

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON ALPHA
DEFENSINEN AUS NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN
AUF DIE PRIMÄRE HÄMOSTASE**

MEIKE HORN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2008

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

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth
und

Der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und
Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Betreuerin: Prof. Dr. Beate Kehrel

**Untersuchungen zum Einfluss von alpha Defensinen
aus neutrophilen Granulozyten auf die
primäre Hämostase**

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

eingereicht von

Meike Horn

Tierärztin aus Unna (Nordrhein–Westfalen)

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth

Prof. Dr. Beate Kehrel

Tag der Disputation: 5.6.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Thrombozyten	2
1.2. Thrombozytenmorphologie.....	3
1.3. Hämostase	7
1.3.1. Adhäsion	7
1.3.2. Aktivierung und Sekretion	8
1.3.3. Aggregation.....	10
1.3.4. Sekundäre Hämostase.....	10
1.3.5. Gegenregulation der Aktivierung.....	12
1.3.6. Fibrinolyse.....	13
1.4. Thrombozyten als Abwehrzellen	13
1.4.1. Plättchen teilen strukturelle und funktionelle Merkmale mit bekannten Abwehrzellen	14
1.4.2. Plättchen agieren direkt und indirekt mit Mikroorganismen.....	15
1.4.3. Thrombozytäre antimikrobielle Peptide	16
1.4.4. Thrombozyten und Leukozyten interagieren synergistisch	17
1.5. Defensine	19
1.5.1. Alpha Defensine.....	20
1.5.2. Beta-Defensine	22

1.5.3.	O-Defensine	23
1.6.	Defensin-Aktivität	23
1.6.1.	Zytolytischer Effekt.....	23
1.6.2.	Modulation der innaten und adaptiven Immunabwehr.....	25
1.6.3.	Pathophysiologie.....	26
1.7.	Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit.....	28
2.	Material und Methoden.....	29
2.1.	Geräte	29
2.1.1.	Durchflusszytometer	29
2.1.2.	ELISA-Reader	29
2.1.3.	Zentrifugen	29
2.1.4.	Weitere Geräte.....	30
2.2.	Chemikalien	30
2.2.1.	Antikörper.....	31
2.3.	Präparation von Thrombozyten und Monozyten.....	32
2.3.1.	Isolierung von Thrombozyten durch Gewinnung von Plättchenreichem Plasma (PRP)	32
2.3.2.	Isolierung von Thrombozyten mittels Gelfiltration.....	32
2.3.3.	Herstellung von Plättchen-armen Plasma(PPP).....	34
2.3.4.	Isolierung der Leukozyten	34
2.3.5.	Zellzählung.....	36

2.4.	Zellaktivierung	36
2.4.1.	Defensin	36
2.4.2.	Thrombin	37
2.4.3.	Kollagen	38
2.4.4.	ADP	39
2.4.5.	C-terminales TSP-1-Peptid RFYVVMWK.....	39
2.5.	Detektion von Plättchenaktivierung	40
2.5.1.	Durchflußzytometrie	41
2.5.2.	Nachweis der Plättchenaktivierung	45
2.5.3.	Fibrinogenbindung	45
2.5.4.	α -Granula-Sekretion.....	47
2.5.5.	Sekretion der elektronendichten Granula (Dense-bodies), CD63-Expression.....	48
2.5.6.	Expression des CD40 Liganden.....	48
2.5.7.	Bindung von extern zugesetztem TSP-1	48
2.5.8.	Prokoagulanter Zustand.....	49
2.5.9.	Messung der Annexin V-Bindung an Thrombozyten	50
2.5.10.	Messung der Faktor VIII-Bindung an Thrombozyten	50
2.5.11.	Messung der Faktor Xa-Bindung an Thrombozyten	51
2.5.12.	Messung von Thrombozytenmikropartikeln	51
2.6.	Detektion von Thrombozyten –Leukozyten-Assoziaten.....	52

2.6.1.	Probenvorbereitung für Untersuchungen im Vollblut.....	52
2.7.	Einfluß verschiedener Modulatoren auf die Thrombozytenaktivierung durch Defensin.....	54
2.7.1.	Antithrombin III.....	54
2.7.2.	Heparin.....	55
2.7.3.	Thrombospondin-1.....	56
2.7.4.	Hirudin.....	57
2.7.5.	α 2 –Makroglobulin.....	57
2.7.6.	α 1–Antitrypsin.....	58
2.7.7.	Vitronectin.....	58
2.7.8.	Iloprost und PGE-1.....	59
2.7.9.	Bacitracin.....	59
2.8.	ELISA-Verfahren.....	60
2.8.1.	sCD 40 L ELISA.....	60
2.9.	Thrombinbildungsassay.....	61
2.10.	Endothelzellversuche.....	63
2.10.1.	Kultivierung von HMEC-1 (human microvascular endothelial cell-line-1)	63
2.10.2.	Endothelzellaktivierung.....	64
2.11.	Membranpermeabilität von Endothelzellen.....	65
2.12.	Statistische Absicherung der experimentellen Daten.....	66

3. Ergebnisse	67
3.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen zum Einfluß von Defensin auf die Thrombozytenaktivierung	67
3.1.1. Fibrinogenbindung an gelfiltrierte Plättchen induziert durch klassische Agonisten und alpha Defensine	67
3.1.2. Fibrinogenbindung an gelfiltrierte Plättchen verschiedener Tierarten	70
3.1.3. Fibrinogenbindung an Thrombozyten nach HNP Aktivierung im PRP.	72
3.1.4. Fibrinogenbindung an Thrombozyten nach beta-Defensin Aktivierung bei gelfiltrierten Plättchen	74
3.1.5. Zeitkinetik	75
3.1.6. α -Granula-Sekretion	75
3.1.7. „Dense-bodies“-Sekretion	76
3.1.8. Bindung des TSP-1 an die Plättchenoberfläche	77
3.1.9. CD40 Ligand Expression der Thrombozyten	77
3.1.10. Ausbildung des prokoagulantem Zustands	78
3.1.11. Mikropartikelformation	80
3.1.12. Untersuchungen zum Einfluß von HNP 1-3 im Citrat-antikoaguliertem Vollblut	82
3.2. Einfluß verschiedener Proteine auf die HNP induzierten Plättchenaktivierung	83

3.2.1.	Einfluß von ATIII auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung	83
3.2.2.	Einfluß von Hirudin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung	85
3.2.3.	Einfluß von alpha 2 Makroglobulin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung	86
3.2.4.	Einfluß von α 1 Antitrypsin	87
3.2.5.	Einfluß von Adhäsionsproteinen.....	88
3.2.6.	Einfluß von Prostaglandinen	89
3.2.7.	Einfluß von Albumin	91
3.2.8.	Einfluß von Bacitracin	91
3.3.	Elisaverfahren	94
3.3.1.	Abgabe von löslichem CD40L ins Plasma nach Aktivierung von Thrombozyten mit HNP-1	94
3.4.	Einfluß von HNP auf die Thrombinbildung in Gegenwart von Thrombozyten.....	95
3.5.	Einfluß von HNP-1 auf Endothelzellen	96
3.5.1.	Effekt von C-terminalem TSP-1-Peptid RFYVVMWK.....	98
3.5.2.	Einfluß von HNP-1 auf die Permeabilität der Thrombozytenmembran	99
4.	Diskussion	101
4.1.	HNP1-3 sind starke Plättchen- und Endothelzellagonisten	101
4.2.	Hemmung der Defensinwirkung	113

4.3. Spekulationen über den Wirkmechanismus der Plättchenaktivierung durch HNPs.....	118
5. Ausblick.....	123
6. Zusammenfassung.....	125
7. Summary.....	128
8. Abkürzungsverzeichnis.....	131
9. Publikationen.....	134
9.1. Veröffentlichte Abstracts	134
9.2. Manuskripte in Bearbeitung.....	135
10. Erklärung.....	136
11. Literaturverzeichnis	137

1. Einleitung

Die Blutgerinnung ist bei Mensch und Tier eine Reaktion auf Verletzungen von Blutgefäßen. Wir alle haben bereits Erfahrungen mit der eigenen Blutgerinnung gemacht, beispielsweise wenn wir uns eine Schnittwunde am Finger zugezogen haben.

Nach einer kurzen starken Blutung wird das Blut langsam dickflüssiger und es kommt dann schließlich zu einer Blutstillung und zu einem krustigen Wundverschluss. Thrombozyten (Blutplättchen) spielen bei dieser Blutgerinnung eine zentrale Rolle, indem sie mit Gerinnungsfaktoren im Blut und Proteinen der verletzten Blutgefäßwand interagieren, um dann in aggregierter Form -als Thrombus- das verletzte Gewebe abzudichten.

Damit sich die Wunde nicht infiziert und schnellstmöglich verheilen kann, beteiligen sich Abwehrzellen, vornehmlich Leukozyten, mit an der Blutgerinnung. Sie schützen den Körper vor einem Eindringen von Infektionserregern an der durch die Verletzung entstandenen Eintrittspforte. Die Blutplättchen sind aber auch selber nicht nur für die Gerinnung verantwortlich, sie sind zusätzlich spezialisierte Abwehrzellen und interagieren mit den Leukozyten.

Diese Zusammenarbeit von Leukozyten und Thrombozyten funktioniert nicht nur im Bereich von lokalen Wunden. Auch wenn Erreger doch in den Körperkreislauf gelangt sind, werden sie im Blutstrom gemeinsam von diesen spezialisierten Abwehrzellen bekämpft. Diese Mechanismen geschehen meistens unbemerkt und schützen das Individuum vor Schäden und Erkrankungen.

Kommt es jedoch zu einer erheblichen Infektion oder zu einer überschießenden Abwehrreaktion, so kann die Gerinnung im gesamten Körperkreislauf in Gang gesetzt werden und das Individuum durch diese hämodynamischen Veränderungen schwer erkranken oder sogar sterben. Während dieser Prozesse können Thrombozyten und Leukozyten den Körper nicht mehr verteidigen, sondern schädigen selber das Gewebe, welches sie eigentlich beschützen sollen.

Im Rahmen der Einleitung zu dieser Arbeit sollen zunächst die Mechanismen der Blutgerinnung und das Zusammenspiel mit dem Abwehrsystem dargestellt werden.

Dabei kommt den hauptsächlich antimikrobialen Abwehrpeptiden der Neutrophilen Granulozyten, den sog. α -Defensinen eine besondere Aufmerksamkeit zu. Über den neusten Stand der Forschung leiten sich schließlich die Fragestellungen dieser Arbeit her.

1.1. Thrombozyten

Thrombozyten (Blutplättchen) haben ihren Ursprung im Knochenmark. Hier reifen sie zunächst aus der Linie der myeloischen Stammzellen in Form von Megakaryozyten heran. Die eigentlichen Plättchen entstehen durch Fragmentierung reifer, differenzierter Vorläuferzellen, vermutlich wenn diese das Knochenmark verlassen und dabei an zytoplasmatischen Ausläufern zwischen Endothelzellen des Marksinus zerfallen.

Einige Plättchen können noch an der Demarkationsmembran untereinander verbunden sein, wenn sie den Blutstrom erreichen und werden dann in Kapillaren von Lunge und Milz entgültig getrenntⁱ. Aus einem Megakaryozyten können so bis zu 1000 Plättchen entstehen.

Die Thrombozyten sind bei den Säugern kernlos und 2-4 μm groß, bei Sauropsiden sind sie dagegen kernhaltig und etwas größer.

Die Plättchenzahl im zirkulierenden Blut schwankt tierartlich stark.

Während Menschen 140.000-360.000 Thrombozyten/ μl Blut 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 μm^3 . Mittleres Volumen weisen Schwein, Mensch und Hund auf (6,9 bis 7,7 μm^3) und eher kleine Plättchen besitzen Pferd und Rind mit einem Volumen von 4,4 bis 5,8 μm^3 ⁱⁱ.

Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt etwa 3-10 Tage bevor sie im retikuloendothelialen System der Leber und Milz durch Gewebsmakrophagen abgebaut werdenⁱⁱⁱ. Eine Ausnahme bildet hier die Katze, deren Thrombozyten schon nach 30 Stunden gealtert sind und phagozytiert werden^{iv}

Normalerweise sind etwa 1/3 der Thrombozyten in der Milz gespeichert, dieser stationäre Anteil steht im ständigen Austausch mit dem zirkulierenden Kompartiment.

1.2. Thrombozytenmorphologie

Im unstimulierten Zustand haben Plättchen eine diskoide Gestalt.



Abbildung 1-1 Ruhende Thrombozyten, EM-Bild (B. Kehrel)

Die Oberflächenmembran der Thrombozyten ist eine klassische Lipiddoppelschicht, die aus fünf Hauptphospholipiden zusammengesetzt ist: Phosphatidylcholin(PC), Phosphatidylethanolamin(PE), Sphingomyelin(SphM), Phosphatidylserin(PS) Phosphatidylinositol(PI). Die Phospholipide sind über die Doppelschicht nicht homogen verteilt. Die äußere Schicht enthält auf ruhenden Plättchen fast das gesamte SphM und ist reich an PC, während die zytosolische Seite fast das gesamte PS und PI enthält und reich an PE ist.

In die Oberflächenmembran sind zahlreiche Membranproteine eingelagert. Diese bilden zusammen mit gebundenen Kohlenhydratketten eine ausgeprägte Glycokalix. Die Glycokalix enthält Rezeptoren für verschiedene Plättchenagonisten- und inhibitoryen^v.

Durch einen hohen Anteil des Neuraminsäureabkömmlings Sialinsäure (N-acetyl neurominic acid) ist die Oberflächenladung der Plättchen negativ. Diese negativ geladene Oberfläche schützt die Thrombozyten vor einem zu engen gegenseitigen Kontakt sowie gegen einen zu engen Kontakt zum ebenfalls negativ geladenen Endothel^{vi vii}.

Die Oberflächenmembran der Thrombozyten zeigt gangförmige Einstülpungen, die ein offenes kanikuläres System (OCS) bilden. Thrombozyten von Wiederkäuern fehlt dieses System (siehe Abb. 1-2). Neben dem mit der Oberfläche verbundenen offenen Kanalsystem existiert in Thrombozyten noch ein geschlossenes inneres Kanalsystem (DTS).

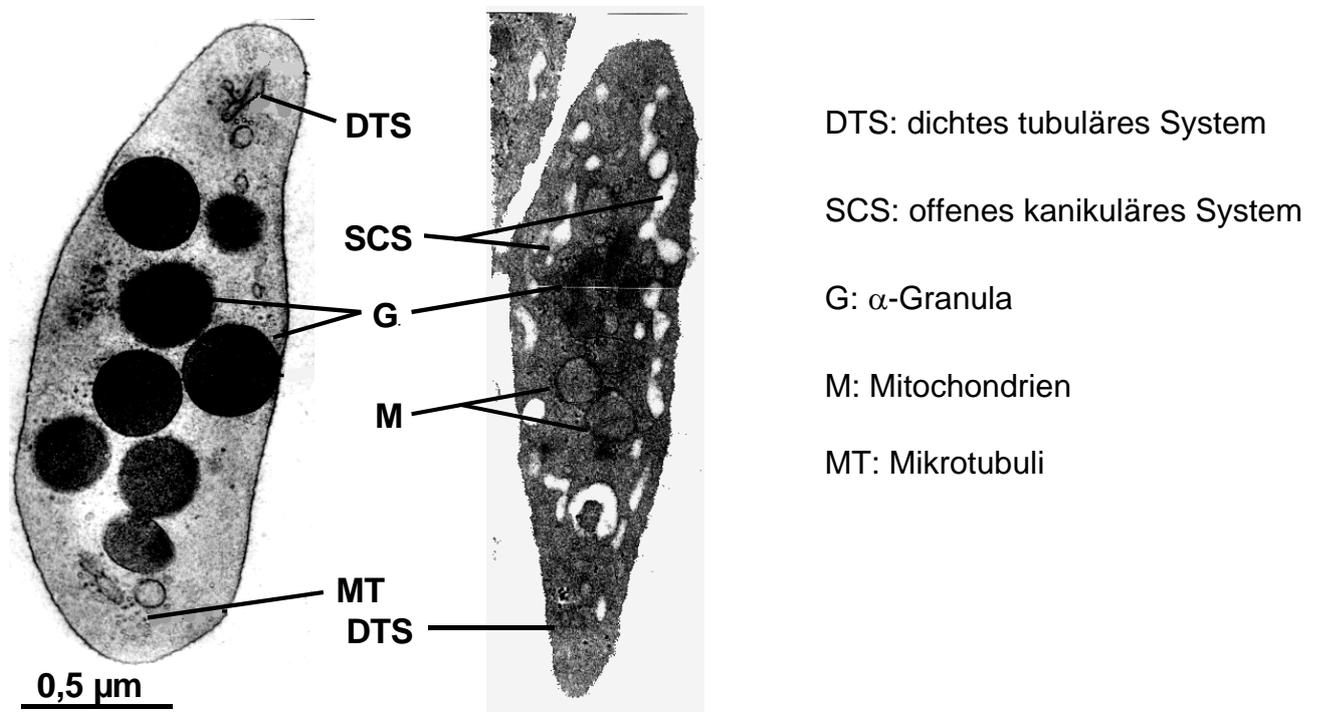


Abbildung 1-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme ruhender Thrombozyten eines Rindes (A) und einer Hauskatze (B). Thrombozyten von Wiederkäuern besitzen vergleichsweise große α-Granula, ihnen fehlt jedoch das offene Kanalsystem. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. E. Morgenstern, Homburg/ Saar

Submembranär bilden Actin-Filamente das Membranzytoskelett, dem sich nach innen das Mikrotubulinbündelsystem anschließt. Das Zytoplasma enthält, wie in anderen eukaryontischen Zellen, unter anderem Mikrofilamente, Glykogen, Mitochondrien, ein endoplasmatisches Retikulum und einen Golgi Apparat zur Proteinsynthese sowie Lysosomen.

Thrombozyten haben spezifische Speichergranula, die man in dichte Körperchen (dense bodies) und alpha Granula unterteilt.

Die „dense bodies“ enthalten hauptsächlich vasotonische Mediatoren wie ADP, Serotonin und Calcium.

In den alpha-Granula, die etwa 15 % des Thrombozytenvolumens ausmachen, befinden sich Adhäsionsmoleküle (z.B. Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Multimerin, Fibronectin), Immunglobuline, sowie Proteine die in die hämostatischen Funktionen involviert sind (z.B. Gerinnungsfaktoren wie Faktor V, Faktor XIII). Des Weiteren beinhalten die alpha Granula modulierende Faktoren der Fibrinolyse wie Plasminogen und PAI-1 und auch wichtige Zytokine, Wachstumsfaktoren zur Endothelzellreparatur, wie RANTES, NAP-2; ENA78 und den aus Plättchen stammenden Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor“PDGF“) sowie das beta-Thromboglobulin und den Plättchenfaktor 4 (PF4).

Die alpha Granula sind der Speicherort für ein Arsenal antimikrobieller Peptide.^{viii}

Aktiviert Thrombozyten zeigen einen Formenwandel (shape change). (Abb.1-3) Dabei wird das offene Kanalsystem als Membranreservoir evaginiert und bildet Pseudopodien aus.

Während die meisten Zellorganellen durch ein kontraktiles Gel zentral zusammengehalten werden, verschmelzen die Membranen der Granula mit der Plasmamembran und ihre Inhaltstoffe werden sezerniert.

In der Granulamembran integrierte Glykoproteine wie P-Selektin („cluster of differentiation“ CD62P) aus den alpha –Granula bzw. Granulophysin (CD63) aus den „dense bodys“ werden dabei auf der Plättchenoberfläche exprimiert^{ixx}

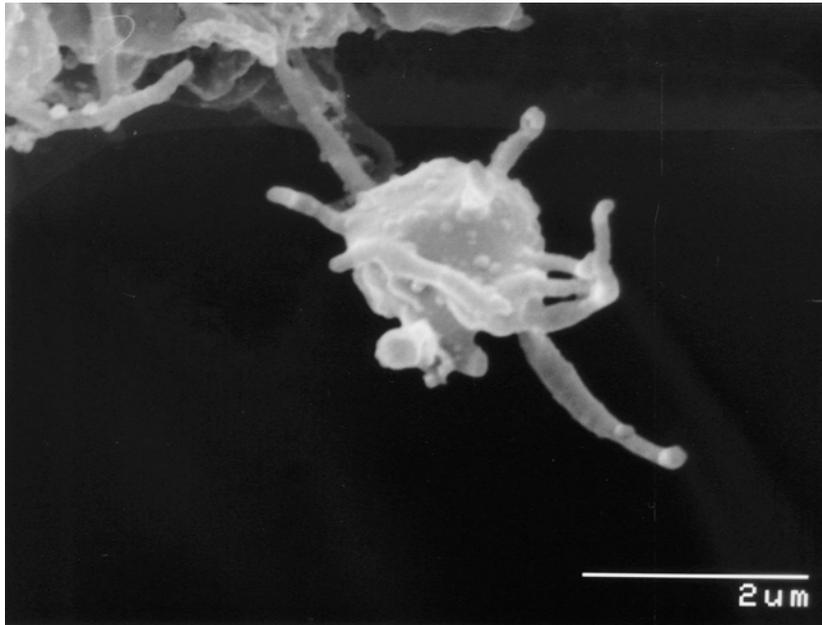


Abbildung 1-3: Aktivierter Thrombozyt, EM-Bild (B. Kehrel), zu erkennen sind die Pseudopodien, die wie Arme von dem Thrombozyten abstehen.

Die Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten einzelner Spezies ist extrem unterschiedlich. So bilden Thrombozyten von Wiederkäuern zwar Pseudopodien aus, es fehlt jedoch die nach Aktivierung der Zellen übliche Plättchenausbreitung. Daneben zeigen die Plättchen der Wiederkäuer eine reduzierte Adhäsion an das 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. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie der Katze kann es durch diese Hyperkoagulabilität zur Aortenthrombose kommen, die eine häufige und meist tödlich verlaufende Komplikation darstellt. Auch Pferdethrombozyten zeigen sich *in vivo* als hochreaktiv und thromboembolische Erkrankungen sind, im Gegensatz zum Wiederkäuer, häufig zu beobachten^{xi}.

1.3. Hämostase

Blutplättchen steuern bei allen Vertebraten aktiv die Gerinnung und die Fibrinolyse in den Blutgefäßen, sie sorgen so für eine Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität und Blutflüssigkeit, die für die normalen Funktionen des Bluts nötig sind.

Nach einer Verletzung des Endothels eines Blutgefäßes interagieren Thrombozyten mit Gerinnungsfaktoren und Proteinen der nun freiliegenden extrazellulären Matrix, um in aggregierter Form als Thrombus das verletzte Gewebe abzudichten^{xii}.

Dieser Vorgang, der als primäre Hämostase bezeichnet wird, beinhaltet die drei Schritte der Plättchenadhäsion, -aktivierung, und -aggregation

Zur Stabilisierung des Thrombozytenpfropfes wird dann, während der sekundären Hämostase, mit Hilfe des Gerinnungsfaktors Thrombin aus den Fibrinogenplättchenaggregaten ein Fibrin-Plättchen-Netzwerk gebildet, welches auch Erythrozyten und Leukozyten mit einschließt^{xiii}.

Im Zuge der Reparatur der Gefäßwand kommt es schließlich wieder zur Auflösung (Fibrinolyse) des „Clots“, um wieder einen normalen Blutfluß zu ermöglichen^{xiv}.

1.3.1. Adhäsion

Die Gerinnung beginnt wenn eine Gefäßwand verletzt wird. In diesem Moment kommt das Blut mit adhäsiven Proteinen des Subendothels und mit Zellen, die konstitutiv TF (tissue factor) exprimieren, in Kontakt. Die Adhäsion wird über die Interaktion spezifischer Plättchenglykoproteine mit Proteinen der subendothelialen Matrix vermittelt. Bei Einwirkung von geringen Scherkräften, wie z.B in großen Venen, spielt die Bindung der Plättchen an Kollagen, dem Hauptprotein der subendothelialen Matrix, eine entscheidene Rolle.

Auch immobilisiertes Fibrinogen kann unter diesen Bedingungen am freigelegten Subendothel binden und ebenfalls als direktes Plättchensubstrat fungieren^{xv}.

Unter hohen Scherkräften, wie sie in kleineren arteriellen Gefäßen und Kapillaren entstehen, kann die erste Bindung jedoch lediglich über den von Willebrand Faktor (vWF) geschehen, der an den Glycoprotein(GP)Ib/V/IX-Komplex der Plättchen bindet^{xvi}.

Neben der Adhäsion der Plättchen wird an den exprimierten TF aktivierter Gerinnungsfaktor VII angelagert.^{xvii} Der entstandene TF/VIIa Komplex aktiviert Faktor X zu Xa und IX zu IXa. Diese aktivierten Enzyme bilden aus Prothrombin Thrombin. Durch die gleichzeitige Bildung des Inhibitionskomplexes aus TFPI(tissue factor pathway inhibitor) bleibt diese erste Thrombinbildung jedoch gering und reicht für den effektiven Wundverschluß nicht aus. Sie reicht aber aus, um die Faktoren XI, VIII, V und weitere Blutplättchen zu aktivieren und so den Amplifikationsprozess anzustoßen^{xviii}.

