Bremell, T., Krajewska, P. D., Abdelnour, A., Tarkowski, A., Ryden, C. und Höök, M.** 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect. Immun.*, **62**: 152-161.
- Patti, J. M. und Höök, M.** 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Current Opinion in Cell Biology*, **6**: 752-758.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. und Höök, M.** 1994a. MSCRAMM-mediated adherence of microorganism to host tissues. *Annu. Rev. Microbio.*, **48**: 585-617.
- Patti, J. M., House-Pompeo, K., Boles, J. O., Garza, N., Gurusiddappa, S. und Höök, M.** 1995. Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *J. Biol. Chem.*, **270 (20)**: 12005-12011.
- Peng, H.-L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. und Schlievert, P.** 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **170 (9)**: 4365-4372.
- Perutelli, P. und Mori, P. G.** 1993. Activation of human platelets by monoclonal antibodies. *Haematologica*, **78 (3)**: 172-7.
- Peters, J. H. und Baumgarten, H.** 1990. *Monoklonale Antikörper*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Peterson, P. K., Verhoef, J., Sabath, L. D. und Quie, P. G.** 1977. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect. Immun.*, **15**: 760-764.

- Phonimdaeng, P., O'Reilly, M., Nowlan, P., Bramley, A. J. und Foster, T. J.** 1990. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology*, **4 (3)**: 393-404.
- Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A. und Ginsberg, M. H.** 1985. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 8057-8061.
- Proctor, R. A., Mosher, D. F. und Olbrantz, P. J.** 1982. Fibronectin binding to *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **257**: 14788-14794.
- Projan, S. J. und Novick, R. P.** 1997. The molecular basis of pathogenicity. In: Crossley, K. B. und Archer, G. L.: *The Staphylococci in Human Disease*, Churchill Livingstone, New York, 55-82.
- Raffael, A.** 1988. *Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie*, Labor-Medizin, Heidelberg.
- Raugi, G. J., Mumby, S. M., Abbott-Brown, D. und Bornstein, P.** 1982. Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J. Cell Biol.*, **95**: 351-354.
- Rescei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. und Novick, R. P.** 1986. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol. Gen. Genet.*, **202**: 58-61.
- Riecker, G.** 1993. Infektiöse Endokarditis *Klinische Kardiologie*, **3**: 161-179.
- Rolle und Mayr** 1993. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Ruggeri, Z. M.** 1991. Structure and function of von Willebrand factor: Relationship to von Willebrand's disease. *Mayo. Clin. Proc.*, **66**: 847-861.
- Ruggeri, Z. M. und Ware, J.** 1992. The structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, **67 (6)**: 594-599.
- Ruggeri, Z. M. und Ware, J.** 1993. von Willebrand factor. *FASEB J.*, **7**: 308-316.

- Ruggeri, Z. M.** 1993a. Mechanismus of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb. Haemost.*, **70**: 119-123.
- Ruggeri, Z. M.** 1999. Structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, **82 (2)**: 576-584.
- Rusovick, K. M. und Johnson, C. M.** 1991. *Staphylococcus aureus* circulate bound to platelets during experimental porcine bacteremia. *Clinical Research*, **39**: 703A.
- Sanders, L. A. M., Feldman, R. G., Voorhorst-Ogink, M. M., de Haas, M., Rijkers, G. T., Capel, P. J. A., Zegers, B. J. M. und van de Winkel, J. G. J.** 1995. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infection and Immunity*, **63 (1)**: 73-81.
- Savage, B. und Ruggeri, Z. M.** 1991. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb/IIIa on nonactivated platelets. *J. Biol. Chem.*, **266 (17)**: 11227-11233.
- Savage, B., Shattil, S. J. und Ruggeri, Z. M.** 1992. Modulation of platelet function through adhesin receptors. *J. Biol. Chem.*, **267**: 11300-11306.
- Savage, B., Saldivar, E. und Ruggeri, Z. M.** 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, **84**: 289-297.
- Schmitz, G. und Rothe, G.** 1994. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Verlag Schattauer, Stuttgart, New York.
- Scott, J. P., Montgomery, R. R. und Retzinger, G. S.** 1991. Dimeric ristocetin flocculates proteins binds to platelets and mediates von Willebrand factor-dependent agglutination of platelets. *J. Biol. Chem.*, **266**: 8149-8155.
- Shattil, S. J., Kashiwagi, H. und Pampori, N.** 1998. Integrin signaling: The platelet paradigm. *Blood*, **91 (8)**: 2645-2657.
- Signäs, C., Raucci, G., Jönsson, K., Lindgren, P.-E., Anantharamaiah, G. M., Höök, M. und Lindberg, M.** 1989. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* and its use in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **86**: 699-703.