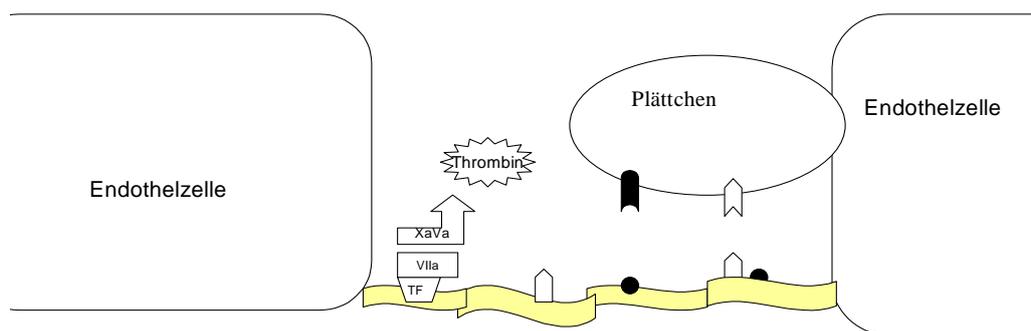


Abbildung 1-4: Kommt es zur Verletzung eines Blutgefäßes so liegt die subendotheliale Matrix mit Ihren Adhäsionsproteinen frei. Mit dem Blutstrom vorbeikommenden Plättchen haften mit ihren Glycoproteinen spezifisch an diese Proteine. Im gleichen Moment wird durch exprimierten tissue factor (TF) der mit im Blut vohandnem Faktor VIIa einen Komplex bildet, eine Faktoraktivierung gestartet, die zu einer geringen ersten Thrombinbildung führt.

1.3.2. Aktivierung und Sekretion

Die Anbindung der Plättchen an die Proteine der subendothelialen Matrix und der Kontakt zum gebildeten Thrombin, führen über spezifische Plättchenrezeptoren zur Plättchenaktivierung.

Diese Plättchenaktivierung ist eine Serie von Ereignissen, die zum Formenwandel der Thrombozyten (shape change) und zur Freisetzung von Granulainhaltstoffen (Sekretion) führt.

Die freigesetzten Stoffe reagieren dann mit anderen Plättchen in der flüssigen Phase und auch mit anderen Blut- und Gefäßwandzellen. Vorbeischwimmende Plättchen werden nun also zusätzlich durch ADP, MMP2, TxA2 aktiviert^{xix}.

Die Bindung dieser physiologischen Agonisten führt durch Auslösung intrazellulärer Botenstoffmechanismen (second-messenger) zu aktivierenden Stoffwechselsignalen innerhalb des Plättchens. Das „second-messenger“-Molekül Inositol-triphosphat (IP3) bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem dichten tubulären System. Die daraus resultierende Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt zur Aktivierung verschiedener Ca^{2+} -abhängiger Enzyme. Desweiteren bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eine Aktivierung der Phospholipase-A2 (PLA2), die zu einer Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden führt. Durch die Enzyme Cyclooxygenase und Thromboxansynthetase wird schließlich Thromboxan-A2 gebildet, das eine proaggregatorische Wirkung auf die Plättchen ausübt. Der „second messenger“ Diacylglycerin (DAG) aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum eine Phosphorylierung von Threonin- und Serinresten bewirkt, und zur Sekretion der Plättchengranula führt^{xx}.

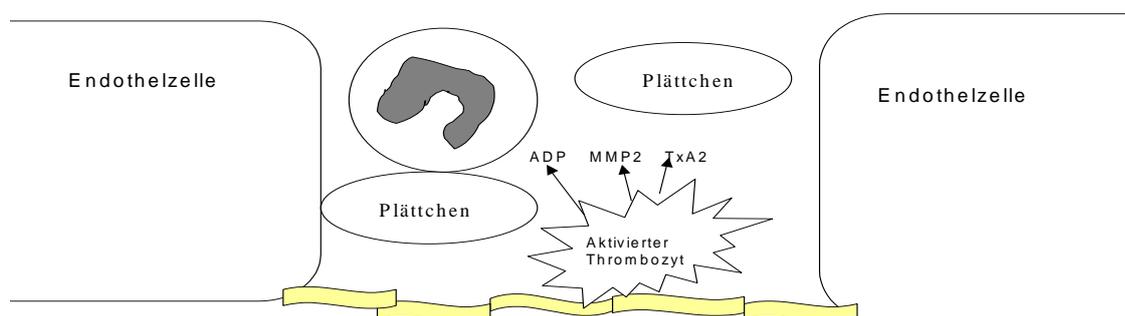


Abb. 1-5: Die Thrombozyten verändern durch Ihre Aktivierung zum einen Ihre Form, zum anderen setzen sie ihre Granulainhaltstoffe frei. Diese Mediatoren aktivieren nun wiederum ihrerseits weitere Thrombozyten und andere Zellen.

1.3.3. Aggregation

Die Aktivierung der Plättchen bewirkt eine Konformationsänderung des für die Aggregation essentiellen Glykoproteins IIb/IIIa (Fibrinogenrezeptors). Dieses wird damit in die Lage versetzt, lösliches Fibrinogen zu binden. Fibrinogen ist ein Bestandteil des Blutplasmas und wird von aktivierten Plättchen aus den alpha Granula sezerniert^{xxi}. Die Fibrinogenmoleküle können nun als Brückenmoleküle dienen und mehrere Plättchen miteinander verbinden, es kommt damit zur Aggregatbildung^{xxii}.

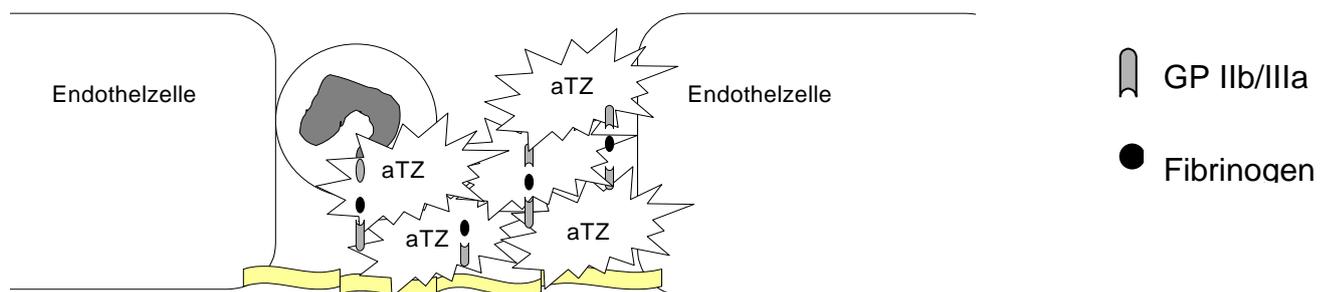


Abbildung 1-6:Die aktivierten Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche das GP IIb/IIIa. Diese Glycoprotein stellt den bindenden Rezeptor für im Blut befindliche Fibrinogenmoleküle dar. Insgesamt kann jedes Fibrinogenmolekül von zwei GP IIb/IIIa gebunden werden, und so kommt es durch die Bindung zwischen Fibrinogen und ihren spezifischen plättchenassoziierten Rezeptoren zur Verbindung der Plättchen untereinander.

1.3.4. Sekundäre Hämostase

Das primäre Plättchenaggregat ist relativ instabil. Eine effiziente Blutstillung erfordert die Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus.

Dazu lagern sich vornehmlich auf der Oberfläche von aktivierten Plättchen über Phospholipide und spezifische Rezeptoren Gerinnungsfaktoren an, die durch die erste Thrombinbildung aktiviert wurden.

Der Xase- und der Prothrombinase-Komplex kann nun hoch effizient arbeiten und zu einer massiven Vermehrung der Thrombin Moleküle führen. Dieser „Thrombinburst“ führt zur Bildung von Fibrin aus Fibrinogen.

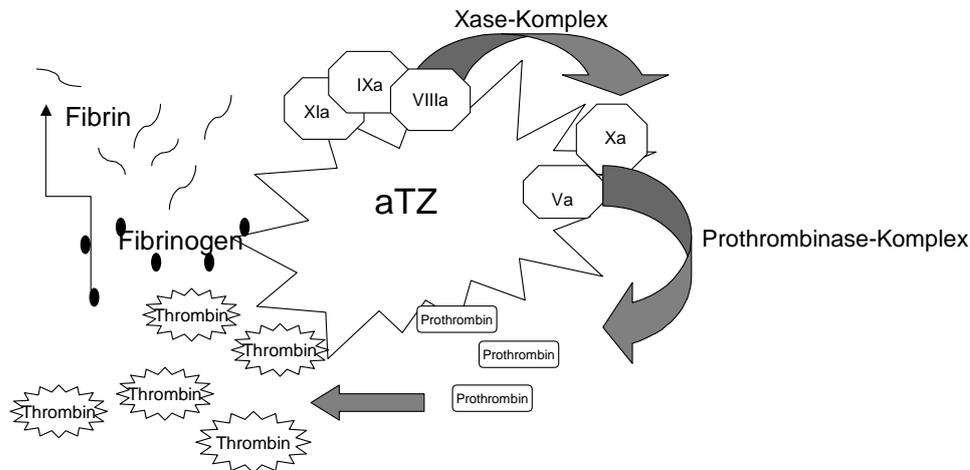


Abb.1-7: Auf der Oberfläche der aktivierten und aggregierten Plättchen lagern sich die durch die erste Thrombinbildung aktivierten Gerinnungsfaktoren an. Sie bilden Gerinnungsfaktorenkomplexe, die hocheffizient arbeiten und zu einer erheblichen zweiten Thrombinbildung führen. Das entstehende Thrombin formt nun die in den hämostatischen Blutkuchen „eingearbeiteten“ Fibrinogenmoleküle zu fadenziehendem verklebenden Fibrin um.

Über Fibrinquervernetzungen und anschließende Gerinnselretraktion entsteht dann die Stabilität des hämostatischen Blutkuchens^{xxiii}.

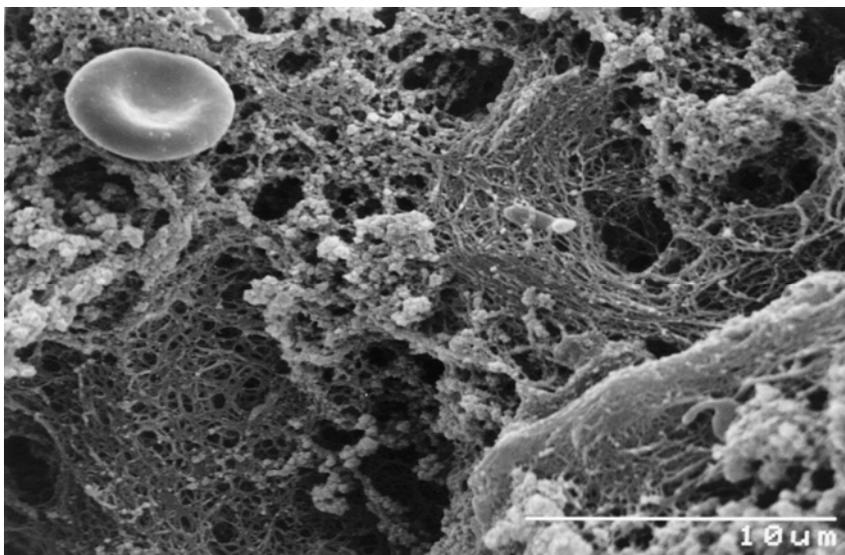


Abbildung 1-8: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines retrahierten Gerinnsels (B. Kehrel). Zu erkennen sind neben den aggregierten Thrombozyten auch ein roter Blutkörper und Fibrinfäden.

1.3.5. Gegenregulation der Aktivierung

Damit es nicht zu einer überschießenden Gerinnungsaktivierung kommt, gibt es physiologische Inhibitoren, die für eine Balance des Gerinnungssystems sorgen.

Die Antithrombine hemmen beispielsweise die Serinproteasen Xa und Thrombin und in geringerem Maße auch andere Gerinnungsfaktoren wie IXa, XIa, XIIa. Damit reduzieren sie die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin sowie eine weitere Thrombozytenaktivierung.

Durch die Bindung der Antithrombine an Heparansulfate wie sie auf Endothelzellen vorkommen, kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der thrombinhemmenden Wirkung. Auch durch nicht membrangebundenes Heparin, welches von Endothelzellen und Mastzellen freigesetzt wird, kann die Antithrombinwirkung um das etwa 1000-fache verstärkt werden. In der normalen Hämostase bindet ATIII an Endothelzell-heparansulfat und kontrolliert so den Gerinnungsprozess in der Peripherie von Gefäßverletzungen.

Andere Inhibitoren führen durch den Anstieg an cAMP oder cGMP zu einer Verminderung der Thrombozytenaktivierung, -aggregation und -sekretion^{xxiv}. Dabei verringert cAMP die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem geschlossenen tubulären System. Sowohl cAMP- als auch cGMP-Anstieg führen zu verstärkter Phosphorylierung von unterschiedlichen Substraten für cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen. Substanzen wie Prostacyclin fördern die Synthese von cAMP durch die Adenylat Cyclase.

Weitere antithrombotische und antikoagulatorische Einflüsse werden durch das Endothel vermittelt. Befindet sich das Endothel im Ruhezustand wird durch die Sekretion antikoagulatorischer Substanzen wie Prostaglandin und Stickstoffmonoxid eine intravasale Thrombozytenaktivierung verhindert.

Auf der Zelloberfläche von Endothelzellen wird das Protein Thrombomodulin exprimiert, welches Thrombin bindet und diesem damit seine prokoagulatorische Aktivität entzieht. Der Thrombin–Thrombomodulin-Komplex ist zudem ein starker Aktivator der Protease Protein C. Aktiviertes Protein C inaktiviert die Faktoren Va und

VIIIa. Durch die Bindung des Protein S als Cofaktor kann die enzymatische Aktivität von Protein C weiter gesteigert werden^{xxv}.

1.3.6. Fibrinolyse

Das zentrale Protein der Fibrinolyse ist das proteolytische Plasmin, welches in seiner inaktiven Vorstufe Plasminogen im Blut zirkuliert. Es baut Fibringerinsel zeitlich verzögert ab und gewährleistet so wieder einen normalen Blutfluss^{xxvi}.

Durch den gewebsabhängigen Plasminogen Aktivator (t-PA) oder den Urokinase Plasminogen Aktivator (u-PA) wird das während der Gerinselformung im Thrombus eingeschlossene Plasminogen zu Plasmin gespalten und Fibrin in zahlreiche definierbare Spaltprodukte abgebaut^{xxvii}.

1.4. Thrombozyten als Abwehrzellen

Thrombozyten spielen nicht nur eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung, sondern sind auch maßgeblich an einer Vielzahl anderer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wie Entzündungsreaktionen, Wundheilung, Tumormetastasierung, Atherosklerose und antimikrobieller Abwehr beteiligt^{xxviii-xxix}.

Dem Körper stehen zwei Kategorien von Mechanismen zur Verfügung um das „Selbst“ vor Schäden von außerhalb, wie mikrobieller Invasion und Infektion, oder innerhalb, wie bei der Entstehung von Tumoren, zu bewahren:

1) Die angeborene oder innate Immunität:

Sie ist phylogenetisch älter und bei allen mehrzelligen Organismen zu finden. Sie verläuft immer nach dem gleichen unspezifischen Schema und bedarf keines Gedächtnisses.

2) Die erworbene oder adaptive Immunität:

Sie ist erst bei höheren Organismen wie den Wirbeltieren ausgebildet und reagiert antigen-spezifisch mit Lymphozyten und der Produktion von Antikörpern.

Thrombozyten sind Teil beider Systeme. Sie aktivieren als Teil der angeborenen Immunabwehr das Komplementsystem^{xxx} und bekämpfen zusammen mit Makrophagen, Monozyten und Granulozyten, den größten Teil der Infektionen noch bevor das erworbene Immunsystem aktiv wird.

Dabei interagieren die Thrombozyten direkt und indirekt mit Mikroorganismen. Sie eliminieren Pathogene einerseits indirekt aus dem Blutstrom indem sie an diese binden und sie in Fibrin einschließen, damit wirken sie einer potentiellen hämatogene Ausbreitung entgegen und besitzen andererseits auch die Fähigkeit bakterielle, mykotische und protozoische Pathogen direkt zu schädigen und zu töten^{xxxi}.

Durch die Freisetzung von Chemokinen und immunmodulierende Liganden wie CD 40 L (CD 154) induzieren Plättchen die Reifung dendritischer Zellen, führen zu B-Zell Isotypen „switching“ und antigenspezifische Antikörperproduktion und modulieren somit auch die adaptive Immunität^{xxxii}.

Weitere immunmodulierende Moleküle wie TLR4^{xxxiii}, ICAM-2^{xxxiv}, CD95L^{xxxv} sind auf Plättchen identifiziert worden, und spielen sehr wahrscheinlich auch eine Rolle in der Verbindung zur adaptiven Immunität, die noch weiter untersucht werden muß.

1.4.1. Plättchen teilen strukturelle und funktionelle Merkmale mit bekannten Abwehzellen

Mikroorganismen werden von Thrombozyten in phagosomenähnliche Vakuolen internalisiert.

Neben der Fähigkeit zur „Phagozytose“ ähnlichen Reaktion besitzen Thrombozyten Oberflächenrezeptoren und zytoplasmatische Granula, die in Struktur und Funktionen denen anderer bekannter Abwehzellen wie Neutrophilen, Monozyten oder Makrophagen ähneln.

Sie teilen sich bekannte Oberflächenantigene wie P-Selectin^{xxxvi}, C-reaktives Protein^{xxxvii}, Fc Rezeptor für IgE^{xxxviii} und Thrombospondinrezeptor CD 36^{xxxix}. Es ist auch bekannt, dass Plättchen den Komplement CR3 Rezeptor sowie TLRs exprimieren und auf Zytokine wie TNF α , IL-1 und 6 in ähnlicher Weise wie Leukozyten reagieren^{xl}. Die Interaktion mit dem Komplementsystem funktioniert nicht nur über die durch Proteine des Komplementsystems spezifische Aktivierung der Plättchen, sondern das Komplementsystem kann auch selber von Plättchen aktiviert und moduliert werden. So wurde beispielsweise P-Selectin als Rezeptor für C3b entdeckt über den eine Komplementaktivierung initiiert werden kann^{xli} und gezeigt, dass Plättchen die Bildung des C5b-C9 Komplexes medieren^{xlii}. Wie Granulozyten und Makrophagen können Plättchen nach Aktivierung antimikrobielle Sauerstoffmetaboliten freisetzen^{xliii}.

1.4.2. Plättchen agieren direkt und indirekt mit Mikroorganismen

Viele Erreger werden durch aktivierte Plättchen geschädigt bzw. getötet. Studien haben gezeigt, dass eine Vielzahl von Bakterien^{xliv}, Viren^{xlv} und Pilzen^{xlvi} an Plättchen binden und diese zur Aggregation und Sekretion veranlassen.

Die Interaktionen zwischen Erregern und Plättchen, die dann häufig zum Tod der Erreger führen, sind noch nicht bis ins letzte Detail erforscht. Jedoch ist bekannt, dass sowohl direkte (Rezeptoren, Ladung, Hydrophobizität....) als auch indirekte (Antikörper, Fibrinogen, Thrombospondin etc....) Interaktionen eine Rolle spielen.

Protozoen interagieren beispielsweise indirekt über IgE mit plättcheneigenem Fc Rezeptor und stimulieren die Plättchen so zur zytotoxischen Aktivität^{xlvii}.

1.4.3. Thrombozytäre antimikrobielle Peptide

Ein wichtiges Hilfsmittel der Plättchen im Kampf gegen Infektionen sind spezielle Peptide.

Plättchen, die durch Mikroorganismen, Entzündungsmediatoren oder Thrombin stimuliert werden, setzen eine Reihe dieser potenten antimikrobiellen Peptide^{xlviii} sog. Thrombocidine frei. Diese Substanzen gehören zur Familie der „cationic antimicrobial peptides/proteins“ (CAMPs)^{xlix}. Sie haben eine molekulare Masse zwischen 6-9kD und ca. 70-100 Aminosäuren und zeigen in vitro im mikromolaren Konzentrationen (10-40µg/ml) mikrobiostatische und mikrobiozide Aktivität z.B. gegen *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, Streptokokken und *Cryptococcus neoformans*.

Die thrombozytären mikrobioziden Proteine wurden erstmals aus Rattenplättchen isoliert. Sie wurden mittels Säureextraktion oder Thrombinstimulation gewonnen und anschließend gereinigt. Die Peptide die durch Thrombinstimulierung freigesetzt wurden (tPMPs) konnten nicht durch Säureextraktion isoliert werden und umgekehrt konnten die durch Säureextraktion freigesetzten Peptide (PMPs) nicht durch Thrombinaktivierung nachgewiesen werden.

Die PMPs und tPMPs unterscheiden sich in ihrer Struktur und wahrscheinlich auch in ihrer Funktion. So wird angenommen, dass spezifische Plättchenstimuli wie Trauma, lösliche Entzündungsmediatoren oder Mikroorganismen zur Sekretion spezifischer thrombozytärer antimikrobieller Peptide führen.

Azizi et alⁱ und Ramos et alⁱⁱ haben gezeigt, dass Mikroorganismen oder gereinigtes Staphylokokkotoxin die PMPs und tPMPs Freisetzung aus Thrombozyten stimulieren. In der *S.aureus* infektiösen Endokarditis wurden 10 x mehr Thrombocidin-resistente Stämme als Thrombocidin-sensitive Stämme isoliertⁱⁱⁱ.

Diese Beobachtungen unterstreichen die Feststellung, dass Plättchen, unter anderem durch die Freisetzung antimikrobieller Peptide, als Antwort auf Gewebsverletzungen und Bakterienbesiedlung eine wichtige Rolle in der Infektionsabwehr einnehmen.

1.4.4. Thrombozyten und Leukozyten interagieren synergistisch

Hämostasevorgänge und Immunabwehrreaktionen sind eng miteinander verbunden. Thrombozyten und Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) beeinflussen sich dabei gegenseitig in ihrer Funktion, indem sie über komplexe Interaktionen miteinander kommunizieren.

Dabei können sie sich gegenseitig aktivieren oder den Aktivierungszustand des anderen abschwächen, indem sie lösliche Mediatoren sezernieren^{liii liv}.

Aktivierte Thrombozyten setzen eine Vielzahl auf Monozyten und Neutrophile positiv chemotaktisch wirkende Moleküle frei. Unter diesen Molekülen sind der „platelet factor 4 (PF4)“, „platelet activating factor (PAF)“, „platelet-derived growth factor (PDGF)“ und die Eicosanoide. Beispielsweise führen subcutane Injektionen von PF-4 und PDGF zu einer raschen Infiltration von Neutrophilen bei Versuchstieren^{lv}.

Auf der anderen Seite stimulieren von Monozyten und Neutrophilen freigesetzte Moleküle wie Sauerstoffmetabolite und PAF Thrombozyten und fördern deren Sekretion.

Jungi et al. haben gezeigt, dass Thrombin aktivierte Thrombozyten an Monozyten und Neutrophile binden, während unaktivierte Thrombozyten dies nicht tun. Voraussetzung für einen „cross talk“ ist, dass mindestens einer der Bindungspartner aktiviert vorliegt.^{lvi}

Bei Entzündungsreaktionen ist die Wanderung der Leukozyten aus der Zirkulation durch das Endothel ein Schlüsselprozess, der durch Zelladhäsionsmoleküle und durch Zellaktivierungsprozesse reguliert wird^{lvii}. Monozyten und PMNL, die im Körper primär als Phagozyten fungieren, sind in der Lage aus dem Blutgefäß durch das Endothel zu wandern, um pathogene Organismen im entzündeten Gewebe zu beseitigen. Aktivierte Thrombozyten, adhären spezifisch am Endothel und stellen dabei einen idealen Kleber zum Einfangen von zirkulierenden Leukozyten dar und modulieren so deren Extravasation in entzündliches Gewebe^{lviii .lix}. Auf der anderen Seite werden an Leukozyten anhaftende Plättchen „huckepack“ von diesem durch aktiviertes Endothel extravaskulär mit in entzündetes Gewebe getragen und nehmen auch dort Einfluß auf die Funktion der Leukozyten^{lx}.

Heterotypische Assoziate zwischen Plättchen und Leukozyten wurden erstmals von Bizzozero(1882), dem Entdecker der Thrombozyten, beobachtet. Dieses Phänomen wird als „Plättchensatellismus“ bezeichnet^{lxi}.

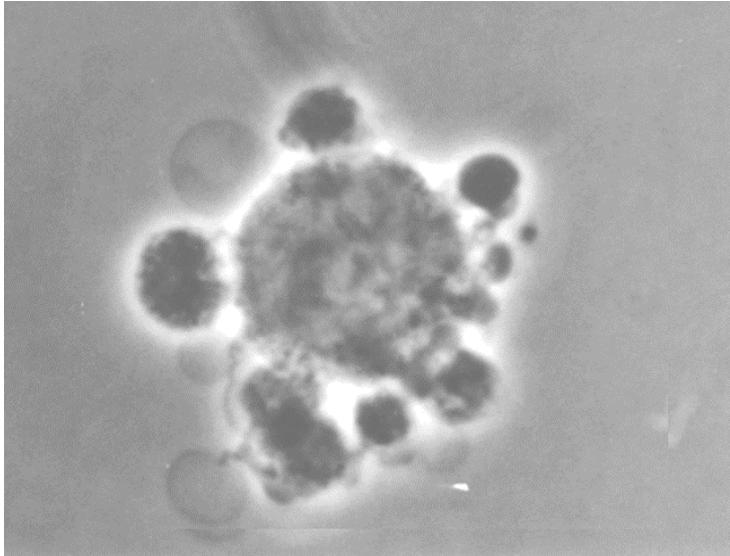


Abbildung 1-9 Lichtmikroskopisches Bild der Adhäsion von Thrombozyten an einen Monozyten (B. Kehrel). Im Zentrum befindet sich der Leukozyt, ringsherum sieht man die satellitenförmige Anheftung von Thrombozyten.

Die Interaktion findet direkt (Rezeptoren) und indirekt über Adhäsionsbrückenmoleküle statt. Ein wichtiger Glykoproteinrezeptor auf aktivierten Plättchen, der mit Leukozyten direkt interagiert, ist das P-Selektin (CD62P). Als primärer Leukozytenrezeptor fungiert der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), ein stark O-glykosyliertes Mucin, das auf Monozyten, PMNL und Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird^{lxix}.

Die bisher am intensivsten untersuchte indirekte Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten ist die Adhäsionsbrückenbildung mittels Fibrinogen.

Aktivierte Plättchen binden lösliches Fibrinogen über den Glykoproteinkomplex IIb-IIIa. Dieses Integrin macht ca.15% des gesamten Proteingehalts von Plättchen aus und spielt eine primäre Rolle bei der Blutstillung. Da aktivierte Monozyten und PMNL ebenfalls Fibrinogen über Integrine binden können, kommt es zu Brückenbildung und Adhäsion und Fibrinogen kann sogar von ruhenden Leukozyten gebunden werden^{lxiv}. GP IIB/IIIa kann außer Fibrinogen noch Adhäsionsmoleküle wie Fibronectin,

Vitronektin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin binden^{lxv}. Auch Thrombospondin-1 dient als Brückenmolekül zwischen Plättchen und Leukozyten^{lxvi}.

Nach erfolgreicher Rekrutierung potenzieren sie dann ihre antimikrobielle Funktion. So haben Christin et al beispielsweise gezeigt, dass Plättchen und Neutrophile in vitro synergistisch bei der Schädigung und Abtötung von *Aspergillus fumigatus* interagieren^{lxvii}. PF-4 steigert in vitro die fungizide Aktivität von Neutrophilen^{lxviii} und von Monozyten freigesetztes IL-6 induziert in Plättchen eine Zytotoxizität gegen *S.mansoni* Larven in vitro^{lxix}.

Aktiviert Plättchen steigern auch die Phagozytoserate von Salmonellen durch Makrophagen im Mausmodell^{lxx} und Serotonin, das von Plättchen freigesetzt wird, steigert die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen und deren Gewebemigration^{lxxi}.

Insgesamt unterstreichen diese Feststellungen, dass der Plättchen-Leukozyteninteraktion eine bedeutende Aufgabe bei der Infektionsabwehr zukommt.

1.5. Defensine

Defensine sind phylogenetisch alte antimikrobielle Peptide. Sie sind die effektiven Moleküle der innaten (angeborenen) Immunabwehr von Pflanzen, Insekten und Wirbeltieren (Lehrer R, Ganz T)^{lxxii}. Sie gehören wie die Thrombocidine zur Familie der CAMPs.

Es handelt sich bei den Defensinen um kleine, positiv geladene Peptide, mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen Mikroben, wie gram positive und gram negative Bakterien^{lxxiii lxxiv}, Pilze^{lxxv} und behüllte (nicht jedoch unbehüllte) Viren^{lxxvi lxxvii}. Unter speziellen Bedingungen, zeigen Defensine auch eine Zytotoxizität gegen eukaryotische Zellen (Lichtenstein et al.)^{lxxviii} und aktivieren unreife dendritische Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. Damit beeinflussen sie auch die adaptive Immunität über die nur Wirbeltiere verfügen (Zhang L, Biragyn A)^{lxxix}.

Defensine sind relativ argininreiche, nicht glycosylierte Peptide und haben eine molekulare Masse von 3-4 kDa. Mit 6 Cystein-Gruppen bilden sie drei charakteristische intramolekulare Cystein- Disulfidbrücken (Lehrer R, Ganz T)^{lxxx}.

Aufgrund ihrer Größe und 3D-Struktur, werden die Defensine in alpha, beta und 0 Subfamilien unterteilt:

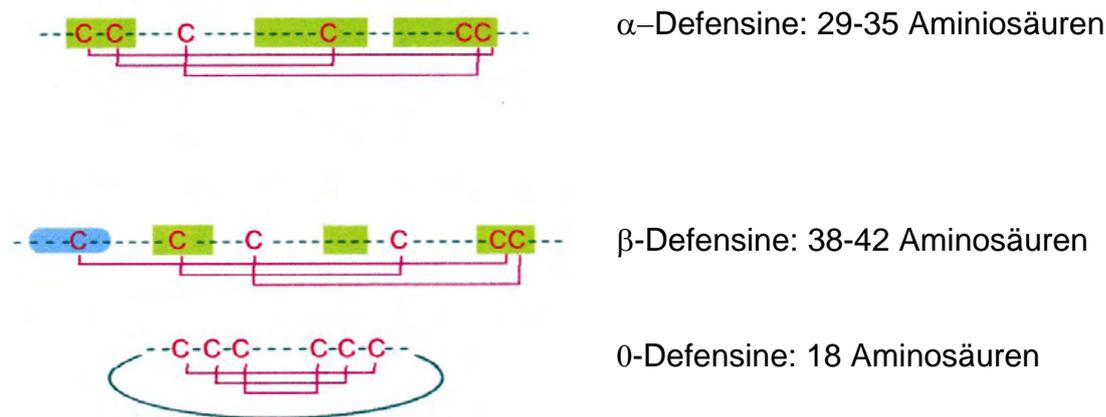


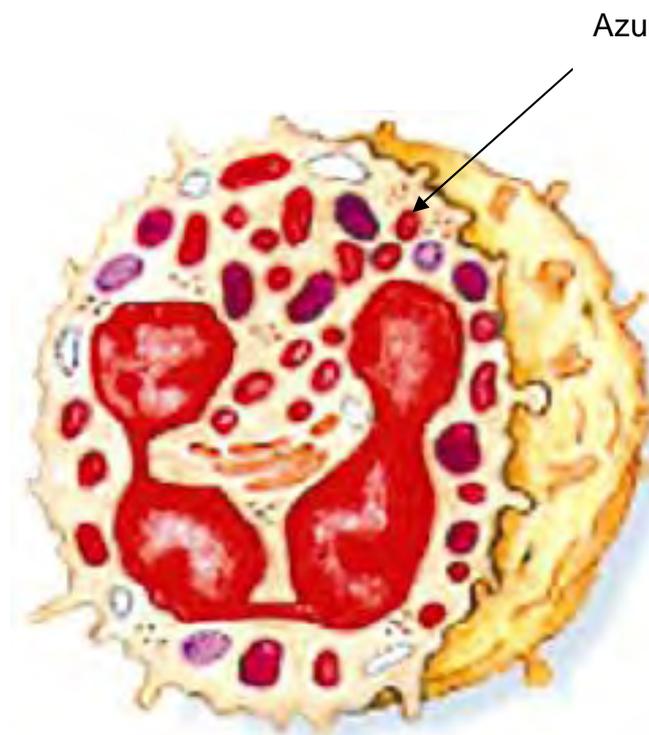
Abbildung 1-10: Die drei Defensinfamilien unterscheiden sich in Größe und Struktur. Die 6 Cystein-Gruppen sind unterschiedlich im jeweiligen Peptid verteilt und die drei charakteristischen intramolekularen Cystein Disulfidbrücken sind zwischen unterschiedlichen Cystein-Partnern positioniert. Die Disulfidbrücken sind durch einfache Linien gekennzeichnet.

1.5.1. Alpha Defensine

α -Defensine wurden Mitte der sechziger Jahre als kleine antimikrobielle Peptide in Kaninchen und Meerschweinchen Granulozyten entdeckt (Zeya HI, Spitznagel Jk 1966)^{lxxxii}. Erst über 20 Jahre später wurden sie sequenziert und es wurde gezeigt, dass sie prinzipielle Bestandteile der neutrophilen Granulozyten von Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen und Primaten sind, sowie von Paneth Zellen des Darms gebildet werden. In letzter Zeit wurden α -Defensine in vielen weiteren bislang nicht untersuchten Säugetieren wie Pferden^{lxxxiii}, Elephant, Gürteltier, Igel, Beutelratten,

entdeckt und sind von den ursprünglichsten Säugern bis zum Menschen zu isolieren^{lxxxiii}.

Die alpha Defensine bestehen aus 29-35 Aminosäuren. Ihre Disulfidbrücken liegen an Stelle 1-6, 2-4, 3-5. Bis jetzt sind sechs alpha –Defensine beim Menschen bekannt. Human neutrophil peptides 1-4 (HNP-1 bis HNP-4) sind normalerweise in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und machen mehr als 30 % des Proteingehalts der PMNL`s aus (Ganz T,Lehrer R)^{lxxxiv}.



Azurophile Granula

Abbildung 1-11: Schematische Darstellung eines neutrophilen Granulozyten. Die Defensine sind in den azurophilen Granula gespeichert.

HNP`s sind zum einen in das sauerstoffunabhängige intrazelluläre Töten von phagozytierten Mikroorganismen involviert, werden zum anderen aber auch während Entzündungsreaktionen in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt(Ganz T)^{lxxxv}. Gebunden an verschiedene Plasmaproteine können sie dann schließlich auch in die Blutzirkulation gelangen^{lxxxvi lxxxvii}.

Zhang et al zeigten, dass neben den Neutrophilen auch andere weiße Blutzellen wie CD8+T-Zellen von „long-term nonprogressor“ HIV Patienten alpha Defensin 1,2,3 und 4 nach Stimulation freisetzen können^{lxxxviii} und Rodriguez-Garcia et al entdeckten kürzlich, dass von immaturren Monozyten abstammende dendritische Zellen ebenfalls zur Produktion und Sekretion von alpha-Defensin 1-3 fähig sind^{lxxxix}.

Die beiden anderen alpha Defensine, HNP5 und 6 werden vornehmlich von spezialisierten, granulahaltigen, sekretorischen Epithelzellen des Dünndarms sog. Paneth Zellen gebildet und durch bakterielle oder cholinerge Stimuli freigesetzt^{xc}.

Die Gene der alpha Defensine liegen gemeinsam mit denen der beta Defensine in Klustern auf dem Chromosom 8p23 (Linzmeier, Ganz)^{xcii}. Das Gen für HNP2 konnte hier nicht gefunden werden und so wird angenommen, dass HNP2 ein proteolytisches Produkt von HNP 1 oder 3 ist. Alpha Defensine werden als Prepropeptide codiert und posttranslational proteolysiert. So wird Cryptidin, das intestinale alpha Defensin der Maus, durch die Matrixmetalloproteinase (MMP-7) proteolysiert und reguliert (Wilson et al)^{xcii}

1.5.2. Beta-Defensine

β -Defensine wurden 1991 zuerst von Rinderzungen isoliert^{xciii} und bisher in jedem Säuger nachgewiesen.

Aufgrund ihrer von den α -Defensinen abweichenden Disulfidbrückenformation (1-5, 2-4, 3-6) und Größe (36-42 Aminosäuren) wurden sie β -Defensine genannt. Rinder haben über 13 β -Defensine in ihren neutrophilen Granulozyten. In anderen Spezies werden β -Defensine jedoch vornehmlich von Epithelzellen verschiedener Organe (Epidermis, Bronchen, Urogenitaltract etc) gebildet und dienen so in der Berührungszone zwischen Körper und Umwelt der Erregerabwehr. Der Mensch produziert 2 β -defensine (HBD1 und HBD2)^{xciv}.

Epitheliale β -Defensine sind nicht in zytoplasmatischen Granula gespeichert und so ist ihre lokale Konzentration von ihrer Produktions- und Sekretionsrate abhängig. Diese wiederum wird durch Bakterien, bakterielle Produkte und TNF α stimuliert^{xcv}.

1.5.3. O-Defensine

Kürzlich wurde noch eine neue Klasse an Defensinen von Rhesus Affen Neutrophilen isoliert.

Aufgrund ihrer zirkulären Struktur wurden sie O-Defensine genannt. Sie werden durch Ligation von zwei alpha Defensinen gebildet^{xcvi}.

1.6. *Defensin-Aktivität*

1.6.1. Zytolytischer Effekt

Erregermembranen haben in ihrer Lipiddoppelschicht viele anionische Phospholipide und sind somit negativ geladen; zudem fehlt ihnen Cholesterin^{xcvii}. Sie üben damit eine starke elektrostatische Anziehung auf die kationischen Defensine aus und sind Ziel ihrer antimikrobiellen Aktivität.

Haben die Defensine die Erreger erreicht, permeabilisieren sie deren Zellmembran, wodurch diese ihre biologische Integrität verlieren und zugrunde gehen.

Diese Permeabilisierung wurde von Kagan et al an Lipiddoppelmembranen untersucht. Sie beobachteten eine Formierung von schwach anionenselektiven Kanälen^{xcviii} und zeigten, dass HNP-2 die Bildung multimerischer Poren in unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 25 Å initiiert.^{xcix}.

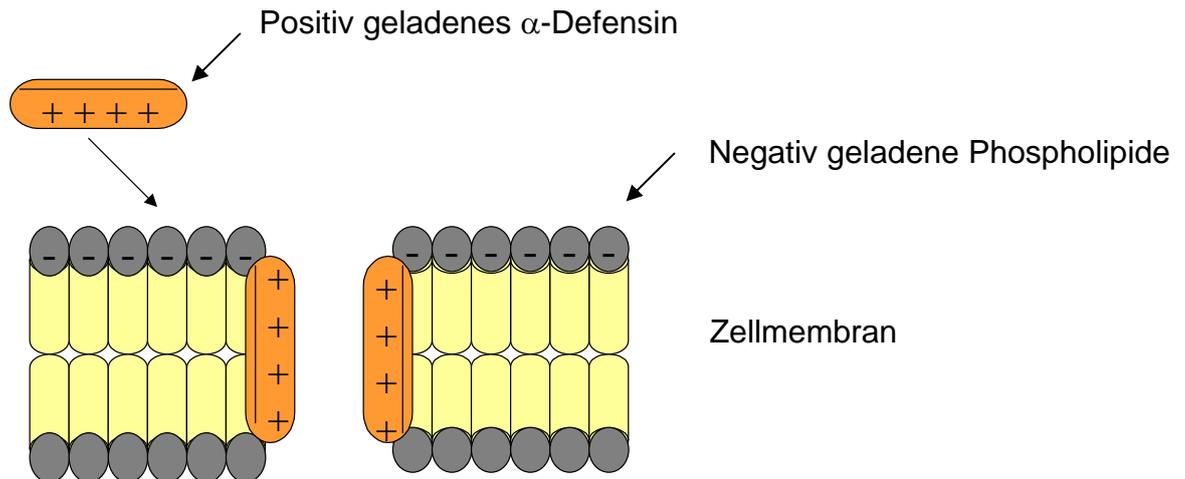


Abb.1-12 zeigt schematisch die elektrostatische Anziehung zwischen Defensinen und Erregermembranen. Haben die Defensine ihr Ziel erreicht, „bohren“ sie Löcher in die Lipiddoppelschicht, was den Tod der Erregerzelle nach sich zieht.

Eine Resistenzentwicklung der Mikroorganismen gegen Defensine ist mit Ausnahme einiger weniger Bakterienspezies trotz der langen Zeitspanne möglicher evolutionärer Entwicklungen nicht eingetreten. Dies liegt unter anderem daran, dass die Umstrukturierung des Angriffsziels der Defensine -also der Zellmembran- aus evolutionsbiologischer Sicht nur schwer umsetzbar ist. Außerdem sind die Defensine durch Ihre stabile und kompakte Struktur gut vor der Verdauung von mikrobiellen Proteasen geschützt ^c.

Die Zellmembranen von Säugetieren hingegen sind in der Regel gut gegen eine Lyse durch Defensine geschützt. Sie sind weniger negativ geladen und Defensine, die mittels Exozytose aus den Neutrophilen ins Blut freigesetzt werden, binden in der Regel an verschiedene Plasmaproteine und müssen zudem vor ihrer Aktivierung erst proteolysiert werden.

Nichts desto trotz konnte ein zytotoxischer Effekt von Defensinen auch gegen eukaryotische Zellen gezeigt werden: Lichtenstein et al demonstrierten eindrucksvoll die konzentrationsabhängige Lyse von Tumorzellen durch HNP 1-3^{ci}. Auch Monozyten werden durch hohe Defensin Konzentrationen 10^{-4} M lysiert, dagegen

steigern α -Defensine in niedrigeren Konzentrationen 10^{-8} oder 10^{-9} M deren TNF-alpha Produktion^{cii}.

1.6.2. Modulation der innaten und adaptiven Immunabwehr

Neben der direkten Erregerabwehr nehmen die Defensine auch indirekte Einflüsse auf die Immunabwehr. Sie steigern beispielsweise die Phagozytoserate von Makrophagen^{ciii}, dienen als Opsonine^{civ} und induzieren die Aktivierung und Degranulation von Mastzellen^{cvcvi}

Durch die Stimulierung proinflammatorischer Zytokine steigern sie die Rekrutierung von anderen Abwehrzellen^{cvii} und verstärken Entzündungsreaktionen^{cviii}. Die kompetitive Bindung einiger Defensine an adrenocorticotrophe Hormonrezeptoren bewirkt zusätzlich einen kortikostatischen und damit entzündungsverstärkenden Effekt^{cix}.

Insgesamt führt die Defensininteraktion also zu einer Steigerung der innaten Immunabwehr gegen die Invasion von Erregern.

In letzter Zeit wurde mehr und mehr bekannt, dass Defensine aber nicht nur maßgeblich an der innaten Immunabwehr beteiligt sind, sondern auch regulative Einflüsse auf das adaptive Immunsystem nehmen. So wurde beobachtet, dass HNP1 und 2 chemotktisch auf Gedächtnis-T-Zellen und unreife dendritische Zellen wirken^{cxci}. Biragyn zeigte, dass murines beta Defensin 2 neben seiner chemoattraktant Bindung an den CCR6 chemokine Rezeptor auch an TLR4 bindet und dendritische Zellen zur Maturität bringt^{cxii}.

Wurde murines β -defensin an nichtimmunogenes Tumorantigen gekoppelt, konnte eine potente zellvermittelte Immunantwort und antitumorale Aktivität in Mäusen beobachtet werden^{cxiii}. Der Zusatz von HNP1-3 zu Ovalbumin (OVA) bei intranasaler Applikation steigert die Produktion von OVA-spezifischem Serum IgG^{cxiv}. Defensine beeinflussen folglich auch die zelluläre und humorale Lymphozytenaktivität.

1.6.3. Pathophysiologie

Die Blutgerinnung ist mit dem Abwehrsystem eng verzahnt und so sind viele Erkrankungen, die durch Entzündungsreaktion entstehen, Folge thromboembolischer Ereignisse.

Durch überschießende Immunreaktionen auf eindringende Pathogene kommt es zu hämodynamischen Veränderungen im Blut, wie es anhand der Meningokokkensepsis im Tiermodell beobachtet wurde^{cxv}.

Für diese hämodynamischen Veränderungen spielt die Interaktion von Gerinnungs- und Immunzellen eine bedeutende Rolle. Ein erhöhter Anteil an Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten wurde bei Patienten mit Sepsis, schwerem Trauma^{cxvi}, Asthma,^{cxvii}, Diabetes mellitus^{cxviii}, Schlaganfall^{cxix} und Herzinfarkt^{cxx} gefunden. Zudem beinhalten Bronchiallavagen von Patienten mit ARDS Thrombozyteninhaltsstoffe, was die aktive Beteiligung von Plättchen bei Lungentraumata zeigt^{cxxi}.

Gawaz et al beobachteten, dass Thrombozyten in der Sepsis aktiviert werden und beim Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom zusätzlich die zirkulierende Plättchen-Neutrophile-Makroaggregate erhöht sind^{cxxii}.

Entzündung und Hämostase sind auch für die Pathogenese vieler vaskulärer Erkrankungen verantwortlich. Im Fall einer entzündlichen Veränderung kann nämlich TF auch auf aktivierten Endothelzellen oder auf Monozyten exprimiert werden. Dann kann auf diesen Zellen durch den TF-VIIa –Komplex der Faktor X aktiviert werden und Plättchen lagern sich an aktivierte Endothelzellen bzw. Monozyten an. So kann auch ohne dass eine Gefäßwand morphologisch sichtbar beschädigt wird, durch das Zusammenspiel von aktivierten Endothelzellen, aktivierten Monozyten und aktivierten Blutplättchen eine Thrombusbildung hervorgerufen werden^{cxxiii}.

Auch die α -Defensine sind ein Bindeglied im Wechselspiel von Entzündungen und thrombotischen Ereignissen. Auf der Basis ihrer in vitro Aktivität und ihrer Rolle bei der innate Immunabwehr haben Defensine als antimikrobielle Peptide nicht nur eine direkte antimikrobielle Aktivität, sondern dienen auch als Entzündungsmediatoren. Sie werden während Entzündungsreaktionen in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt und verursachen Schäden am Endothel^{cxxiv}. Erhöhte α -Defensin-Level wurden im

Plasma und anderen Körperflüssigkeiten von Patienten mit Infektionen, Sepsis, bakterieller Meningitis und vielen weiteren Neutrophil dominierenden entzündlichen Funktionsstörungen wie ARDS, COPD, Asthma und Lungenfibrose ermittelt^{cxxv}.^{cxxvi}.

Bei Sepsispatienten wurden zu Beginn der Erkrankung im Plasma Defensin-Level von 900ng/ml-17.000ng/ml gemessen während gesunde Probanden im Durchschnitt 53ng/ml aufweisen^{cxxvii}.

Während all dieser pathologischen Prozesse nehmen Thrombozyten, Leukozyten und Defensine nicht mehr Ihre Schlüsselrolle in der Körperverteidigung wahr, sondern schädigen das Gewebe, welches sie eigentlich beschützen sollen.

1.7. Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

Im Rahmen der Einleitung wurde der Hintergrund der wissenschaftlichen Fragestellung dargestellt.

Von der Vielzahl der Mediatoren und Aggonisten, die bei der Hämostase vor allem im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen, soll in dieser Arbeit die funktionelle Beteiligung der α -Defensine auf die Thrombozytenfunktion bei Mensch und Tier näher analysiert werden.

Dies bezieht sich auf die Mechanismen der Thrombozytenaktivierung und Sekretion, sowie auf die Interaktion mit Leukozyten, dem Endothel und verschiedenen Plasmaproteinen.

A Charakterisierung der Thrombozyten und Neutrophilen Interaktion bei der Immunabwehr und der Hämostase.

Welchen Effekt haben α -Defensine, die von Neutrophilen bei Entzündungsreaktionen freigesetzt werden, in Konzentrationen wie sie im Plasma von Sepsis Patienten gefunden wurden, auf die Thrombozytenfunktionen und das Endothel?

B Bedeutung bestimmter Proteine

Sind bestimmte Plasmaproteine fähig die Aktivierung der Hämostase durch α -Defensine zu beeinflussen oder gar zu hemmen?

Ergeben sich Hinweise auf mögliche Aktivierungsmechanismen?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

2.1.1. Durchflusszytometer

Durchflusszytometer/FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)

Computersystem/HP9000 (Hewlett Packard, Böblingen)

Computersystem/PowerMac7600/132 (Apple, USA)

Steuer- und Auswerteprogramm/FACScan und CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg)

2.1.2. ELISA-Reader

Photometer/MRX (Dynatech, Denkendorf)

2.1.3. Zentrifugen

Zentrifuge/Avanti J, HP-30i (Beckmann, München)

Zentrifuge/B4i (Jouan, Frankreich)

Zentrifuge/3K1 (Sigma, Osterode)

2.1.4. Weitere Geräte

Analysenwaage/AE50 (Mettler-Toledo, Schweiz)

Eismaschine/Scotsman AF10 (Fisher Scientific, Nidderau)

Folienschweißgerät/Polystar 234 (Waldeck, Münster)

PH-Meter/STH600 (WTB, Weilheim)

Photometer/4060 (Biochrom, USA)

Photometer (Eppendorf, Hamburg)

Waage/2355 (Sartorius, Göttingen)

Wasseraufbereitungsanlage/Elix10 und Milli-Q-biocel (Millipore, Eschborn)

Zellzählgerät/System 9000 (Serono Baker Diagnostics, USA)

2.2. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Bio-Rad (München), Calbiochem (Bad Soden), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), ICN (Meckenheim), Loxo (Dossenheim), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Protein Sciences (Meriden, USA), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen). American peptide(California,USA).