- Slane, J. M., Mosher, D. F., Lai, C. S.** 1988. Conformational change in thrombospondin induced by removal of bound Ca^{2+} . A spin label approach. *FEBS Lett.*, **229 (2)**: 363-366.
- Smeltzer, M. S., Hart, M. E. und Iandolo, J. J.** 1993. Phenotypic characterization of *xpr*, a global regulator of extracellular virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **61 (3)**: 919-925.
- 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. und Klenk, D. C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**: 76-85.
- Sporn, L. A., Chavin, S. I., Marden, V. J. und Wagner, D. D.** 1985. Biosynthesis of von Willebrand factor by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.*, **76**: 1102-1106.
- Strong, D. D., Laudano, A. P., Hawiger, A. P. und F., D. R.** 1982. Isolation, characterization, and synthesis of peptides from human fibrinogen that block the staphylococcal clumping reaction and construction of a synthetic clumping particle. *Biochemistry*, **21**: 1414-1420.
- Stryer, L.** 1990. *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft GmbH, Heidelberg.
- Sullam, P. M., Drake, T. A. und Sande, M. A.** 1985. Pathogenesis of endocarditis. *The American Journal of Medicine*, **78 (suppl 6B)**: 110-115.
- Sullam, P. M., Payan, D. G., Dazin, P. F. und Valone, F. H.** 1990. Binding of viridans group Streptococci to human platelets: a quantitative analysis. *Infection and Immunity*, **58 (11)**: 3802-3806.
- Sullam, P. M. und Sande, M. A.** 1992. Role of platelets in endocarditis: Clues from von Willebrand disease. *J. Lab. Clin. Med.*, **120**: 507-509.
- Sullam, P. M., Bayer, A. S., Wendy, F. M. und Cheung, A. L.** 1996. Diminished platelet binding in vitro by *Staphylococcus aureus* is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. *Infection and Immunity*, **64 (12)**: 4915-4921.

- Sullam, P. M., Hyun, W. C., Szöllösi, J., Dong, J.-F., Foss, W. M. und Lopez, J. A.** 1998. Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor Fc γ RIIA on the platelet plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, **273 (9)**: 5331-5336.
- Suzuki, H., Shima, M., Kamisue, S., Nakai, H., Nogami, K., Shibata, M., Morichika, S., Tanaka, I., Giddings, J. C., Yoshioka, A.** 1998. The role of platelet von Willebrand factor in the binding of factor VIII to activated platelets. *Thromb. Res.*, **90 (5)**: 207-214.
- Switalski, L. M., Patti, J. M., Butcher, W., Gristina, A. G., Speziale, P. und Höök, M.** 1992. A collagen receptor in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol. Microbiol.*, **7**: 99-107.
- Timmons, S. und Hawiger, J.** 1989. Isolation of human platelets by albumin gradient und gelfiltration. In: Hawiger, J.: *Methods in Enzymology (Platelets: Receptors, adhesion, secretion, part A)*. Academic Press, Orlando, 11-21.
- Tompkins, D. C., Hatcher, V. B., Patel, D., Orr, G. A., Higgins, L. L. und Lowy, F. D.** 1990. A human endothelial cell membrane protein that binds *Staphylococcus aureus* in vitro. *J. Clin. Invest.*, **85**: 1248-1254.
- Tompkins, D. C., Blackwell, L. J., Hatcher, V. B., Elliott, D. A., O'Hagan-Sotsky, C. und Lowy, F. D.** 1992. *Staphylococcus aureus* proteins that bind to human endothelial cells. *Infection and Immunity*, **60 (3)**: 965-969.
- Tsuji, M., Ezumi, Y., Arai, M. und Takayama, H.** 1997. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J. Biol. Chem.*, **272 (38)**: 23528-31.
- Tzeng, D. Y., Deuel, T. F., Huang, J. S., Baehner, R. L.** 1984. Platelet-derived growth factor promotes polymorphnuclear leukocyte activation. *Blood*, **64**: 1123-1128.
- Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, F., Götz, F. und Lindberg, M.** 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J. Bacteriol.*, **159**: 713-719.

- Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Kydegger, U. E., Lew, D. P. und Waldvogel, F. A.** 1989. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J. Infect. Dis.*, **160**: 865-875.
- Vaudaux, P. E., Francois, P., Proctor, R. A., McDevitt, D., Foster, T. J., Albrecht, R. M., Lew, D. P., Wabers, H. und Cooper, S. L.** 1995. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infection and Immunity*, **63 (2)**: 585-590.
- Visentin, G. P., Ford, S. E., Scott, J. P. und Aster, R. H.** 1994. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **93**: 81-88.
- Ware, A. J., Kang, J., DeCenzo, M. T., Smith, M., Watkins, S. C., Slayter, H. S. und Saitoh, M.** 1991. Platelet activation by a synthetic hydrophobic polymer, Polymethylmethacrylate. *Blood*, **78 (7)**: 1713-1721.
- Warmerdam, P. A., van de Winkel, J. G., Vlug, A., Westerdal, N. A., Cappel, P. J.** 1991. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc γ receptor II is critical for human IgG2 binding. *The Journal of Immunology*, **147**: 1338-1343.
- Weiss, D. J.** 1999. Comparative physiology of platelets from different species. In: Rao, G. H. R.: *Handbook of platelet physiology and pharmacology*. Kluwer Academic Publisher, Boston, Dordrecht, London, 379-393.
- Wiechelmann, K., Braun, R. und Fitzpatrick, J.** 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, **175**: 231-237.
- Wolff, R., Plow, E. F. und Ginsberg, M. H.** 1986. Interaction of thrombospondin with resting and stimulated platelets. *J. Biol. Chem.*, **261**: 6840-6846.
- Xia, Z., Wong, T., Liu, Q., Kasirer-Friede, A., Brown, E. und Frojomovic, M. M.** 1996. Optimally functional fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br. J. Haematol.*, **93**: 204-214.

- Yeaman, M. R., Sullam, P. M., Dazin, P. F., Norman, D. C. und Bayer, A. S.** 1992. Characterization of *Staphylococcus aureus*-platelet binding by quantitative flow cytometric analysis. *J. Infect. Dis.*, **166**: 65-73.
- Yeaman, M. R., Norman, D. C. und Bayer, A. S.** 1992a. Platelet microbicidal protein enhances antibiotic-induced killing of and postantibiotic effect in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**: 1665-1670.
- Yeaman, M. R., Sullam, P. M., Dazin, P. F., Bayer, A. S.** 1994. Platelet microbicidal protein alone or in combination with antibiotics reduces *Staphylococcus aureus* adherence to platelets in vitro. *Infection and Immunity*, **62 (8)**: 3461-3432.
- Yeaman, M. R.** 1997. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clinical Infectious Diseases*, **25**: 951-970.
- Yeaman, M. R., Tang, Y.-Q., Shen, A. J., Bayer, A. S., Selsted, M. E.** 1997. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infection and Immunity*, **65 (3)**: 1023-1031.
- Zippel, S.** 1999. Untersuchungen zur Thrombozyten-Kollagen-Interaktion. Inaugural-Dissertation der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät, Münster.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. B. Kehrel, Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Münster, für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die Betreuung während der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dr. habil. G. Baljer, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen, danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats und für sein Interesse an dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. M. Herrmann, Medizinische Mikrobiologie, Münster, für seine stets spontane und freundliche Unterstützung vor allem in Fragen der Mikrobiologie und für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Hussain, Medizinische Mikrobiologie, Münster, für die Überlassung der MAP-Mutanten bedanken.

Herrn Prof. Dr. Vestweber, Institut für Zellbiologie (ZMBE), Münster und Herrn Dr. Olle Korsgren, Institut für Transplantationsimmunologie, Uppsala, Schweden, danke ich für die Bereitstellung von Knockout-Mäusen.

Ich danke Herrn Prof. E. Morgenstern, Medizinische Biologie, Homburg/Saar, für die Zuverfügungstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Rinder- und Katzentrombozyten.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. H. Reinecke für die Bereitstellung der Blutproben von an Staphylokokken-Endokarditis erkrankten Patienten, sowie Herrn Dr. U. Jahn für die Unterstützung bei der Gewinnung von Blutproben gesunder Probanden.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Probanden A.P., W.K., J.E., Y.A., A.M., P.R. und M.S., bei den an Endokarditis erkrankten Patienten und allen weiteren Freiwilligen, ohne deren bereitwillige Blutspende die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Münster, für die gute Zusammenarbeit und die stets bereitwillig gewährte Hilfe. Besonders danke ich Frau Dr. D. Dörmann, Frau D. Evers, Herrn Dipl. Chem. M. Glauner, Frau Dr. H. Grahl, Frau B. Hüsing, Frau Dr. K. Jurk, Frau Dr. T. Mundthal und Frau Dr. Zippel.

Für die freundliche und selbstverständliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und das außerordentlich gute Arbeitsklima möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Medizinischen Mikrobiologie, Münster, bedanken. Für ihre tatkräftige Unterstützung bedanke ich mich besonders bei Frau Dipl. Biol. Petra Becker, Herrn Dipl. Biol. Jörg Hartleib, Frau Dr. Christine Heilmann, Frau Uta Hörling, Frau Marion Reilley, Frau Martina Schulte und Frau Susanne Weber.

Besonderen Dank möchte ich meinem Ehemann Martin sagen, der mich in allen Phasen dieser Arbeit geduldig und liebevoll unterstützt hat.