2.2.1. Antikörper

Antigen	Spezifität	<u>m</u> onoklonal/ <u>p</u> olyklonal (Spezies)	Klon-Name	Konjugation	Bezugsquelle
CD42a-Fitc	human	m-Maus	Beb 1	PerCP	Becton Dicinson, Heidelberg
CD40L	human	m-Maus		PE	Calbiochem Schwalbach
Tissue Faktor	human	m. Maus	4508CJ	FITC	american diagnostic, Dossenheim
CD14-PE	Huma	m-Maus	MP9	FITC	Becton Dicinson Heidelberg
Thrombo	human	m-Maus	P10	PE	Immotech Hamburg
Spondin1					Hamburg
CD62P	human	m. Maus	CLB-thromb/6	FITC PE	Immunotech, Hamburg
CD63	human	m. Maus	CLB-gran/12	FITC	Immunotech, Hamburg

2.3. Präparation von Thrombozyten und Monozyten

Freiwilligen Probanden wurde mit Hilfe eines „Butterfly“-21G-Venenpunktionsbestecks (Venofix/Braun, Melsungen) venöses Blut abgenommen. Als Antikoagulanzen wurde 110 nM Natrium-Citrat (1:10) verwendet.

Um größere Mengen an Blutzellen zu gewinnen, wurden frische Vollblutkonserven, die nach der Entfernung der Erythrozyten mit Leukozyten und Thrombozyten angereichert waren („buffy coats“), vom Deutschen Roten Kreuz, Münster, zur Verfügung gestellt.

2.3.1. Isolierung von Thrombozyten durch Gewinnung von Plättchenreichem Plasma (PRP)

Das antikoagulierte Vollblut wurde bei Raumtemperatur für 10 min bei 190 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Plättchen-reiche Plasmaüberstand wurde vom Leukozyten- und Erythrozytenrückstand abpipettiert.

2.3.2. Isolierung von Thrombozyten mittels Gelfiltration.

Eine silikonisierte Glassäule ($V = 300$ ml) wurde mit in 154 mM NaCl Lösung gewaschener Sepharose 2B (Pharmacia, Freiburg) luftblasenfrei gefüllt. Das Säulenmaterial wurde mit HEPES-Tyrode-Puffer äquilibriert. Aus ca. 20-40 ml Citrat-Vollblut gewonnenes PRP wurde auf die so vorbereitete Säule aufgetragen und eluiert. Aufgrund der Größe konnten die Thrombozyten als trübes Zelleluat vor den Plasmaproteinen fraktioniert aufgefangen werden. Die Gelfiltration bietet so eine schonende Trennung der Plättchen von Plasmaproteinen (Timmons und Hawiger, 1989^{cxviii})



Abbildung 2-1:

In einer silikonisierten Glassäule, die mit Sepharose gefüllt wurde, wurden die Thrombozyten mittels „Gelfiltration“ von den Plasmaproteinen getrennt.

Es wurde PRP aufgetragen. Die Plättchen passagierten das Gel schneller als die Plasmaproteine und wurden als trübes Zelleuat aufgefangen während die Plasmaproteine noch durch das Gel wanderten. Die so gewonnene reine Plättchenfraktion konnte nun für weitere Versuche genutzt werden.

Eine Entfernung von Plättchen-adhäsivem vWF ist mit der Gelfiltration, bedingt durch die Plättchenschерung am Säulenmaterial nicht möglich. Die Reinigung des Säulenmaterials erfolgte mit 154 mM NaCl (0,02 % (w/v) Natriumazid).

Zur vollständigen Regeneration wurde das Säulenmaterial dann mit 0,1 M NaOH und anschließend mit 3 % Wasserstoffperoxid behandelt. Äquibriert wurde mit 154 mM NaCl.

Lösungen:

Hepes/Tyrode-Puffer	Natriumchlorid	154 mM
pH 7,4	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumdihydrogen- phosphat	0,42 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM
	Hepes	5 mM
	Natriumhydrogencarbonat	12 mM
	BSA	0,35 %

2.3.3. Herstellung von Plättchen-armen Plasma(PPP)

Citrat-Vollblut oder PRP wurden für 15 min mit 1500 g bei 20 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand ist das Plättchen-arme Plasma

2.3.4. Isolierung der Leukozyten

Blutzellen unterscheiden sich in ihrer Größe und Dichte. Diese Zelleigenschaften werden für die Trennung von verschiedenen Blutzellen durch Zentrifugation ausgenutzt. Dazu werden Buffy Coats auf Medien aus Silikat-Partikeln (Dichtemedium Percoll /Pharmacia, Freiburg) mit einer definierten Viskosität aufgetragen. Durch die Zentrifugalkraft sedimentieren die Zellen gemäß ihrer Größe und Dichte unterschiedlich weit. Erreichen sie die gleiche Dichte des umgebenden Mediums, ist die Sedimentationsrate gleich null und die Zellen konzentrieren sich im entsprechendem Dichtegradientenbereich^{cxix}.

Die weitere Aufreinigung der so isolierten Leukozytenfraktion wurde nach dem Elutriationsverfahren mit einem speziellen Elutriator-Rotor mit angeschlossenem Schlauchsystem, einer Pumpe, sowie einer Stroboskop-Lampeneinrichtung durchgeführt.

Die zu trennende Zellsuspension wird dabei mit einer Pumpe in die Elutionskammer des Elutriator-Rotors bei konstanter Rotorgeschwindigkeit transportiert. Die Fließkraft des Zellsuspensionsstroms, die durch die Pumpe erzeugt wurde, und die Zentrifugalkraft in der Elutionskammer sind dabei entgegengesetzt. Bei der Anreicherung der Zellen in der Elutionskammer ist die Zentrifugalkraft größer als die Elutionsgeschwindigkeit, so verbleiben sämtliche Zellen gemäß ihrer Größe und Dichte in bestimmten Zonen innerhalb der Kammer und werden konzentriert. Überwiegt die Geschwindigkeit der durch die Pumpe erzeugten Fließkraft, werden die ersten Zellen, die am nächsten an der Ausflussöffnung liegen, eluiert. Mit kontinuierlicher Erhöhung der Pumpengeschwindigkeit werden die Zellen mit zunehmender Größe und Dichte eluiert.

Die Elutriatorgeschwindigkeit betrug 1950 rpm bei 18°C mit einer Anfangspumpengeschwindigkeit von 7 ml/min. Die Zellen wurden bei nicht laufender Pumpe injiziert und anschließend mit 60 ml Hank`s-Puffer bei einer Flussrate von 7 ml/min äquilibriert. Die Pumpengeschwindigkeit wurde auf 10 ml/min erhöht. Nach Verwerfung von 150 ml wurde die Pumpengeschwindigkeit kontinuierlich erhöht. Jeweils 150 ml Zellsuspension, aufgeteilt in drei Fraktionen, wurden bei Flussraten von 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 15 und 21 ml eluiert.

Die Fraktionen wurden bei 200 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, die Zellen mit je 5 ml Hank`s-Puffer resuspendiert und die Leukozytenverteilung im Durchflusszytometer quantitativ ermittelt. Die Fraktionen mit den reinsten Monozytenpopulationen wurden vereinigt, für 10 min bei 220 g bei 4°C zentrifugiert und, je nach Versuchsbedingung, im geeigneten Puffer resuspendiert.

Lösungen:

Phosphat	Natriumchlorid	137 mM
gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Kaliumchlorid	2,6 mM
pH 7,4	Natriumdihydrogenphosphat	8 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,4 mM

Hank`s-Puffer

pH 7,4

Zusatz:	BSA	0,5 % (w/v)
---------	-----	-------------

2.3.5. Zellzählung

Mit Hilfe eines Zellzählers (Serono, U.S.A.) wurde die Thrombozyten und Leukozytenkonzentration im Präparat ermittelt. Es wurden 40 µl der Zellpräparation in 10ml „Rinse“-Puffer verdünnt. Durch die unterschiedliche Leitfähigkeit der verschiedenen Zelltypen im Puffer erfolgt eine Zelldifferenzierung. Die Konzentration wurde als Anzahl der Zellen pro µl bestimmt.

2.4. Zellaktivierung

Thrombozyten und Leukozyten wurden mit unterschiedlichen Agonisten für die durchflusszytometrische Bestimmung stimuliert.

2.4.1. Defensin

Humane α -Defensine 1-3 bestehen aus 29-35 Aminosäuren. Sie sind anionische Peptide, denen eine entscheidende Rolle bei der innate Immunabwehr zukommt.

α -Defensine (Sigma; Deisenhofen/American Peptide; California) wurden in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 30 µg/ml vorgelegt. Die Thrombozytensuspension wurde auf 25000/µl (gelfiltrierte Plättchen oder PRP) eingestellt und 100 µl von dieser Suspension hinzu gegeben. Nach 15 minütiger Aktivierungszeit wurden 500 µl HEPES-Tyrode Puffer zugesetzt und die Proben im Durchflusszytometer gemessen.

Lösungen:

Peptid-Stammlösung	HNP 1-3 in aqua dest	200µM
Hepes/Tyrode-Puffer pH 7,4	Natriumchlorid	154 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumdihydrogen- phosphat	0,42 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM
	Hepes	5 mM
	Natriumhydrogencarbonat	12 mM
	BSA	0,35 %

2.4.2. Thrombin

Thrombin spielt bei der Thrombozytenaktivierung eine entscheidende Rolle. Es wird aus Prothrombin durch den Prothrombinasekomplex (Komplex aus Faktor II, Faktor Xa, Faktor Va) gespalten und ist die wichtigste aller Thrombozytenproteasen.

Um bei Thrombinaktivierungen die Aneinanderlagerung einzelner Fibrinmoleküle zu verhindern, die zu einer Fibrinpolymerisation und somit zur Gerinnungsbildung führen würde, wurden 1,25 mM des Peptids GPRP mit den Thrombozyten vorinkubiert, welches die Fibrinpolymerisation inhibierte.

α -Thrombin (aus dem Rind, SIGMA, Deisenhofen) wurde für 3 Minuten bei gefilterten Plättchen oder PRP in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 2 U/ml vorgelegt. Von der Thrombozytensuspension (25000/ μ l) wurde ein Ansatzvolumen von 100 μ l zugesetzt und nach der dreiminütigen Aktivierungszeit wurden die Proben mit 50 μ l Formaldehyd fixiert. Nach Zugabe von 500 μ l PBS wurden die Proben gemessen.

Lösungen:

Thrombin-Stammlösung	α -Thrombin in 154 mM NaCl	100 U/ml
GPRP-Stammlösung	GPRP in 154 mM NaCl	125 mM
Formaldehyd-Lösung	Formaldehyd in PBS, 7,4	pH 1%(v/v)
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,8	Natriumchlorid s.Kap 2.3.4 Kalit Natriumdihydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat	137 mM 2,6 mM 8 mM 1,4 mM

2.4.3. Kollagen

Ein anderes Protein, das Plättchen aktiviert, ist methyliertes Kollagen Typ I, welches in unserem Labor nach Rauterberg et al 1968^{xxxx} hergestellt wurde.

100 μ l PRP oder gefilterte Plättchen (25000/ μ l) wurden mit methyliertem Typ I Kollagen für 5 Minuten im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2 μ g/ml aktiviert. Die Aktivierung wurde mit 50 μ l Formaldehyd gestoppt und nach Zugabe von 500 μ l PBS Puffer gemessen.

Lösungen:

Kollagen-Stammlösung methyliertes Kollagen Typ I 200 µg/ml
in 154 mM NaCl
und 0,05 % Essigsäure

PBS s.Kapitel 2.3.4

pH 7,4

Formaldehyd-Lösung Formaldehyd in PBS, pH 1%(v/v)
7,4

2.4.4. ADP

Auch Adenosindiphosphat ist ein milder Plättchenaktivator. Die Aktivierungszeit betrug 3 Minuten. PRP oder gelfiltrierte Plättchen wurden auf 25000/µl eingestellt und in einem Ansatzvolumen von 100 µl dem ADP (in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 µM) zugesetzt. Die Reaktion wurde ebenfalls mit Formaldehyd gestoppt und die Proben mit 500µl PBS-Puffer zur Messung im Durchflusszytometer vorbereitet.

Lösungen:

ADP-Stammlösung ADP 1 mM
in 154 mM NaCl

PBS s.Kapitel 2.3.4.

pH 7,4

Formaldehyd s.Kapitel 2.4.2

2.4.5. C-terminales TSP-1-Peptid RFYVVMWK

Das C-terminale TSP-1-Peptid RFYVVMWK aktiviert sowohl Thrombozyten (Chung et al. 1997^{cxxxix}, Dorahy et al. 1996^{cxxxii}), als auch Monozyten. 100µl PRP oder gelfiltrierte Plättchen wurden mit dem Peptid in einem Konzentrationsbereich von 12,5 bis 150

μM für 3 Minuten aktiviert. Nach Zugabe von 500 μl HEPES-Tyrode Puffer wurde ohne Fixation gemessen.

Lösungen:

Peptid-Stammlösung	RFYVVMWK	3 mM
	in 154 mM NaCl	
HEPES-Tyrode-Puffer	pH s.Kapitel 2.4.1.	
	7,4	

2.5. Detektion von Plättchenaktivierung

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann die Aktivierung von Thrombozyten ex vivo und in vitro qualitativ und quantitativ bestimmt werden.



Abbildung 2-2: Die Durchflußzytometrie wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung von aktivierungsabhängigen Funktionsparametern auf Thrombozyten angewandt. Der FACScan von Becton Dickinson (Heidelberg) ist mit einem Argonlaser ausgestattet und ermittelt die optischen Eigenschaften einzelner Zellen und Partikel.

2.5.1. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode, mit der man optische Eigenschaften einzelner Zellen und Partikel untersuchen kann, während diese hintereinander durch eine dünne Messkammer fließen und dabei von einem Laserlicht angestrahlt werden.

Vorher wird die zu untersuchende monodisperse Partikel- oder Zellsuspension aus einem Probenröhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette transportiert.

Die die Zellen umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt die Zellen so stark, dass sie aufgetrennt werden und aneinandergereiht, Zelle für Zelle am Laserstrahl vorbeigeführt werden (hydrodynamische Fokussierung).

Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Innern sind, desto größer ist das entstehende Streulicht.

Das Streulicht wird zum einen fast ($3-15^\circ$) in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und zum anderen etwa im 90° Winkel (Seitwärtsstreulicht) von Photodioden gemessen.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC-Signal) hängt vor allem von der Größe der Zelle ab. Kleine Zellen verursachen ein kleines FSC-Signal, große Zellen ein großes.

Das Seitwärtsstreulicht (SSC-Signal) hängt neben der Größe sehr stark vom Inhalt der Zelle ab. Zellen mit geringer Granularität erzeugen ein kleines SSC-Signal, Zellen mit hoher Granularität ein großes.

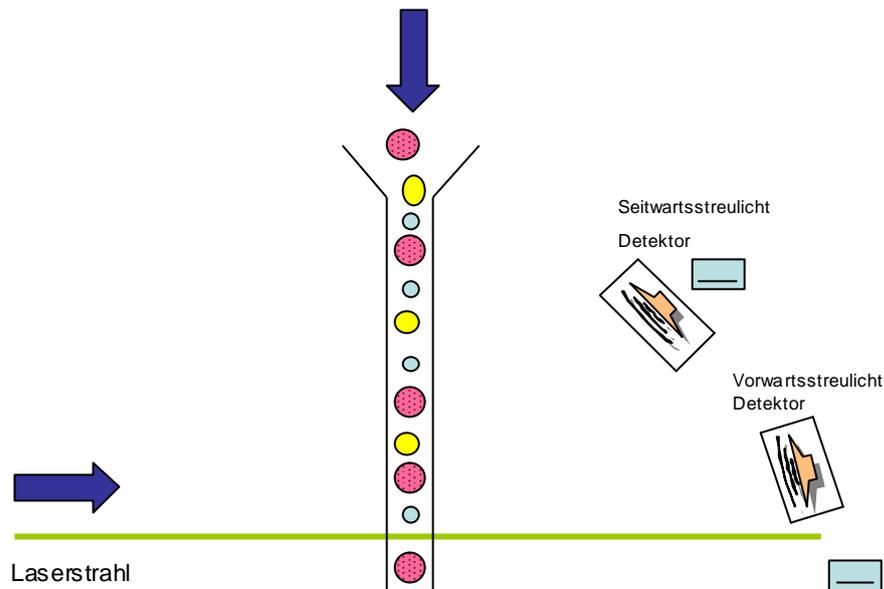


Abbildung 2-3: Solange der Laserstrahl ungehindert durch die Flusszelle geht, entsteht kein Streulicht. Quert hingegen eine Zelle den Strahl, so wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Kleine Zellen verursachen ein kleines FSC-Signal, große Zellen ein großes. Das Seitwärtsstreulicht (SSC-Signal) hängt neben der Größe sehr stark vom Inhalt der Zelle ab. Zellen mit geringer Granularität erzeugen ein kleines SSC-Signal, Zellen mit hoher Granularität ein großes Seitwärtsstreulicht.

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflußzytometer ist in der Lage, die Signale sowohl im linearen als auch im logarithmischen Modus zu verstärken.

Kleine Zellen, z.B. Thrombozyten, werden im logarithmischen Modus gemessen, da für die optimale Auflösung der erfassten Zellpopulation die schwachen Signale (entsprechend kleine Zellen) gespreizt und starke Signale komprimiert werden.

Leukozyten werden aufgrund ihrer Größe im linearen FSC- bzw. SSC-Modus gemessen, da hier die stärkeren Signale (entsprechend größere Zellen) gespreizt und somit besser aufgelöst werden.

Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einem Punktehistogramm, dem sog. Dot-Plot, dargestellt. Dabei wird auf der x-Achse das Vorwärts auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen.

Neben dem Streulicht kann das Durchflußzytometer auch Fluoreszenzlicht messen und erlaubt dadurch, eine Vielzahl weiterer Merkmale von Zellen zu untersuchen.

Dazu werden Zellantigene z.B. mit geeigneten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Die Fluorochrome absorbieren das Anregungslicht des Lasers und emittieren ihrerseits dann Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge.

Dieses wird durch entsprechende Filter geleitet, in Photomultiplier-Röhren fokussiert, elektronisch verstärkt und vom zugehörigen Fluoreszenzdetektor erfasst.

Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Für die Detektion der Immunfluoreszenz wird immer die logarithmische Verstärkung gewählt, da sie den dynamischen Messbereich so vergrößert, dass sowohl schwache als auch starke Signale mit derselben Skalierung erfasst werden können.

Der in dieser Arbeit verwendete FACScan von Becton Dickinson (Heidelberg) ist mit einem Argonlaser ausgestattet, dessen Hauptlinie bei 488 nm eine angemessene Quelle monochromatisch blaues Licht bildet und somit für die Anregung gängiger Fluorochrome, wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll (PerCP) und Propidium-Jodid (PI) geeignet ist.

Es existieren vier Filter: für FITC-Konjugate ein 530/30-BP-Filter, für PE-Konjugate ein 585/45 –BP-Filter und für PerCP-Konjugate bzw. für PI-Markierungen ein 620/LP-Filter. Überlappende Signale werden durch elektronische Signal-Kompensation voneinander subtrahiert. Wie bei den Streulichtsignalen stellt man auch die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung in einem „Dot-Plot“ dar.

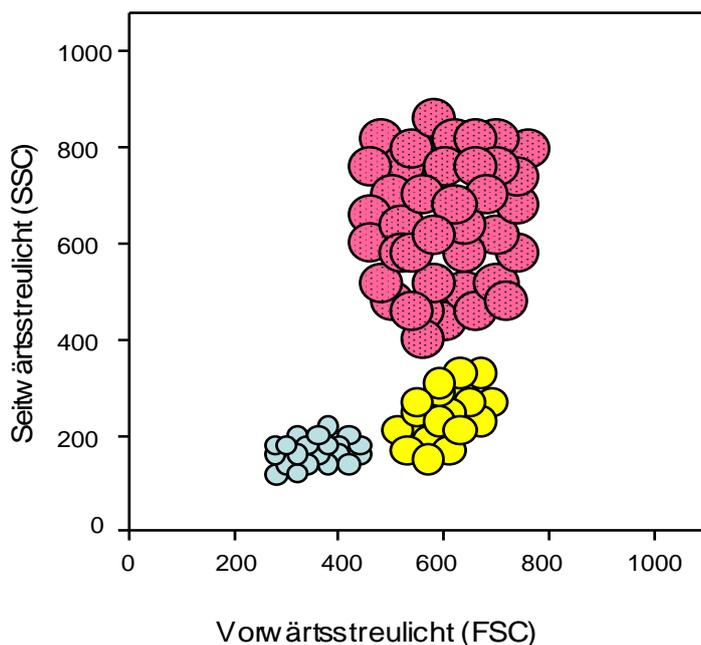


Abbildung 2-3: Streulicht-Dot-Plot. Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einer Graphik dargestellt. Die Zellen werden nach ihrem Vorwärts (x-Achse) und Seitwärtsstreulicht (Y-Achse) im Diagramm aufgetragen. Partikel mit ähnlichen Streulichteigenschaften häufen sich im gleichen Bereich an. Kleine Zellen mit wenig Granula (blau) sammeln sich im niedrigen Vorwärts und Seitwärtsstreulicht Bereich an, während große Zellen mit viel Granula im oberen Bereich beider Streulichteigenschaften liegen (rosa).

Während und nach der Messung kann mit Hilfe eines „Gating“ die interessierende Zellpopulation von den anderen Zellen separiert betrachtet und ausgewertet werden.

Für die statistische Auswertung wird je nach Parametercharakteristik entweder der Median der Signalintensität oder die Anzahl der Ereignisse als relative Prozentanteile bestimmt.

Der Median entspricht dabei der Verteilungsklasse, bei der 50% der Werteverteilung darüber und 50% darunter liegen. Er gibt eine gute Abschätzung des Signalwertes der Hauptpopulation von Zellen, da er von „Ausreißern“, wie beispielsweise fragmentierte Zellen oder Zellaggregate am wenigsten beeinflusst wird.

Der prozentuale Anteil von selektierten Ereignissen innerhalb einer Zellpopulation wird dann als Auswertekriterium herangezogen, wenn sich die Zellpopulation bezüglich eines Funktionsparameters nicht homogen verhält.

2.5.2. Nachweis der Plättchenaktivierung

Die Durchflußzytometrie wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung von aktivierungsabhängigen Funktionsparametern auf Thrombozyten angewandt.

Dabei werden vorwiegend Veränderungen von Membranglykoproteinen direkt und indirekt detektiert.

Aktivierungsabhängig wird somit ein Zuwachs oder eine Abnahme der Bindung von spezifischen Antikörpern oder Adhäsionsmolekülen auf der Plättchenoberfläche bestimmt und als Median der mittleren Fluoreszenzintensität angegeben^{cxxxiii}.

2.5.3. Fibrinogenbindung

Die Bindung von Fibrinogen stellt eine Schlüsselreaktion der Plättchenaggregation dar. Der Hauptrezeptor für Fibrinogen ist der GPIIb/IIIa-Komplex. Die aktivierungsabhängige Bindung von Fibrinogen an diesen Komplex kann entweder durch Antikörper gegen gebundenes Fibrinogen gemessen werden, oder es wird externes Fibrinogen zugesetzt, welches mit Fluorochrom gekoppelt ist und so dessen Anbindung detektiert werden kann.

Der Vorteil der zweiten Methode liegt darin, dass dieses externe Fibrinogen mit mehreren Fluorochrom-Molekülen markiert werden kann und es so zu einer Signalverstärkung mit hoher Sensitivität kommt .

Die Bindung des FITC an Fibrinogen wurde nach der Methode von Xia et al (1996)^{cxxxiv} durchgeführt.

10 mg humanes, lyophilisiertes Fibrinogen (Kordia, Niederlande) wurde in 5 ml Kopplungspuffer gelöst und mit 5 mg FITC (Fluorisothiocyanat) an Celite (Calbiochem, Bad Soden) versetzt. Die Suspension wurde 24 h bei 4°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Die nicht gelösten Reagenzien wurden bei 13.000 g für 10 min bei 20°C abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde das mit FITC-konjugierte Fibrinogen von Celite-gebundenem FITC abgetrennt.

Die Proteinlösung wurde bei 280 nm und 495 nm photometrisch gemessen und das FITC-Protein-Verhältnis nach (nach Peters und Baumgarten, 1990)^{CXXXV} bestimmt.

$$F/P \text{ (molar)} = OD_{495} \times \varepsilon \text{ (Fibrinogen)} \times MG \text{ (Fibrinogen)} /$$

$$\varepsilon \text{ (FITC)} \times MG \text{ (FITC)} \times (OD_{280} - 0,35 \times OD_{495})$$

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

$$MG \text{ (Fibrinogen)} \quad 333 \text{ kDa}$$

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

$$\varepsilon \text{ (Fibrinogen)} \quad = OD_{280} - (0,35 \times OD_{495}) / \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}$$

$$\varepsilon \text{ (FITC)} \quad = 200$$

Dabei erhielt man durchschnittlich eine Konjugation von 5 bis 7 FITC-Molekülen an ein Fibrinogen-Molekül.

Diese Fibrinogen–FITC–Lösung wurde vor der Plättchenaktivierung in einer Endkonzentration von 150 µg/ml den gefilterten Plättchen bzw. dem eingestellten PRP zugsetzt und für ca 10 min mit den Plättchen bei RT vorinkubiert.

Nach entsprechender Aktivierung und ggf Fixierung mit anschließendem zweimaligem Waschen der Plättchen wurden die Proben durchflußzytometrisch analysiert.

Lösungen:

PBS-Puffer pH7,4	NaCl	0,137M
	KCL	0,0026M
	Na ₂ HPO ₄	0,008M
	KH ₂ PO ₄	0,0014M
Hepes/Tyrode-Puffer pH 7,4	NaCl	0,14M
	KCL	0,0027M
	NaH ₂ PO ₄	0,012M
	D(+)-Glukose	0,0055M
	Hepes	0,005M
Kopplungspuffer: pH 7,8	PBS-Puffer	4,5 ml
	Natriumcarbonat-Lösung	24 µl
	Natriumcitrat-Lösung	0,5 ml
Natriumcarbonat-Lösung	Na ₂ CO ₃	5 % (w/v)
Natriumcitrat-Lösung	Na ₃ -Citrat	110 mM

2.5.4. α -Granula-Sekretion

Auch die Sekretion von Granulaproteinen ist ein Marker für die Aktivierung von Thrombozyten. Die Expression von P-Selektin (CD62P), einem Membranprotein der α -Granula, auf die Oberfläche, wurde mit einem FITC-konjugierten, monoklonalen anti CD62P Antikörper durchflusszytometrisch quantifiziert. Zu aktivierten Thrombozyten (100 µl Ansatz) wurde der Klon CLB/thromb/6 in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben, für 1 h bei 20°C inkubiert und nach erneutem Waschen die Anbindung des Antikörpers im Durchflusszytometer bestimmt.

2.5.5. Sekretion der elektronendichten Granula (Dense-bodies), CD63-Expression

Werden Thrombozyten stark genug aktiviert, verschmilzt die Membran der elektronendichten Granula mit der Plättchenoberflächenmembran, und CD63, Granulophysin, wird auf die Thrombozytenoberfläche exprimiert. Je stärker Thrombozyten aktiviert werden, desto größer ist die Menge an exprimiertem CD63. Mit Hilfe des FITC-konjugierten, monoklonalen anti CD63 Antikörpers (Klon CLB/gran/12) konnte die Menge an Granulophysin durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Dabei wurden zu aktivierten, fixierten und gewaschenen Thrombozyten (100µl Ansätze) 5 µg/ml Antikörper gegeben, für 1 h bei 20°C inkubiert, gewaschen und die Anbindung des Antikörpers im Durchflusszytometer detektiert.

2.5.6. Expression des CD40 Liganden

CD40 Ligand (CD40L, CD154) wurde ursprünglich auf stimulierten CD4⁺T Zellen gefunden. Aber auch auf aktivierten Mast-Zellen und Basophilen ist CD40 Ligand qualifiziert worden.

1998 berichteten Henn et al^{cxvvi}, dass auch CD40L auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten quantifiziert werden konnte.

Thrombozyten wurden aktiviert, fixiert und gewaschen. Den „pelettierten“ Zellen wurde in sättigenden Konzentrationen der PE-konjugierte monoklonale anti CD40L Antikörper (Klon 24-31) zugegeben, für 60 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert und danach ungebundener Antikörper abgewaschen. Angebundener Antikörper wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

2.5.7. Bindung von extern zugesetztem TSP-1

TSP-1 wurde wie Fibrinogen mit dem Fluorochrom FITC konjugiert. Dabei wurde in diesem Fall kein Citrat zugesetzt, sondern 1 mg TSP-1 in TBS-Puffer und unter Zusatz von 2 mM Calciumchlorid mit 0,5 mg Celite-adsorbiertem FITC für 24 h bei 4°C

inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben und FITC-TSP-1 von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt. Die Endkonzentration des FITC-TSP-1, das den Thrombozyten extern zugesetzt wurde, betrug 50 µg/ml. Die Vorinkubationszeit mit den Zellen betrug 5 min.

Lösungen:

TBS-Puffer	Natriumchlorid	154 mM
pH 7,4	Tris/HCl	50 mM
Zusatz:	Calciumchlorid	2 mM

2.5.8. Prokoagulanter Zustand

Während der Aktivierung werden negativ geladenen Phospholipide wie Phosphatidylserin auf die Außenseite der Thrombozytenmembran exponiert und weisen eine erhöhte Bindungsaktivität für plasmatische Gerinnungsfaktoren auf.

Es entsteht die sog. prokoagulatorische Oberfläche, die die sekundäre Hämostase einleitet und ermöglicht.

Die prokoagulatorische Oberfläche stellt Bindungsstellen für den Prothrombinasekomplex zur Verfügung.

Der Komplex setzt sich aus dem aktivierten Faktor V, dem Faktor Xa und Prothrombin zusammen. Durch diese Komplexbildung kann Prothrombin zu Thrombin gespalten werden. Auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten kann dann der Koagulationsfaktor XIII binden, der wiederum bei der Fibrin-Polymerisation die Rolle der Gerinnsel-Stabilisierung übernimmt.

Die prokoagulatorische Aktivität im Bereich eines Thrombozytenaggregates kann durch sog. Mikropartikel gesteigert werden. Dies sind abgeschnürte Membranvesikel, die eine hohe Bindungsaktivität für Faktor V und VIIIa aufweisen und eine hohe prokoagulatorische Aktivität besitzen.

2.5.9. Messung der Annexin V-Bindung an Thrombozyten

Zum Nachweis von Phosphatidylserin auf der äußeren Schicht der Plasmamembran dient Annexin V, das Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserinreste bindet. Gelfiltrierte Plättchen wurden auf 100.000/ μl mit „Prokoagulationspuffer“ eingestellt und je 100 μl nach Zusatz von 1,25 mM GPRP mit entsprechenden Agonisten und Antagonisten versetzt. Diese Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-Annexin V (Bender Med Systems, Wien) für 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml „Prokoagulationspuffer“ wurde die FITC-Annexin V Anbindung durchflusszytometrisch bestimmt.

Lösungen:

„Prokoagulationspuffer“	Natriumchlorid	127 mM
pH 7,35	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	0,42 mM
	Natriumhydrogencarbonat	12 mM
	Magnesiumchlorid	1 mM
	Calciumchlorid	6 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM

2.5.10. Messung der Faktor VIII-Bindung an Thrombozyten

Humaner Faktor VIII wurde zuerst mit FITC konjugiert. Dazu wurden 1 mg Faktor VIII mit 0,5 mg FITC an Celite in TBS-Puffer gelöst und bei mäßigem Schütteln für 24 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde der FITC-konjugierte Faktor VIII von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt.

Die Endkonzentration an zugesetztem FITC-FVIII betrug 1 U/ml (das entspricht 1 µg/ml). Die Vorinkubation mit den Zellen betrug 5 min. Gelfiltrierte Plättchen wurden auf 100.000/µl mit Prokoagulationspuffer eingestellt und je 100 µl mit entsprechenden Agonisten und Antagonisten versetzt. Diese Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl Prokoagulationspuffer wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen und gebundener Faktor VIII bestimmt.

2.5.11. Messung der Faktor Xa-Bindung an Thrombozyten

Humaner Faktor Xa wurde zuerst direkt mit FITC konjugiert. Dazu wurden 1 mg Faktor Xa mit 0,5 mg FITC an Celite in TBS-Puffer gelöst und bei mäßigem Schütteln für 24 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde auf eine mit TBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule gegeben. Durch die Gelfiltration wurde der FITC-konjugierte Faktor Xa von Celite-adsorbiertem FITC abgetrennt.

Die Endkonzentration an zugesetztem FITC-FXa betrug 1 U/ml (das entspricht 1 µg/ml). Zusätzlich wurden 1 U/ml Faktor Va (unkonjugiert) zugesetzt. Die Vorinkubation mit den Zellen betrug 5 min. Gelfiltrierte Plättchen wurden auf 100.000/µl mit „Prokoagulationspuffer“ eingestellt und je 100 µl mit entsprechenden Agonisten und Antagonisten versetzt. Diese Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl „Prokoagulationspuffer“ wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen und gebundener Faktor Xa quantitativ bestimmt.

2.5.12. Messung von Thrombozytenmikropartikeln

Bei starker Aktivierung der Thrombozyten können Mikropartikel entstehen. Diese Partikelbildung nimmt dosisabhängig zu. Die gebildeten Thrombozytenmikropartikel wurden im Durchflusszytometer durch Eingrenzen der intakten Zellen und der kleineren entstandenen Partikel nach spezifischer Markierung mit einem anti GPIX-FITC markierten Antikörper (Klon Beb1) prozentual bestimmt.

2.6. Detektion von Thrombozyten –Leukozyten-Assoziaten

Monozyten bzw. PMNL, die mit Thrombozyten assoziierten, wurden im Durchflußzytometer quantitativ bestimmt.

Zur durchflußzytometrischen Detektion der Plättchen–Leukozyten–Assoziat wurden die Thrombozyten mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper (Klon:Beb1) gegen das Plättchen spezifische Antigen GPIX(CD42a) und die Monozyten mit einem PE-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen CD 14 in sättigenden Konzentrationen (CD42a-FITC:1,25 µg/ml;CD14-PE: 5µg/ml) nach der Zellaktivierung und Zellfixierung für 45 min bei RT markiert. Die PMNL wurden im FACS durch charakteristische SSC-Streulichteigenschaften identifiziert. Durch die Detektion von CD 14 positiven Zellen (Monozyten) bzw. Zellen mit PMNL-spezifischen Streulichteigenschaften im SSC und Gaten der Plättchen –tragenden, also CD 42a-positiven Leukozyten, wurden die Assoziat quantifiziert.

Dabei wurde der prozentuale Anteil an Leukozyten, die mit Plättchen assoziiert vorlagen, zur Leukozyten-Gesamtpopulation ins Verhältnis gesetzt.

2.6.1. Probenvorbereitung für Untersuchungen im Vollblut

Für die Bestimmung von Plättchen–Leukozyten-Assoziaten und von Aktivierungsparametern auf Plättchen bzw. Leukozyten ex vivo und nach Aktivierung wurde Citrat-Vollblut von freiwilligen Probanden innerhalb einer Stunde nach Blutabnahme verarbeitet.

Eine nahezu Zell-unschädliche Fixierung und eine spezielle Lyse der Erythrozyten sollen präparativ bedingte Zellartefakte minimieren.

Die Lyse der Erythrozyten darf erst nach Zellfixierung und Zellmarkierung erfolgen , da sonst die Plättchen von ADP aus den zerfallenden Erythrozyten aktiviert werden können.

Nach 15 minütiger Zellaktivierung bei RT wurden die Zellen mit 0,4%iger Formaldehydlösung im Verhältnis 1:1 für 30 min bei RT fixiert. Die Entfernung des

Fixatives erfolgt durch einmaliges Waschen mit 2ml Tyrode-Puffer pro Vollblutprobe und anschließender Zentrifugation bei 350 g für 10 min bei 20 °C. Der überschüssige Puffer wurde abgesaugt und für die Antikörpermarkierung wurden pro Probe 100µl Zellsuspension eingesetzt.

Die Markierung der Zellen im Vollblut mit aktivierungsspezifischen Antikörpern erfolgte für 45 min bei RT mit leichter Bewegung der Proben.

Überschüssige Markersubstanzen wurden durch Waschen mit 2ml Tyrode Puffer wie oben beschrieben entfernt.

Der Waschpuffer wurde abgesaugt und die in jeder Probe verbleibenden 100-150µl mit den darin enthaltenen sedimentierten Zellen vorsichtig durch leichtes Schütteln resuspendiert.

Für die Lyse der Erythrozyten wurde eine Lyse Stammlösung (Immunotech, Hamburg) mit PBS 1:50 verdünnt. Die resuspendierten Zellen wurden mit 1 ml verdünnter Lyse-Lösung versehen und für 5 Sekunden stark gemischt. Die Proben wurden solange mit dem Lyse-Reagenz bei RT inkubiert, bis sämtliche Erythrozyten zerstört waren und die Blutprobe sichtbar klar wurde. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 2ml Tyrode-Puffer (s.o) wurde die resuspendierte Probe auf ca. 500 µl mit Tyrode-Puffer aufgefüllt und im Durchflußzytometer analysiert.

Lösungen:

Tyrode	Puffer	(TBS) NaCl	KCL 0,14M	
pH=7,4:		NaH ₂ PO ₄	D(+)- 0,0027M	
		Glukose	Hepes 0,012M	0,0055M
		BSA	0,005M	
		MgCl ₂	0,5%	0,001M
		Apyrase	0,1U/ml	

Fixativ:	Formaldehyd in PBS,	0,4%(V/V)
	pH 7,4	
Lyse-Lösung:	Lyse-Stammlösung	mit 1:50
	PBS,pH 7,4 verdünnt	

2.7. Einfluß verschiedener Modulatoren auf die Thrombozytenaktivierung durch Defensin

Die Aktivierung von Thrombozyten kann durch verschiedene Substanzen moduliert werden. Um den Einfluß verschiedener Modulatoren auf die Thrombozytenaktivierung zu untersuchen, wurden diese vor der Aktivierung 5 min mit der entsprechenden Substanz vorinkubiert und anschließend mit HNP1-3 aktiviert. Nach Zugabe von Puffer wurde der Aktivierungszustand durchflusszytometrisch detektiert.

2.7.1. Antithrombin III

ATIII gehört zu den Serin Protease Inhibitoren, den sog Serpinen. Es ist ein einkettiges Plasmaglykoprotein, welches in der Leber gebildet wird und ein natürlicher Hemmstoff der Gerinnung ist. Es wirkt v.a. über die Hemmung von Faktor Xa und Thrombin, in geringerem Maße aber auch auf andere Gerinnungsfaktoren wie IXa, XIa, XIIa. Indem es mit diesen Faktoren einen irreversiblen 1:1 molaren Komplex bildet, greift ATIII an verschiedenen Stellen im Gerinnungssystem ein und hemmt damit die Generierung von Fibrin aus Fibrinogen sowie den Amplifikationsprozess und eine weitere Thrombozytenaktivierung durch Thrombin. Die antikoagulatorische Wirkung wird durch das Binden an Heparansulfat und einer damit verbundenen sterischen Konformationsänderung um ca. das 1000 fache beschleunigt. Durch die Konformationsänderung wird die Anlagerung von Gerinnungsfaktoren erleichtert.

In der normalen Hämostase bindet ATIII an Endothelzell-Heparansulfat und kontrolliert so den Gerinnungsprozess in der Peripherie von Gefäßverletzungen und interagiert im Blut mit Heparansulfaten, die von anderen Zellen beispielsweise Mastzellen gebildet werden. Die Konzentration von ATIII ist in hyperkoagulativen Störungen wie der DIC herabgesetzt.

Lösungen:

ATIII-Stammlösung ATIII 200mM in NaCl
 Pharmacia Upjohn

2.7.2. Heparin

Heparine gehören zum Grundinstrumentarium in der Prävention und Behandlung von thromboembolischen Erkrankungen, vor allem bei der frühen Phase der Antikoagulationsbehandlung.

Unfraktioniertes Heparin (UF-Heparin) besteht aus einer Mischung komplexer Moleküle mit unterschiedlicher Struktur und Molekulargewicht. Lediglich ein Teil dieser Moleküle ist in der Lage, die Gerinnung zu inhibieren. Hierbei wird durch die Bindung von Heparin an den physiologischen Protease-Inhibitor Antithrombin die Inhibition von Thrombin und anderen Gerinnungsfaktoren erhöht.

Heparin ist chemisch und biologisch kein einheitlicher Arzneistoff, sondern besteht aus einem Gemisch von sulfatierten Glukosaminoglycanen, die sich erheblich in ihrer Länge unterscheiden. In der Polysaccharidkette sind abwechselnd sulfatierte Glukosamin- und Uronsäurebausteine miteinander verknüpft (Abb. 2.4).

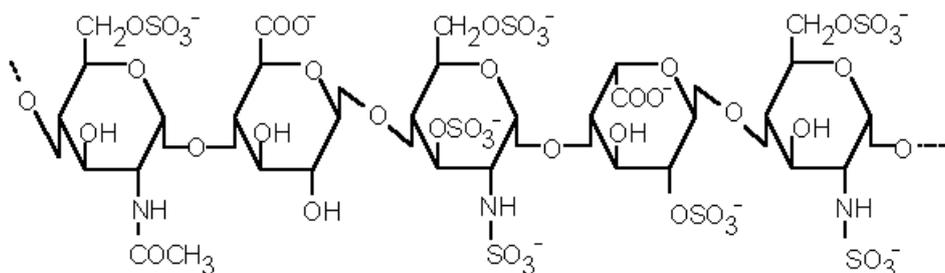


Abb. 2.4: Ausschnitt aus einem Heparinmolekül

Wegen der hohen Anzahl an sauren Gruppen zählt Heparin zu den starken physiologischen Säuren. Unfraktioniertes Heparin besitzt ein relatives Molekulargewicht zwischen 12000 und 15000 Dalton, wobei die Spannbreite von 3000 bis 30000 Dalton reicht. Durch chemische oder enzymatische Spaltung von unfraktioniertem Heparin gelangt man zu niedermolekularem Heparin (NM-Heparin). Auch das NM-Heparin ist noch ein Substanzgemisch. Die einzelnen sulfatierten Polysaccharidketten sind aber kürzer. Als unerwünschte Nebenwirkung des Heparins bei der Antikoagulation ist die Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) bekannt. Dabei unterscheidet man 2 Formen, wobei eine nicht-immunologische Form durch eine direkte Wechselwirkung von Heparin mit Thrombozyten ausgelöst wird (HIT I). Die zweite, immunologische HIT wird durch Antikörper verursacht, die sich gegen einen Komplex aus Heparin mit Proteinen, zumeist dem Plättchenfaktor 4, bilden (HIT II). Diese Antikörper führen zu einer Thrombozytenaggregation und -aktivierung, was durch einen extremen Abfall der Thrombozytenzahl gekennzeichnet ist und sowohl in venösen als auch arteriellen Gefäßen Verschlüsse auslösen kann.

Lösungen:

Fragmin Pfizer

Dalteparin natrium

2.7.3. Thrombospondin-1

Die Abkürzung für das Thrombospondin-1, TSP-1, geht auf Baenziger zurück, der 1971 erstmals das „Thrombin-sensitive Thrombozytenprotein“ (TSP) entdeckte. Von insgesamt fünf Thrombospondinen ist TSP-1 jenes, das in großen Mengen aus humanen Plättchen freigesetzt wird. Es ist ein Adhäsionsprotein, das als Monomer eine Masse von 180 kDa hat, aber als Trimer mit einer Masse von 420-450 kDa vorliegt. Thrombospondin-1 ist durch seine Vielzahl an Bindungsstellen für unterschiedliche Proteine ein multifunktionelles Protein^{cxxxvii}.

Es liegt nicht nur in den α -Granula der Thrombozyten vor, sondern wurde auch in Leukozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten gefunden (Kehrel et al. 1996). Etwa ein Viertel der Menge aller bei der Degranulation freigesetzten Proteine ist das Thrombospondin-1 (TSP-1) (Kehrel et al.1996)^{cxxxviii}.

TSP-1 besitzt inhibierende Eigenschaften, so gilt es als langsamer, festbindender Inhibitor von Plasmin, Elastase und Cathepsin G.

TSP-1 bewirkt eine Vielzahl von Interaktionen mit Makromolekülen. Es spielt eine Rolle bei der Plättchenaggregation, vermittelt die Plättchenadhäsion an das Subendothel und vermittelt die Plättchenadhäsion an Leukozyten. Es wirkt anti-angiogenetisch^{cxxxix} und ist beteiligt an der Inhibierung des Tumorwachstums. TSP-1 wirkt regulatorisch und modulatorisch und vermittelt die „Kommunikation“ unter verschiedenen Zellen.

Lösungen:

Thrombospondin-1 von TSP-1 der Arbeitsgruppe aufgereinigt

2.7.4. Hirudin

Hirudine sind direkte, heute meist rekombinant hergestellte Thrombininhibitoren, die früher aus dem medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*) gewonnen wurden. Sie sind kleine Proteine aus 65 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 7000D.

Hirudine sind die potentesten natürlichen Thrombininhibitoren, die mit Thrombin einen 1:1 stöchiometrischen Komplex eingehen. Im Gegensatz zu Heparin kann Hirudin auch an Fibrin gebundenes Thrombin inaktivieren und vermag auch die Aktivierung von Faktor V und VIII durch Thrombin effektiver als Heparin zu hemmen.

Lösungen:

Hirudin Pentapharm Lepirudin

2.7.5. α 2 –Makroglobulin

α 2 –Makroglobulin ist ein langsam wirkender Plasmininhibitor, der nicht nur Plasmin sondern auch andere Serinproteasen hemmt. Damit gehören diese Makroglobuline wie ATIII zu den Serinproteaseinhibitoren. Bei gesteigerter Thrombinaktivierung und Fibrinbildung wird α 2 Makroglobulin verbraucht. Die verbrauchten Anteile stehen als

Antiplasmin nicht mehr zur Verfügung, so dass bei Plasminogenaktivierung eine gesteigerte Fibrinolyse resultieren kann.

Lösungen:

α 2-Makroglobulin Sigma α 2Makoglobulin

2.7.6. α 1–Antitrypsin

α 1 Antitrypsin ist ein Akut-Phase-Protein, es steigt also bei Entzündungen an. Seine Funktion besteht in der Aktivitätshemmung proteolytischer Enzyme wie Trypsin, Plasmin und Urokinase. Zudem ist auch α 1 Antitrypsin ein Serinproteaseinhibitor. α 1 Antitrypsin wird vorwiegend in der Leber, in bestimmten Blutzellen und in den Fresszellen von Lungenalveolen gebildet. Ein Mangel führt zur verstärkten Proteolyse.

Lösungen:

α 1-Antitrypsin Kordia α 1 Antitrypsin

2.7.7. Vitronectin

Vitronectin (= complement S-protein) ist ein zweikettiges Glykoprotein und sowohl im Blut als auch in der extrazellulären Matrix präsent. Es ist ein Bestandteil der α Granula in den Thrombozyten. Vitronectin ist eines der Hauptadhäsionsproteine und bindet an Zellen der extrazellulären Matrix über die Interaktion mit seiner RGD (45-47)Sequenz und entsprechenden Integrinen.

Vitronectin bindet an den "plasminogen activator inhibitor" und reguliert so die Proteolyse, die durch Plasminogen initiiert wird. Vitronectin interagiert zusätzlich mit dem Urokinaserezeptor und beeinflusst so Mechanismen der Migration und Signaltransduktion und hat multifunktionale Funktionen in der Regulation des Abwehrsystems (Komplement).

Lösungen:

Vitronectin Kordia Vitronectin

2.7.8. Iloprost und PGE-1

Iloprost ist ein synthetisches Prostaglandin-Analogon. PGE-1 ist ein natürlich vorkommendes Prostaglandinderivat. Prostaglandine gehören chemisch zu den Lipiden und stellen eine kleine Gruppe von Gewebshormonen dar, die eine vielfältige physiologische Wirkung besitzen.

Beide induzieren in Thrombozyten durch die Aktivierung der Adenylatcyclase den intrazellulären Anstieg des second messengers cAMP/cGMP. Diese zyklischen Mononukleotide wirken durch verminderte IP3 Synthese und Calciummobilisierung inhibierend auf die Plättchenaktivierung.

Lösungen:

Iloprost Schering Iloprost

PGE-1 Sigma PGE-1

2.7.9. Bacitracin

Bacitracin ist ein Polypeptid-Antibiotikum, welches die Zellwandsynthese einiger Bakterienarten hemmt. Zusätzlich hemmt es spezifisch die Protein Disulfid Isomerase (PDI). Die PDI ist essentiell an der Disulfidbrückenbildung und der damit verbundenen Proteinfaltung beteiligt. Bacitracin wird aus Kulturen des *Bacillus subtilis* gewonnen. Aufgrund der starken Nephrotoxizität von Bacitracin wird es heute nur noch äußerlich angewendet.

Lösungen:

Bacitracin Sigma Bacitracin

2.8. ELISA-Verfahren

Mit dem hochsensitiven ELISA- („enzyme-linked-immunosorbent-assay“) Verfahren ist es möglich, Antigene und Antikörper im Picogramm-Bereich nachzuweisen. Dazu werden Antigene oder Antikörper an der Bodenfläche einer ELISA-Platte, den so genannten „wells“, immobilisiert. Die gesuchten Proteine, oder andere Moleküle, können nun spezifisch anbinden. Durch eine weitere spezifische Bindung eines Antikörper-Enzymkomplexes und anschließender Farbreaktion mit einem Chromogen können die zu untersuchenden Antigene bzw. Antikörper indirekt markiert und photometrisch quantifiziert werden^{cxlcxli}.

2.8.1. sCD 40 L ELISA

Die Aktivierung und Aggregation von Plättchen kann zu einer Freisetzung des löslichen Liganden CD 40 L führen.

Der sCD 40L ELISA (ALEXIS, Biochemicals) dient der quantitativen Bestimmung des löslichen humanen CD40 Liganden in humanem Serum.

Dazu wurden in einer speziellen Verdünnungsplatte von der sCD40L Standardlösung Verdünnungsreihen von 10-0,16 ng/ml erstellt, indem 100µl von „well“ zu „well“ übertragen werden. Auch von der Serumprobe werden Verdünnungsreihen erstellt, indem je 100µl Probe in die entsprechend angefertigten „Probenwells“ der Verdünnungsplatte pipettiert werden.

Allen „wells“ werden dann 100 µl eines gelösten HRP (horse radish peroxidase)-konjugiertem monoklonalen anti-sCD40L Antikörpers zugegeben. 150 µl der so vorbereiteten Proben wurden in eine mit murinem monoklonalen Antikörper, der für humanen CD40L spezifisch ist, beschichtete Mikrotiterplatte überführt und für 2 h bei 20 °C inkubiert. Nach Entleeren und dreimaligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer wurden je 100 µl TMB-Substrat Lösung zugegeben und für 15 min bei 20°C inkubiert. Die Zugabe von TMB-Substrat führt zu einer Substrathydrolyse durch die Peroxidase und zum bläulichen Farbumschlag der Lösung. Die enzymatische Umsetzung wurde

durch Zugabe von 100 µl 1M Phosphorsäure gestoppt und Farbreaktion bei 450 nm im ELISA-Reader photometrisch analysiert.

Lösungen:

Assaypuffer:	Tween 20	1 %
	in PBS-Puffer, pH 7,4	
	H ₂ O ₂	20 % (w/v)
Waschpuffer:	Tween 20	1 %
	in PBS-Puffer, pH 7,4	
	BSA	3 % (w/v)
	H ₂ O ₂	20 % (w/v)
Substratlösung:	Tetramethyl-benzidine	0,1 M
	Hydrogen Peroxide	0,02 % (w/v)
	Blue-Dye, Green-Dye	0,025 % (w/v)
Stopplösung:	Phosphorsäure	1 M

2.9. Thrombinbildungsassay

Während der Hämostase wird vornehmlich auf der Thrombozytenoberfläche Thrombin gebildet. Die Thrombinbildung kann im Thrombinbildungsassay gemessen werden. Vergleichend wurde diese Thrombinbildung im PRP- mit und ohne HNP Zusatz -nach Thrombinvoraktivierung beobachtet.

Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte zum einen 30 % (v/v) PRP und 66% (v/v) TBS Puffer pH 7,4 sowie GPRP in einer Endkonzentration von 4,7 mM vorgelegt und zum anderen diesem Kontrollansatz unterschiedliche Konzentrationen HNP-1 (0;2,5;5;10;20µM) zugesetzt (Ansatzvolumen insg =150µl).

Die Proben wurden mit einer Thrombinsubstratlösung, bestehend aus 6mM Ca²⁺ und 0,2 U/ml Thrombin in TBS Puffer, (V=20 µl) aktiviert.

Nach unterschiedlichen Reaktionszeiten (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) wurden 10 µl der aktivierten Lösung in eine weitere Platte mit vorgelegtem TBS Puffer pH 7,9 und 20 mM EDTA (V=150 µl) gegeben und so die Reaktion gestoppt.

Um das gebildete Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche zu quantifizieren, wurde ein für Thrombin spezifisches chromogenes Substrat (Loxo/Pentapharm) in einer Endkonzentration von 1µM in einem Volumen von 40 µl zugesetzt.

In Abhängigkeit der Thrombinkonzentration kam es zur Abspaltung eines Substratbestandteils und damit im gleichen Zug zu einer gelblich –orangen Färbung.

Die Farbreaktion wurde im Elisa-Reader im 405 nm Absorptionsbereich nach 20 Minuten Farbentwicklungszeit gemessen.

Lösungen:

Thrombinstartlg.: 0,2U/ml Thrombin

6mM Ca²⁺

TBS-Puffer

Substratlösung: 600µl Substrat
in 3400 µl TBS-Puffer, pH
7,4

TBS Puffer: s.o

2.10. Endothelzellversuche

2.10.1. Kultivierung von HMEC-1 (human microvascular endothelial cell-line-1)

Für Untersuchungen an isolierten Endothelzellen wurden diese in Zellkulturen angezüchtet. HMC-1 (Dr.F.Candal U.S.A.) wurden maximal bis zu 12 Passagen in supplementiertem EC-Medium (PAA Pasching/Austria) bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre unter Begasung mit 5% CO₂ kultiviert. Mit einer Trypsin-Lösung (Seromed, Berlin) wurden die adhärenen Zellen für 3 min abgelöst und mit PBS bei 190 g für 8 min bei 4°C abzentrifugiert.

Es folgte eine Inkubation der Endothelzellen in einer 24 well Platte, bis es in den einzelnen „Wells“ zum konfluenten Wachstum kam. Dazu wurden in jedes Well 5x10⁵ resuspendierte Endothelzellen überführt und in 450 µl EC-Medium für zwei Tage bei 37°C und 98% iger Luftfeuchtigkeit in 5 % CO₂ bebrütet.

Lösungen:

Puffer:	PBS steril pH 7,4	
Serumfreies		
Endothelzellmedium C	Glutamin	5%(w/v)
	Pen/Strep	100 U/ml
Trypsin-EDTA-Lösung	Trypsin	0,02%(v/v)
	EDTA	0,05%(w/v)

2.10.2. Endothelzellaktivierung

Werden Endothelzellen aktiviert, kommt es zu einer Sekretion der Weibel-Palade-Körperchen. Dabei werden E-Selektin und P-Selektin auf der Endothelzell-oberfläche exprimiert. Diese Membranproteine können mit spezifischen AK quantifiziert werden.

Durch einen Membran „flip flop“, bei dem die negativ geladenen Phospholipide wie Phosphatidylserins auf die Außenseite der Endothelzellen gelangen, wird ebenfalls eine Aktivierung, sowie bei kernhaltigen Zellen eine beginnende Apoptose signalisiert. Zum Nachweis von Phosphatidylserin auf der äußeren Schicht der Endothelzellmembran dient Annexin V, das Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserinreste bindet.

Um den Einfluß von Thrombozyten, HNP1 sowie von durch HNP-1 aktivierten Thrombozyten auf Endothelzellen zu beobachten, wurden diese mit den jeweiligen Substanzen inkubiert und anschließend ihr Aktivierungszustand mittels Annexin V–FITC und anti-E-Selekin-AK bestimmt.

Die Endothelzellen wurden in verschiedenen Ansätzen entweder mit Kontrollmedium, 7,5 μM HNP-1, mit gelfiltrierte Plättchen(50 000/ μl) allein oder mit gelfiltrierten Plättchen, die mit 7,5 μM HNP-1 für 15 Minuten voraktiviert wurden, inkubiert. Die Proben wurden für 30 Minuten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde $\text{TNF } \alpha$ (10 nM) eingesetzt.

$\text{TNF}\alpha$ ist ein Zytokin und wird von allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert. Es löst in allen Zellen biologische Effekte aus, die vom Differenzierungsmuster der Zellen abhängen. $\text{TNF } \alpha$ wurde ursprünglich als ein von aktivierten Makrophagen produzierter tumorzytotoxischer Faktor beschrieben, der Thrombosen in Tumorgefäßen auslöst. Daher kommt auch der Name **Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)**. Er wirkt parakrin und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen. $\text{TNF}\alpha$ aktiviert das Endothel, steigert so die Permeabilität der Gefäße und fördert die Gerinnung auf der Oberfläche von Endothelzellen. Kleine Blutgefäße werden dadurch verschlossen.

Den inkubierten Proben mit einem Gesamtvolumen von je 300 μl wurde nun Acutase(PAA/Austria) zugesetzt. Acutase ist ein enzymatisches Reagenz, welches

die Endothelzellen aus den Wells der Platten ablöst, dabei aber die Oberflächenmoleküle schont. Die Endothelzellen wurden für 15 Minuten mit diesem Reagenz inkubiert, anschließend resuspendiert und in Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Medium wurden die Proben bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Das verbleibende Zellsediment wurde resuspendiert und die Expression von E-Selektin mit monoklonalem anti E-Selektin Antikörper, welcher für 20 min in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben wurde, nach erneutem Waschen durchflußzytometrisch quantifiziert.

Zum Ermitteln der Annexin V Anbindung wurden die Proben mit 2 µg/ml FITC-Annexin V (Bender Med Systems, Wien) für 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Medium wurde die FITC-Annexin V Anbindung durchflußzytometrisch bestimmt.

2.11. Membranpermeabilität von Thrombozyten

Mit Calcein AM (Acetoxymethylester) wurde die Membranpermeabilität überprüft. Der nicht fluoreszierende Calcein AM passiert die Zellmembran problemlos. Durch eine unspezifische Esterspaltung entsteht der stark fluoreszierende Calcein erst in den Zellen. Bei Schädigung der Zellmembran kann fluoreszierendes Calcein in die Umgebung freigesetzt werden und die Intensität des Calceinsignals in den Zellen abnehmen.

Für den Versuch wurden die Plättchen auf 25.000 /µl mit Hapes Tyrode verdünnt und 1h lang mit 2 µM Calcein AM bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit HNP-1 (0-10 µM) aktiviert und das Calceinsignal in der ersten Fluoreszenz detektiert. Vergleichend wurde der unspezifische kalziumabhängige Plättchenagonist Calcium-Ionophor (A23187, Calbiochem, Bad Soden) 0,01 M in DMSO eingesetzt, der Plättchen durch eine Zerstörung der Zellmembran aktiviert. Die Aktivierung erfolgt für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Konzentrationsbereich von 0-5 µM Calcein AM. Nach der Aktivierungszeit wird den Proben 500µl Puffer zugesetzt und Im FACS gemessen.

2.12. Statistische Absicherung der experimentellen Daten

Die analogen Signale der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden digitalisiert. Dabei wurde bei dem in dieser Arbeit benutzten Durchflusszytometer die registrierte Signalintensität für jeden gemessenen Parameter mit einem Analog-zu-Digitalumwandler auf 1024 (0-1023) Kanäle aufgeteilt. Die so erfassten Daten konnten dann mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogrammes (CellquestPro) analysiert werden. Die Verstärkung der Immunfluoreszenzen erfolgte logarithmisch, da sich bei Messungen kleiner Zellen, wie Thrombozyten, die Populationen um mehrere Größenordnungen voneinander unterscheiden können, und der Messbereich im logarithmischen Modus größer als im Linearmodus ist.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden die durchflusszytometrisch ermittelten logarithmischen Werte zunächst entlogarithmisiert und in lineare Werte umgerechnet. Die logarithmischen Werte spiegeln die Fluoreszenzintensitäten der Hauptpopulation der gemessenen Zellen (Mediane) wieder. Die entlogarithmisierten linearen Werte der Mediane wurden dann gemittelt. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der T-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Die Signifikanzen wurden mit dem Programm Sigma Stat 2.0 berechnet. Als signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen zum Einfluß von Defensin auf die Thrombozytenaktivierung

Zur Bestimmung der Aktivierung von Thrombozyten wurden aktivierungsabhängige Proteine auf der Plättchenoberfläche mit Hilfe der Durchflußzytometrie quantitativ bestimmt. Zuvor wurden die Plättchen entweder durch Gelfiltration oder Gewinnung von Plättchen-reichem Plasma (PRP) isoliert und mit verschiedenen Konzentrationen an HNP1-3 oder anderen Agonisten aktiviert.

3.1.1. Fibrinogenbindung an gelfiltrierte Plättchen induziert durch klassische Agonisten und alpha Defensine

Die Fibrinogenbindung auf Plättchen wurde mit FITC-gekoppeltem humanem Fibrinogen nachgewiesen. Abbildungen 3-1-3 zeigen die HNP1-3-induzierte Fibrinogenbindung auf gelfiltrierten Plättchen nach 15 min Aktivierung.

Es ergab sich ein dosisabhängiger Anstieg der Fibrinogenbindung, der anhand des Medians der Fluoreszenz¹ (FITC-Signal) bestimmt wurde.

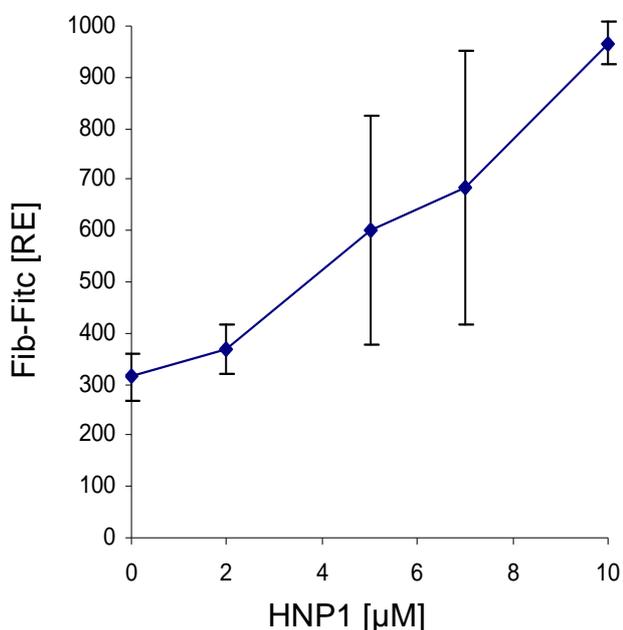


Abbildung 3-1 HNP1 inuziert eine dosisabhängige Fibrinogenbindung an gelfiltrierte Plättchen(25.000/ μ l). Es wurde FITC-gekoppeltes humanes Fibrinogen(150 μ g/ml)eingesetzt n= 8. Die hohen Standardabweichungen ergeben sich aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Thrombozyten verschiedener Blutspender für diesen Agonisten.

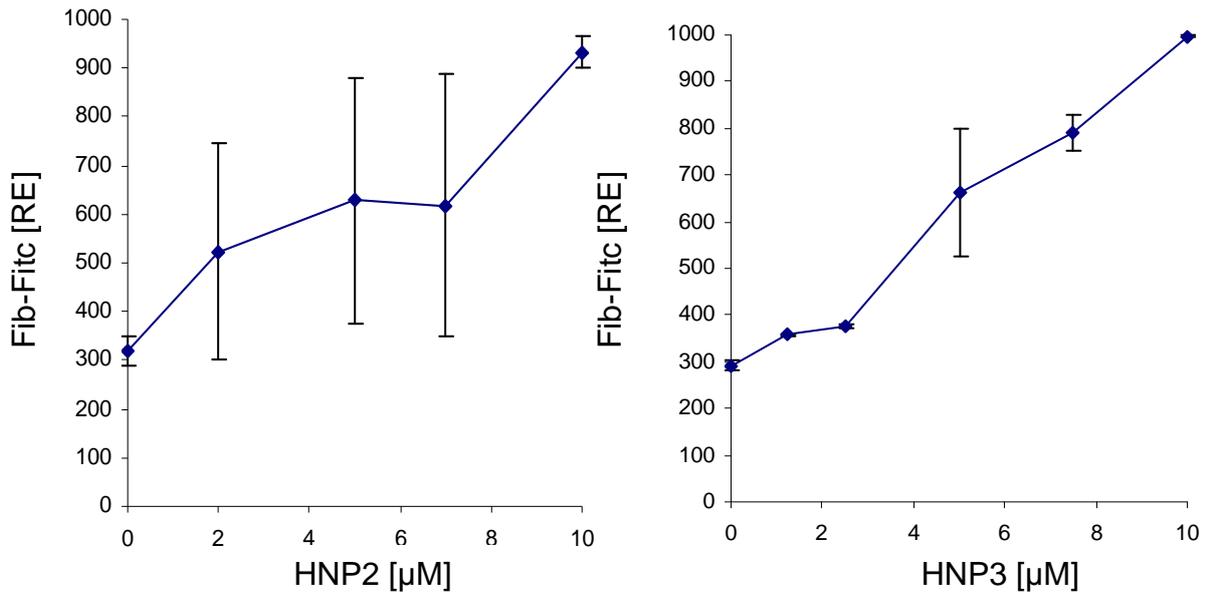


Abbildung 3-2 und 3-3: HNP2 und HNP3 induzierten ebenfalls eine dosisabhängige Fibrinogenbindung. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D.(n=3)

Die durch HNP1-3 ausgelöste Fibrinogenbindung wurde mit derjenigen klassischer Agonisten, wie Thrombin, Kollagen und ADP verglichen.

Es ergab sich auch bei diesen Agonisten ein dosisabhängiger Anstieg der Fibrinogenbindung, der ebenfalls anhand des Medians der Fluoreszenz1 (FITC-Signal) bestimmt wurde.

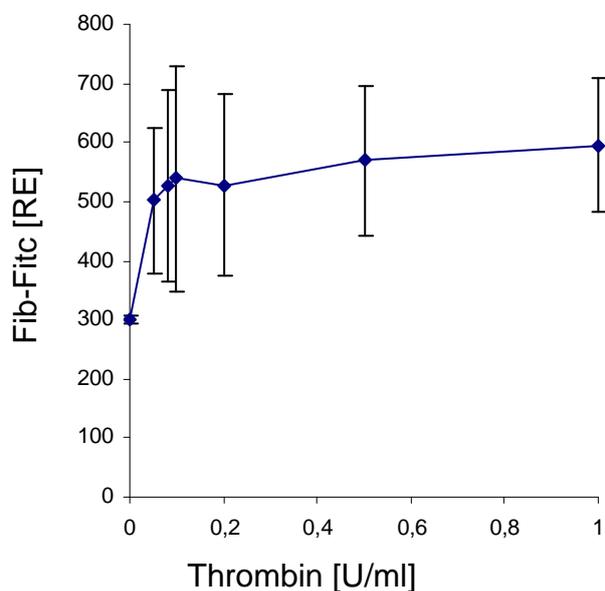
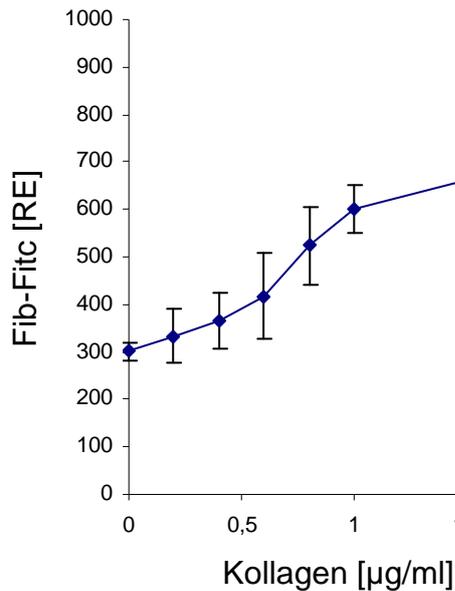


Abbildung 3-4: Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung an Plättchen (25.000/ μl). Es wurde Fitc-gekoppeltes humanes Fibrinogen (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingesetzt. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der linearen Mediane \pm S.D. (n=3)

a)



b)

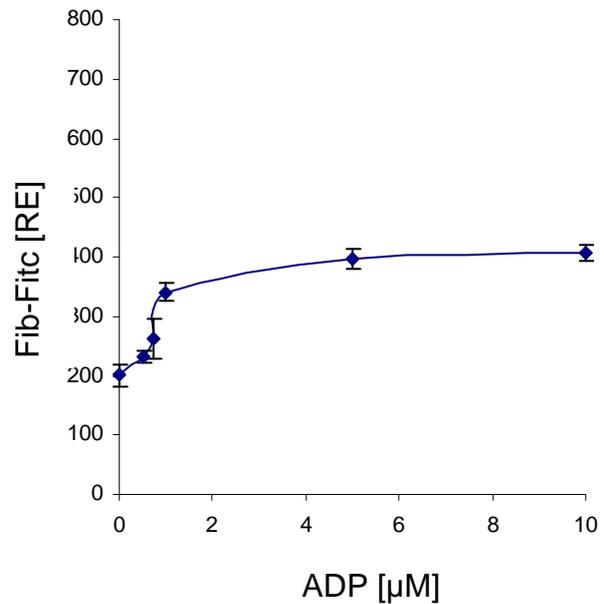


Abbildung 3-5 a) und b): Kollagen und ADP-induzierte Fibrinogenanbindung an Plättchen (25.000/µl gelfiltrierte Plättchen). Durch Kollagen und ADP aktivierte Thrombozyten binden Fitc gekoppeltes humanes Fibrinogen (150 µg/ml). Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der linearen Mediane +/- S.D. (n=3)

Die Fibrinogenbindung der mit Thrombin, Kollagen und ADP aktivierten Plättchen fiel vergleichsweise zu der durch HNP1-3 Aktivierung induzierten Bindung von Fibrinogen auf der Plättchenoberfläche signifikant geringer aus. Aufgrund des analogen Peptidaufbaues mit den Disulfidbrücken an Stelle 1-6, 2-4, 3-5 und der homologen Aminosäurezusammensetzung wurden die Versuche im Folgenden lediglich mit HNP-1 durchgeführt.

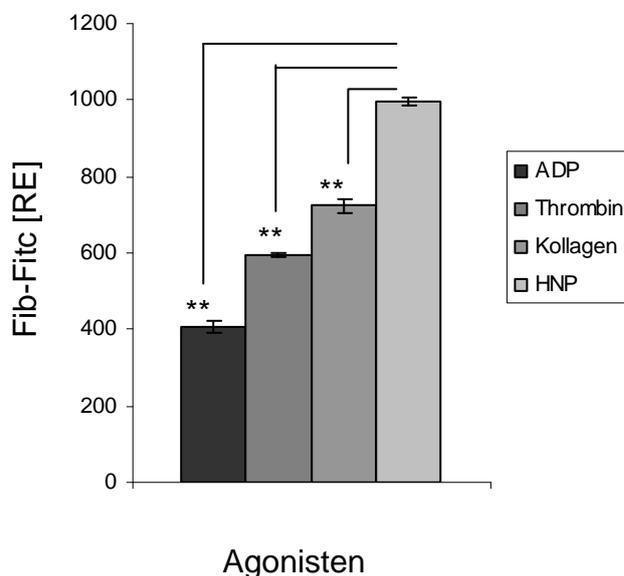


Abbildung 3-6: Vergleichende maximale Fibrinogenbindung nach Aktivierung mit unterschiedlichen Agonisten. Gelfiltrierte Plättchen (25.000/µl) wurden mit dem jeweiligen Agonisten vorinkubiert. ADP[10µM], Thrombin[1U/ml], Kollagen[2µG/ml], HNP-1[10µM]. Die Fibrinogenbindung wurde anschließend durchflusszytometrisch ermittelt. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Mittelwert der Fibrinogenbindung in relativen Einheiten +/- S.D.(n=3) dar. ** =P<0,01

3.1.2. Fibrinogenbindung an gelfiltrierte Plättchen verschiedener Tierarten

Welchen Einfluß HNP auf die Thrombozyten verschiedenerer Haussäugetiere zeigt, wurde an gelfiltrierten Plättchen unterschiedlicher Spezies untersucht. Dazu wurde von gesunden Hunden, Kaninchen, Katzen und Schafen venöses Blut entnommen und die Plättchen mittels Gelfiltration isoliert und auf 25 000/ μ l eingestellt. Die Plättchen wurden für 15 Minuten mit HNP-1 inkubiert und nach Zugabe von Puffer die Fibrinogenbindung gemessen.

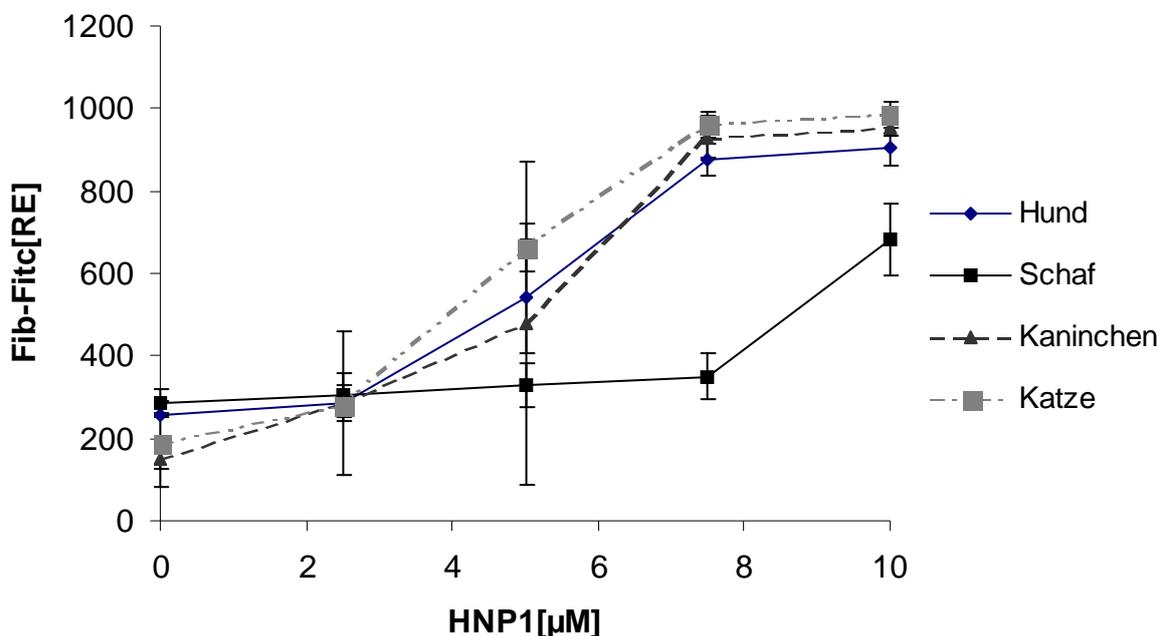


Abbildung 3-7: HNP1 aktiviert die Thrombozyten von Haussäugetieren. Gelfiltrierte Plättchen wurden mit HNP1 (0-10 μ M) aktiviert und die Fibrinogenbindung nach 15 minütiger Inkubation gemessen. Bei allen untersuchten Haussäugetierspezies zeigte sich eine dosisabhängige Fibrinogenbindung. Bei den Schafen wird die Bindung erst bei vergleichsweise höheren Konzentrationen an HNP 1 induziert, während Hund, Katze und Kaninchen schon bei geringeren alpha Defensinkonzentrationen reagieren. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Mittelwert der Fibrinogenbindung in relativen Einheiten \pm S.D. (n=3) dar.

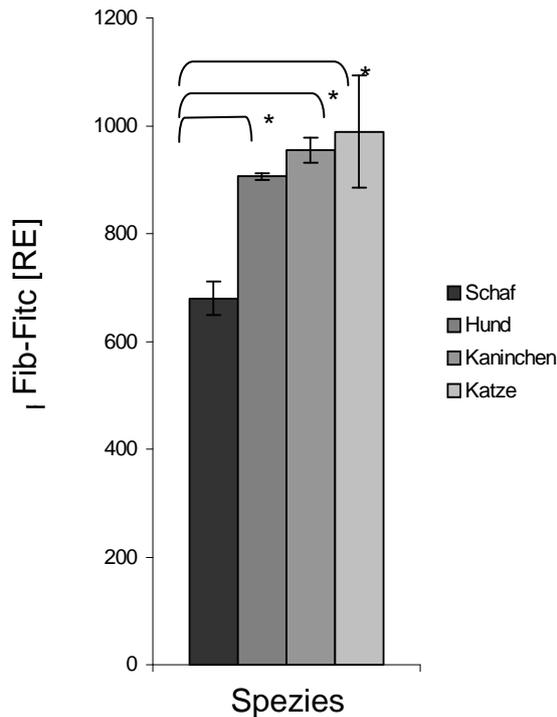


Abbildung 3-8: 10 μM HNP1 induzieren die Fibrinogenbindung an Schaf, Hund, Katzen und Kaninchenthrombozyten. Die Fibrinogenanbindung ist bei Schafen jedoch vergleichsweise signifikant geringer als bei den anderen Spezies. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Mittelwert der Fibrinogenbindung in relativen Einheiten \pm S.D.(n=3) dar. * = $P < 0,05$

Abbildungen 3-7 und 3-8 zeigen die HNP1 induzierte Fibrinogenbindung an Thrombozyten von Haussäugetieren. Am Beispiel des Kaninchens wurde die HNP1 induzierte Fibrinogenbindung im Vergleich zur Fibrinogenbindung induziert durch klassische Agonisten wie Thrombin und Kollagen untersucht.

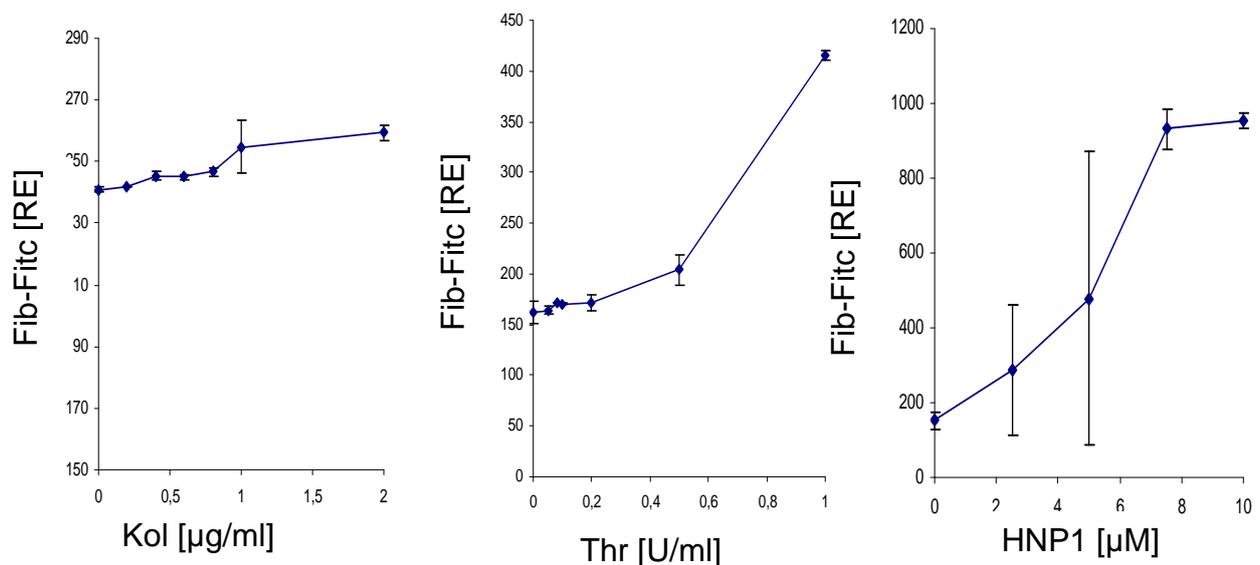


Abbildung 3-9: Aktivierung von Kaninchenthrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten. Kollagen und Thrombin induzieren ebenfalls die Bindung von FITC-gekoppeltem humanem Fibrinogen (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) an gefilterte Thrombozyten. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der linearen Mediane \pm S.D.(n=3)

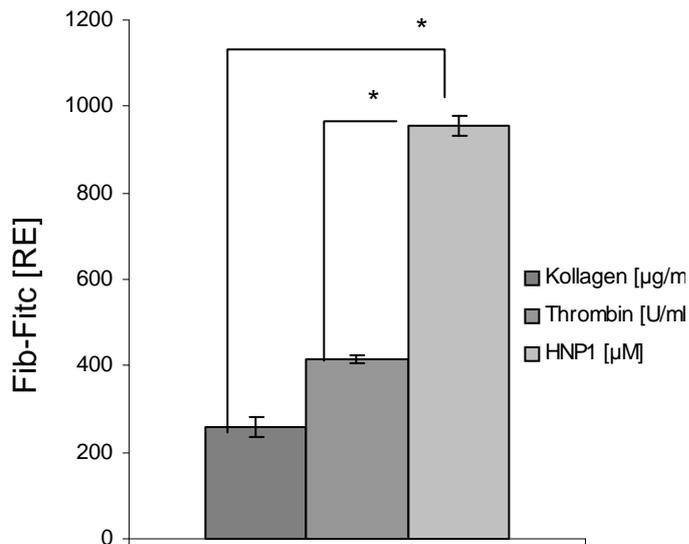


Abbildung 3-10 Vergleichende Fibrinogenbindung nach Aktivierung mit unterschiedlichen Agonisten an Kaninchenthrombozyten. Gelfiltrierte Plättchen ($25.000/\mu\text{l}$) wurden mit dem jeweiligen Agonisten vorinkubiert. Die Fibrinogenbindung wurde anschließend durchflusszytometrisch ermittelt. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Mittelwert der Fibrinogenanbindung in relativen Einheiten \pm S.D.(n=3) dar. Die maximale Fibrinogenbindung HNP1-induzierter Kaninchenthrombozyten ist signifikant stärker als die Thrombin- und Kollageninduzierte Bindung.* = $p < 0,05$

3.1.3. Fibrinogenbindung an Thrombozyten nach HNP Aktivierung im PRP.

Aktiviert man die Thrombozyten im PRP, zeigt sich, dass HNP1 ebenfalls eine deutliche Fibrinogenanbindung induziert. Jedoch sind im PRP höhere Konzentrationen an Defensin erforderlich um eine Fibrinogenbindung hervorzurufen.

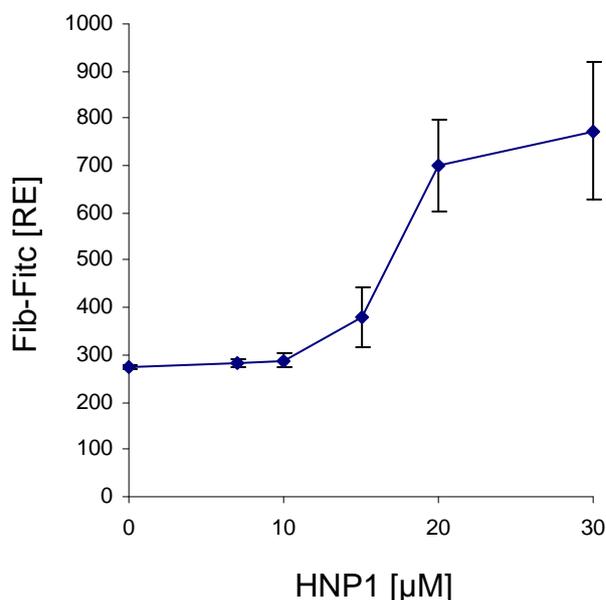


Abbildung 3-11: HNP-1 aktiviert Thrombozyten im PRP. Das plättchenreiche Plasma ($25000/\mu\text{l}$) wurde 15 min mit unterschiedlichen Konzentrationen HNP-1 ($0-30\mu\text{M}$) aktiviert und die Bindung von Fibrinogen-Fitc nach Zugabe von Puffer gemessen. n=3

Humane Thrombozyten die vor ihrer Aktivierung durch HNP1 gefiltert wurden, reagieren bereits bei geringen Konzentrationen von HNP1 mit Fibrinogenbindung. Thrombozyten, die im Plasma (PRP) vorliegen, benötigen höhere Konzentrationen HNP1 um eine Fibrinogenbindung zu zeigen.

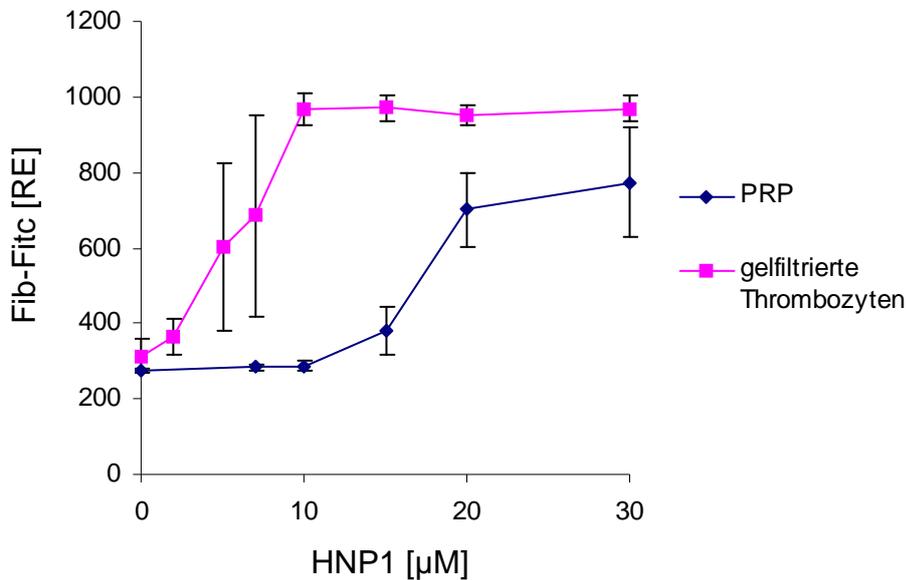


Abbildung 3-12: HNP1 induzierte Fibrinogenbindung bei gefilterten Plättchen im Vergleich zu Plättchen im PRP. (n=3)

Abbildung 3-12 zeigt die HNP1 induzierte Fibrinogenanbindung bei gefilterten Plättchen im Vergleich zu Plättchen im PRP. Die Thrombozyten wurden jeweils auf 25000/µl eingestellt und mit unterschiedlichen Konzentrationen HNP1 für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von Puffer wurde die Fibrinogenanbindung gemessen. Gefilterte Plättchen reagieren bereits deutlich im Konzentrationsbereich von 5 µM HNP1 und finden ihre Anbindungssättigung bei etwa 10 µM HNP1.

Die von Plasma umgebenen Plättchen im PRP reagieren deutlich später mit einer Fibrinogenanbindung. Konzentrationen ab 15 µM rufen hier erst eine Fibrinogenanbindung hervor, die sich dann weiter steigern lässt und bei 30 µM ihre Sättigung findet.

3.1.4. Fibrinogenbindung an Thrombozyten nach beta-Defensin Aktivierung bei gelfiltrierte Plättchen

Um zu beobachten, ob neben den α -Defensinen auch β -Defensine Thrombozyten aktivieren können, wurden gelfiltrierte Plättchen (25000/ml) analog mit unterschiedlichen Konzentrationen β -Defensin (0-20 μ M) für 15 min inkubiert und anschließend die Fibrinogenbindung an Thrombozyten gemessen.

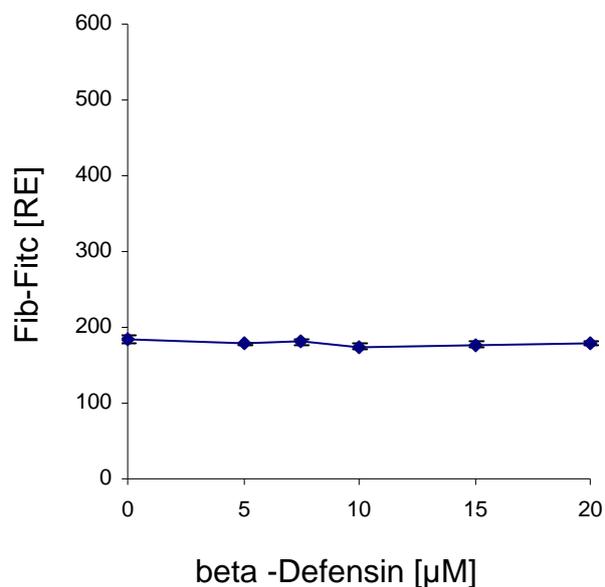


Abbildung 3-13: Gelfiltrierte Thrombozyten (25000/ μ l) wurden mit beta-Defensin in unterschiedlichen Konzentrationen (0-20 μ M) inkubiert. Nach Zugabe von Puffer wurde die Fibrinogenanbindung mit Fitc markiertem humanen Fibrinogen gemessen. Mit beta-Defensin behandelte Plättchen zeigten keine Fibrinogenanbindung. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Medianen \pm S.D. (n=3)

Wie Abbildung 3-13 zeigt, konnte durch β -Defensine keine Fibrinogenbindung an Plättchen induziert werden. β -Defensine veranlassten die Plättchen nicht zur Aktivierung mit entsprechender Fibrinogenbindung.

3.1.5. Zeitkinetik

Um den Einfluß der Inkubationszeit auf die Thrombozytenaktivierung zu ermitteln wurde eine Zeitkinetik erstellt. Den Thrombozyten wurden jeweils 10 µM Defensin zugesetzt und die Plättchenaktivierung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessen.

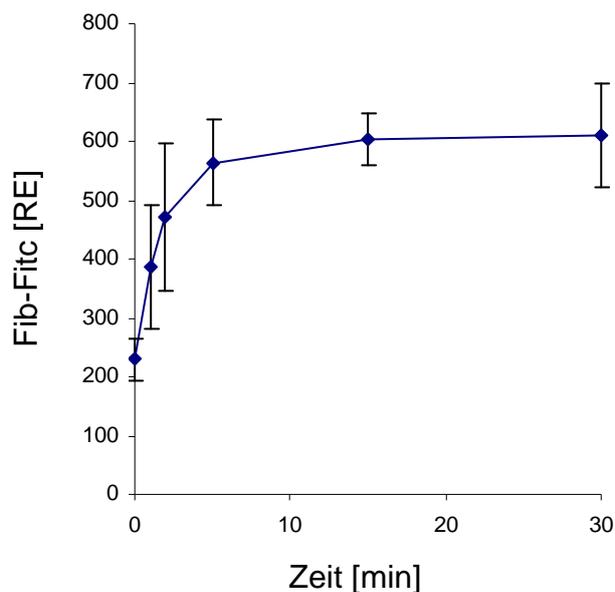


Abbildung 3-14: HNP-1(10 µM) induziert eine Aktivierung von Thrombozyten(25.000/µl) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Plättchen wurden unterschiedlich lange mit 10 µM HNP inkubiert und anschließend die Fibrinogenbindung gemessen. Das Aktivierungsmaximum ist nach 15 Minuten erreicht. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane +/- S.D. (n=3)

Die Fibrinogenbindung zeigt nach einer Inkubation der Plättchen mit HNP für 15 Minuten den Maximalbereich. Eine längere Inkubation vermag die Fibrinogenbindung nicht noch weiter zu steigern.

3.1.6. α-Granula-Sekretion

Als Parameter für die aktivierungsbedingte Exozytose der plättcheneigenen α-Granula durch α-Defensin wurde die Präsentation von P-Selektin auf der Plättchenoberfläche, nach Verschmelzung der Granulamembran mit der Plasmamembran herangezogen. Die entsprechenden Antigene wurden mit Hilfe von Fluorochromgekoppelten monoklonalen Antikörpern durchflußzytometrisch erfasst.

Abbildung 3-15 zeigt, wie die P-Selektin-Expression durch HNP-1 Aktivierung konzentrationsabhängig zunimmt. α -Defensine induzieren somit eine deutliche Exozytose der α -Granula.

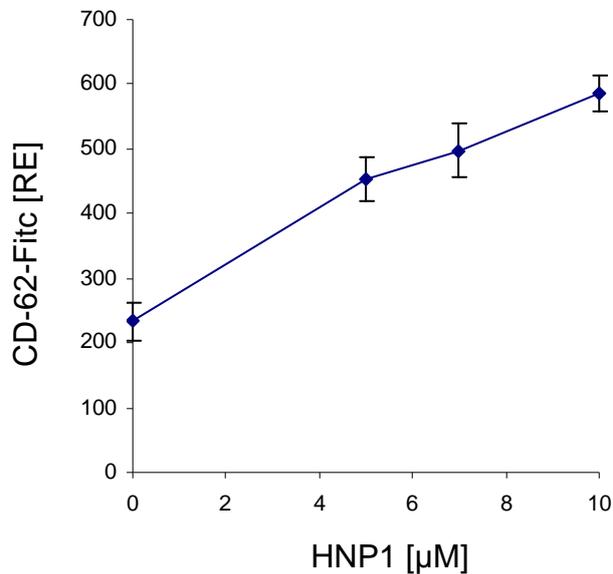


Abbildung 3-15 CD62P-Expression auf gelfiltrierten Thrombozyten (25.000/ μ l) nach Aktivierung mit HNP1 für 15 Minuten. Die durchflußzytometrische Detektion erfolgt mit Hilfe von FITC-gekoppeltem anti-CD62P-Antikörpern. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm -S.D. (n=3)

3.1.7. „Dense-bodies“-Sekretion

Die „dense-bodies“ verschmelzen wie die α -Granula aktivierungsabhängig mit der Plättchenplasmamembran. Dabei wird u.a. CD 63 auf der Plättchenoberfläche exprimiert und die Granulainhaltsstoffe sezerniert. Die CD 63-Expression wurde mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen CD 63 detektiert. Abb 3-16 zeigt, dass auch die Expression von CD63 auf Plättchen nach Defensinaktivierung dosisabhängig zunimmt.

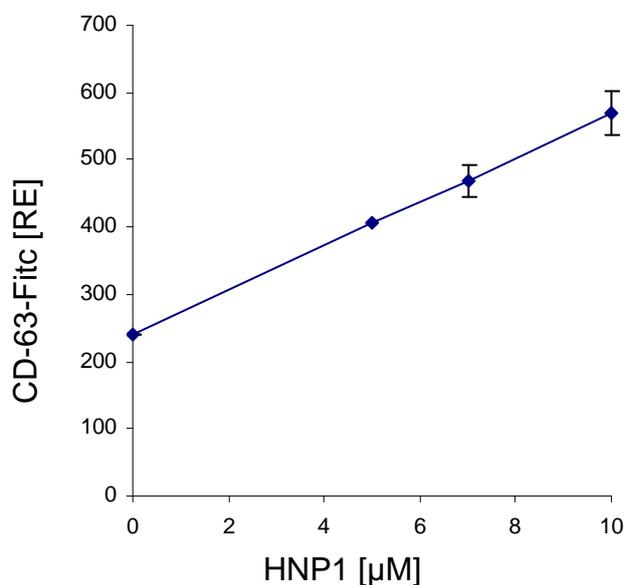


Abbildung 3-16 CD63-Expression auf gelfiltrierten Plättchen (25.000/ μ l) nach Aktivierung mit HNP1 für 15 Minuten. Die durchflußzytometrische Detektion erfolgte mit Hilfe von FITC-gekoppeltem anti-CD63-Antikörper. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm -S.D. (n=3)

3.1.8. Bindung des TSP-1 an die Plättchenoberfläche

Das quantitativ bedeutendste Protein, welches bei der Plättchenaktivierung in großen Mengen ausgeschüttet wird, ist Thrombospondin-1. Bekannt als Brückenprotein zwischen Monozyten und Thrombozyten wurde untersucht, ob das Adhäsionsprotein TSP-1 nach der Aktivierung der Thrombozyten mit HNP-1 an deren Oberfläche bindet. Dazu wurden gelfiltrierte Thrombozyten aus Citratblut auf 25.000/μl eingestellt und FITC konjugiertes TSP-1 in einer Konzentration von 50 μg/ml nach 15 minütiger Aktivierung mit HNP-1 zugegeben. Die Bindung von TSP-1 wurden anschließend durchflusszytometrisch ermittelt.

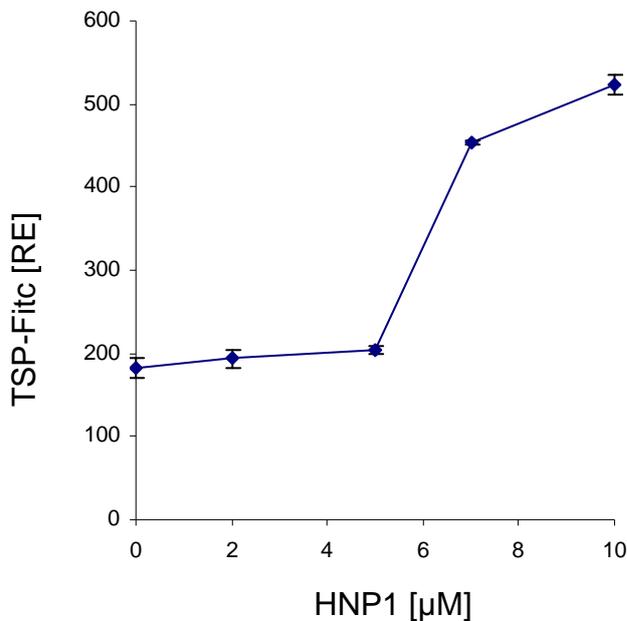


Abbildung 3-17 zeigt die Bindung von extern zugesetztem, direkt markiertem TSP-1 an Thrombozyten. HNP-1 induzierte nach Aktivierung die Bindung des zugegebenen Thrombospondin-1 dosisabhängig. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm -S.D. (n=3)

3.1.9. CD40 Ligand Expression der Thrombozyten

CD40 Ligand kann unter bestimmten Bedingungen bei der Thrombozytenaktivierung auf deren Oberfläche gelangen. Die Interaktion von CD40 und CD40 Ligand (CD40L) spielt bei Entzündungen eine Rolle als Verbindung zur adaptiven Immunität.

So stimuliert es beispielsweise dendritische Zellen, B-Zellen und Endothelzellen. Es wurde untersucht, ob HNP 1 eine CD40 Ligand Expression auslösen kann.

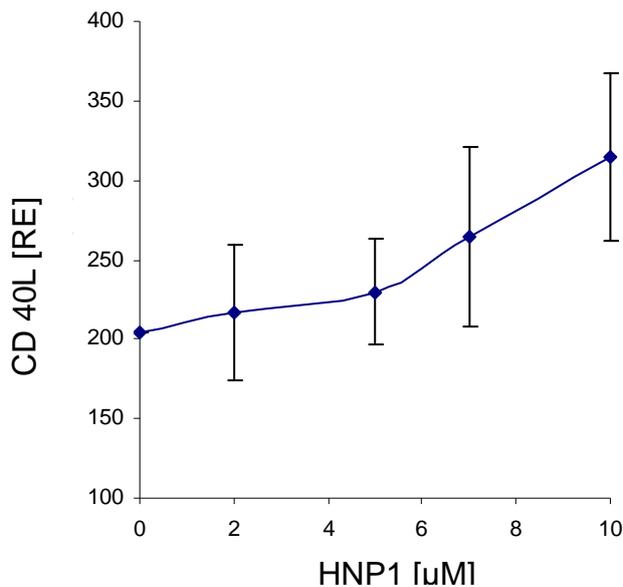


Abbildung. 3-18: HNP1[μM] induziert die CD40L Expression auf Thrombozyten. Thrombozyten aus Citratblut wurden auf 25.000/ μl eingestellt. Die Aktivierung mit HNP wurde für 15 Minuten im Bereich von 0-10 μM durchgeführt und anschließend wurde der PE-makrierte anti CD40L zur Detektion der CD40L Expression zugesetzt. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm -S.D. (n=3)

Abbildung. 3-18 zeigt die Anbindung des Antikörpers gegen CD40 Ligand auf der Plättchenoberfläche in Abhängigkeit von der Plättchenaktivierung durch HNP-1. Die Signalhöhe zeigt eine vollständige CD40L Expression auf der Oberfläche der Plättchen.

3.1.10. Ausbildung des prokoagulanten Zustands

Aktivierte Plättchen schaffen für die Bindung von Gerinnungsfaktoren eine prokoagulante Oberfläche. Die Bindung der Faktoren Xa und Va spiegelt die Ausprägung der prokoagulanten Oberfläche wieder.

Wird die Thrombozytenoberfläche prokoagulant, nimmt der Anteil an negativ geladenen Phosphatidylserinen auf der äußeren Seite der Plasmamembran durch ein „flip flop“ der Phospholipide in der Membran zu.

Die Bindung von Annexin V an das durch den „flip flop“ expositionierte Phosphatidylserin ist somit ein Hinweis dafür, dass die Thrombozytenoberfläche prokoagulant geworden ist und somit die sekundäre Hämostase eingeleitet wird.

Es wurde untersucht, ob der Einfluss von HNP-1 die Thrombozytenoberfläche prokoagulant macht.

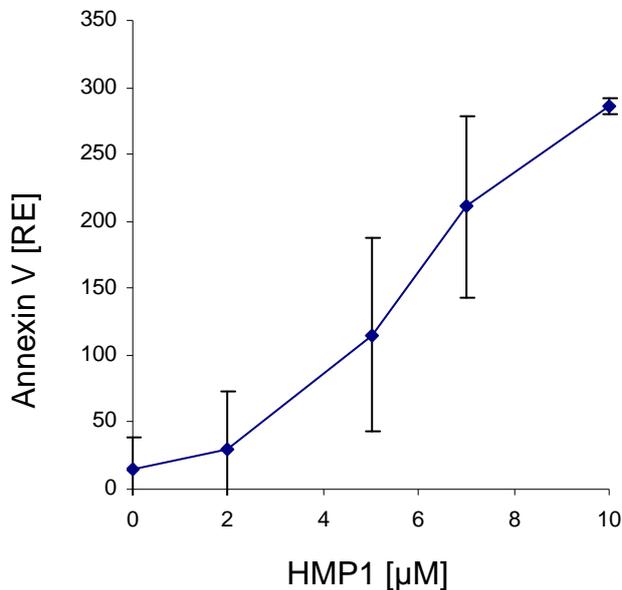


Abbildung 3-19:Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltriert und auf 100.000/µl eingestellt. Die Aktivierung mit HNP1 wurde für 15 Minuten im Bereich von 0-10 µM unter Schütteln durchgeführt, danach wurde für 15 Minuten bei leichtem Schwenken Annexin V FITC zugegeben. Die Bindung des Annexin V auf der Thrombozytenoberfläche wurde im Durchflusszytometer gemessen, n=3.

Abbildung 3-19 veranschaulicht, wie HNP-1 dosisabhängig die Annexin V Bindung an Plättchen induziert und somit die Plättchenoberfläche in einen prokoagulanten Zustand überführt.

Die prokoagulatorische Oberfläche stellt Bindungsstellen für den Prothrombinasekomplex zur Verfügung. Der Komplex setzt sich aus dem aktivierten Faktor V (FVa), dem Faktor Xa und Prothrombin zusammen. Durch diese Komplexbildung kann Prothrombin effizient zu Thrombin gespalten werden.

Neben der Annexinbindung wurde die Bindung von Gerinnungsfaktoren auf der Plättchenoberfläche untersucht, nachdem diese mit HNP1 inkubiert wurden.

HNP1 induziert, wie Abbildung 3-20 zeigt, auch die Bindung von Faktor Xa und Faktor VIII in dosisabhängiger Weise. Die Aktivierung mit HNP1 versetzt die Thrombozyten also vollständig in den prokoagulanten Zustand.

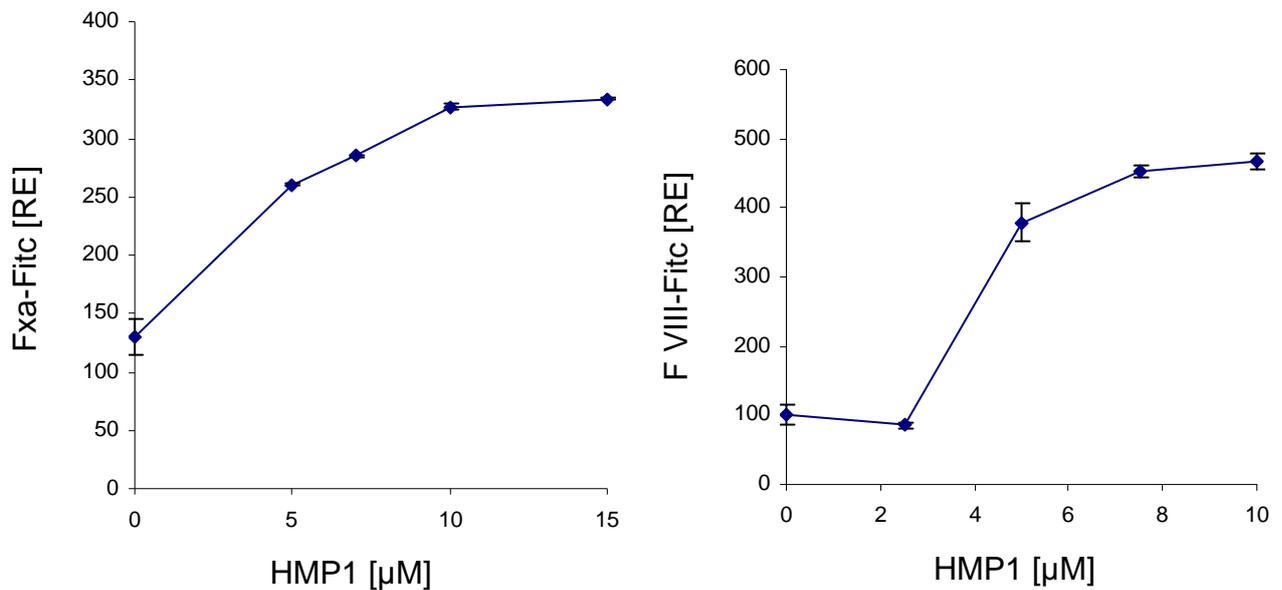
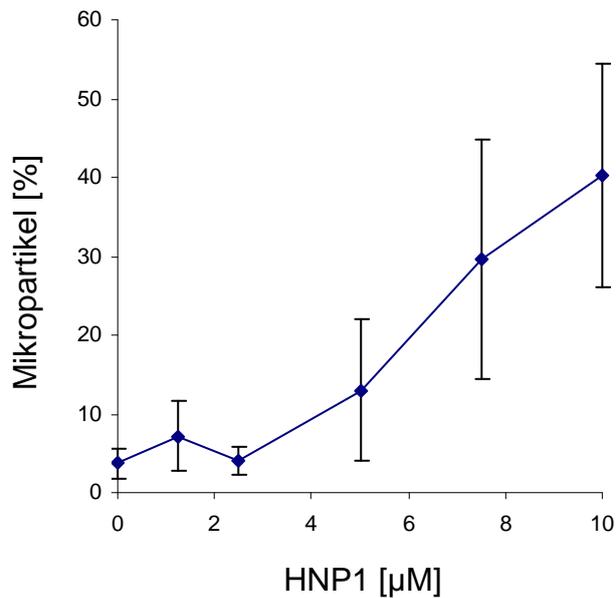


Abbildung 3-20: HNP induziert die Faktor Xa und VIII-Bindung an Thrombozyten. Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltrierte und auf 100.000/μl eingestellt. Ihnen wurde 1 U/ml Faktor Xa-FITC oder 1 U/ml Faktor VIII-FITC zugesetzt. Der Puffer, in dem die Thrombozyten vorlagen, enthielt 6 mM Ca²⁺. Die Aktivierung mit HNP für 15 Minuten im Bereich von 0-10 μM wurde unter Schütteln durchgeführt. Nach Zugabe von 500 μl Puffer (+ 6 mM Ca²⁺) wurde die Anbindung der Faktoren im Durchflusszytometer gemessen. n=3.

3.1.11. Mikropartikelformation

Werden Blutzellen voll durchaktiviert, kann es zur Bildung von Mikropartikeln kommen. Aufgrund der starken Thrombozytenaktivierung durch HNP1-3 wurde daher untersucht, ob diese auch die Bildung solcher Partikel induzieren. Dazu wurden gelfiltrierte Thrombozyten (25.000/μl) mit HNP-1 inkubiert. Die gebildeten Thrombozytenmikropartikel wurden im Durchflusszytometer durch Eingrenzen der intakten Zellen und der kleineren entstandenen Partikel nach deren spezifischer Markierung mit einem anti GPIV-Fitc markiertem Antikörper (Klon Beb1) prozentual bestimmt.

a)



b)

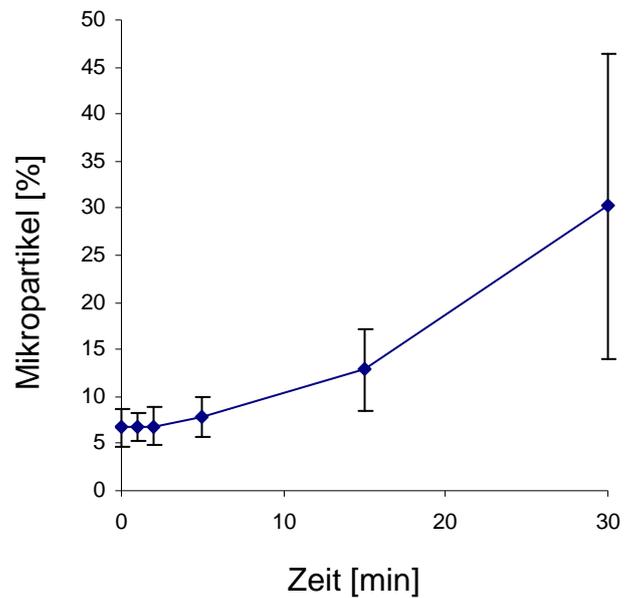


Abbildung 3-21 a): HNP1-3 induzierte die Thrombozyten-Mikropartikel Bildung. Gelfiltrierte Thrombozyten ($25.000/\mu\text{l}$) wurden mit HNP-1 für 15 min aktiviert und einerseits die intakten Thrombozyten, andererseits die gebildeten, markierten Mikropartikel quantifiziert. Die % stellen hierbei den Anteil der Mikropartikel der Gesamtpartikel dar.

Abbildung 3-21 b) zeigt die Thrombozytenmikropartikelbildung durch HNP-1 in Abhängigkeit von der Aktivierungszeit. Je länger HNP-1 auf die Thrombozyten einwirkt, desto mehr Mikropartikel entstehen. $n=3$.

3.1.12. Untersuchungen zum Einfluß von HNP 1-3 im Citrat-antikoaguliertem Vollblut

Leukozyten und Thrombozyten können unter bestimmten Aktivierungsbedingungen Assoziate bilden (s. Einleitung). Um den Einfluß von HNP auf die Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten zu beobachten, wurde HNP-1 als Agonist eingesetzt.

Damit die Bedingungen für die Assoziationsstudien den in vivo-Verhältnissen nahe kamen, wurden die entsprechenden Experimente direkt im Citrat-Vollblut durchgeführt.

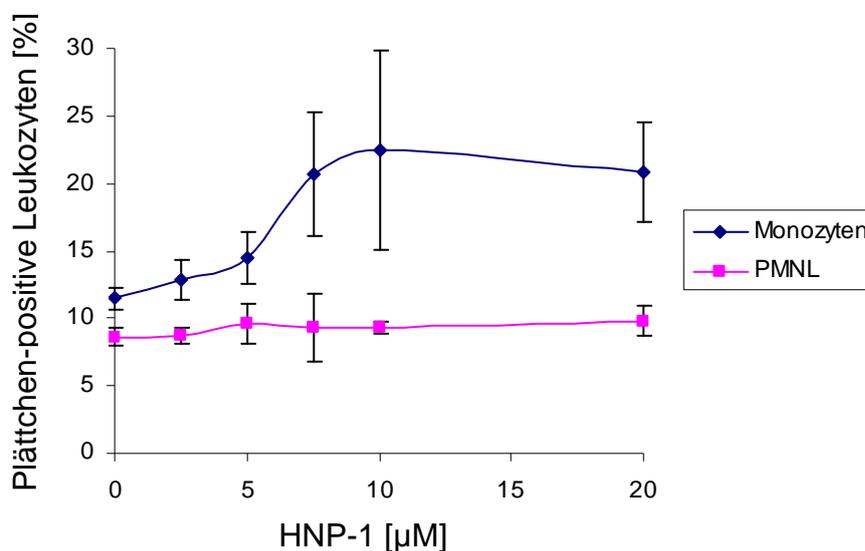


Abbildung. 3-22: HNP-1 induzierte Plättchen-Monozyten-Assoziation im Citrat-antikoaguliertem Vollblut. Eine Plättchen-PMNL-Assoziation zeigte sich nicht. Zur Identifizierung der Zellen im FACS wurden die Monozyten mit einem FITC-konjugierten Monozyten-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen CD 14 ($5\mu\text{l}/\text{Probe}$) und die Plättchen mit einem Plättchen-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen CD42a ($5\mu\text{l}/\text{Probe}$) markiert. Die PMNL wurden durch spezifische Streulichteigenschaften im SSC-Fenster von den anderen Leukozyten unterschieden. Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert der prozentualen Anteile Plättchen-tragender Leukozyten. $n=3$

Aus Abbildung 3-22 wird ersichtlich, dass eine Stimulierung durch HNP-1 zu einem deutlichen dosisabhängigen Zuwachs der Plättchen-positiven Monozyten führt. Ein Anstieg der Plättchen positiven PMNLs hingegen war nicht zu beobachten.

3.2. Einfluß verschiedener Proteine auf die HNP induzierten Plättchenaktivierung

3.2.1. Einfluß von ATIII auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung

Antithrombin III (ATIII) ist der wichtigste Inhibitor der Serinproteasen. Er hat eine besonders starke Affinität zu Thrombin und bindet auch HNP-1.

Um den Einfluß von ATIII auf die HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung anzuschauen, wurden die Plättchen mit ATIII vorinkubiert und anschließend mit HNP-1 aktiviert. Abbildung 3-23 zeigt den deutlich hemmenden Effekt von ATIII auf die durch HNP hervorgerufene Fibrinogenbindung an Plättchen.

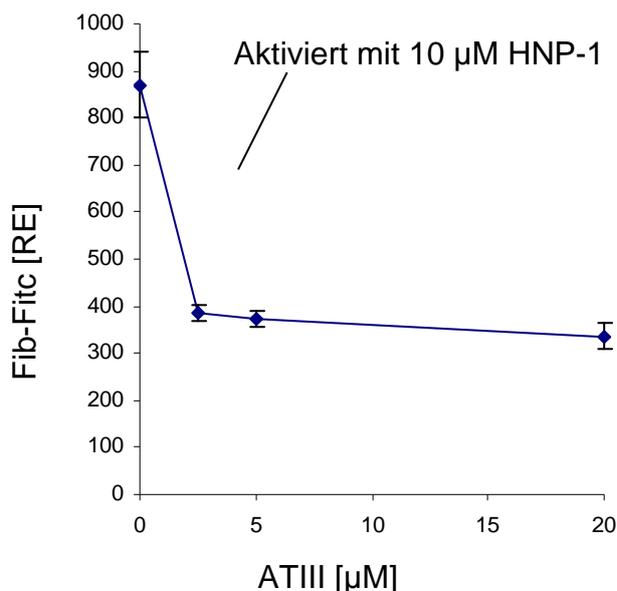


Abbildung 3-23: ATIII hemmt die HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung. Thrombozyten aus Citratblut wurden gefiltert, auf 25.000/µl eingestellt und anschließend mit ATIII in unterschiedlichen Konzentrationen für 5 Minuten vorinkubiert. Die Aktivierung mit HNP wurde für 15 Minuten mit 10 µM durchgeführt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer wurde die Fibrinogenbindung im Durchflusszytometer gemessen, n=3

Der Inhibierungseffekt wurde mittels dosisabhängiger Titrations (sog. Schachbrett Titration) ermittelt. ATIII hemmt die HNP-1 Wirkung etwa im äquimolaren Bereich vollständig.

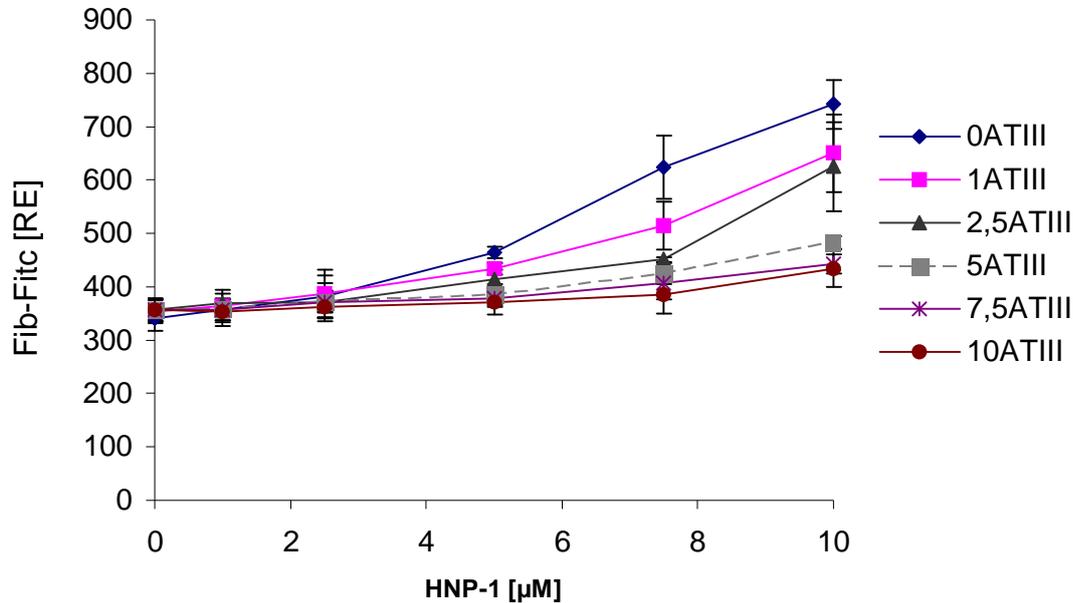


Abbildung 3-24: ATIII (0-10 µM) hemmt die HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung dosisabhängig, n=3

Die antikoagulatorische Wirkung von ATIII auf Thrombin wird von Heparin beschleunigt und verstärkt, indem es sowohl Thrombin als auch ATIII bindet^{cxlii}.

Ob Heparin (Fragmin) auch einen Einfluß auf die hemmende Wirkung von ATIII bei der HNP-1 induzierten Plättchenaktivierung nimmt, wurde durch vergleichende Koinkubation von ATIII mit und ohne Heparin an gefilterten Plättchen untersucht.

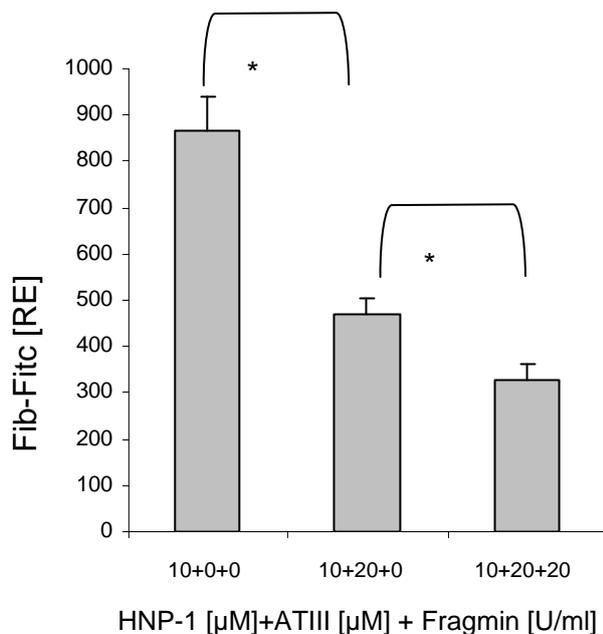


Abbildung 3-25: Die hemmende Wirkung des ATIII wird durch Heparin verstärkt. Thrombozyten aus Citratblut wurden gelfiltriert auf 25.000/ μ l eingestellt und anschließend sowohl ohne ATIII, mit ATIII(20 μ M) und mit ATIII (20 μ M) und Heparin (Fragmin 20 U/ml) für 5 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit 10 μ M HNP1 für 15 min aktiviert. Nach Zugabe von 500 μ l Puffer wurde die Fibrinogenanbindung im Durchflusszytometer gemessen, n=3. * =P<0,05

Die Abbildung 3-25 zeigt zum einen die signifikante Hemmung der HNP-1 induzierten Fibrinogenbindung an Thrombozyten durch ATIII und zum anderen, wie diese Hemmung nochmals signifikant gesteigert wird.

3.2.2. Einfluß von Hirudin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung

Hirudine sind direkte Thrombininhibitoren, die früher aus dem medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*) gewonnen wurden und heute meist rekombinant hergestellt werden. Hirudin geht mit Thrombin einen 1:1 stöchiometrischen Komplex ein.

Um zu sehen, ob die durch HNP induzierte Plättchenaktivierung über den Thrombinweg erfolgt und deshalb von ATIII inhibiert werden kann, wurden die gelfiltrierten Plättchen mit Hirudin vorinkubiert und anschließend mit HNP-1 aktiviert.

Die Ergebnisse zeigten, dass Hirudin die Plättchenaktivierung durch HNP nicht hemmt.

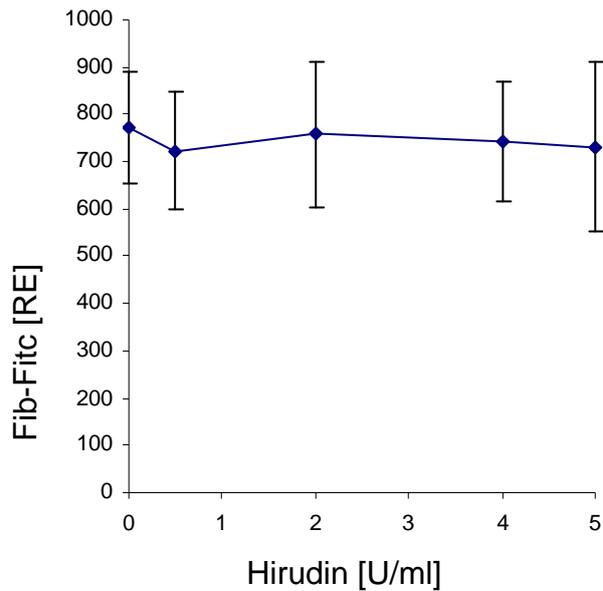


Abbildung 3-26 Die mit 10 μM HNP1 induzierte Thrombozytenaktivierung wird durch Hirudin nicht gehemmt. Gelfiltrierte Thrombozyten ($25.000/\mu\text{l}$) wurden 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hirudin (0-5 U/L) vorinkubiert und anschließend mit HNP 1 für 15 min aktiviert. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3)

3.2.3. Einfluß von alpha 2 Makroglobulin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung

α_2 –Makroglobuline gehören wie ATIII zu den Serinproteaseinhibitoren. Der Einfluß von α_2 Makroglobulin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung wurde untersucht.

Dazu wurden gelfiltrierte Plättchen 5 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen an α_2 Makroglobulin (0-1 μM) vorinkubiert und anschließend mit 10 μM HNP-1 aktiviert.

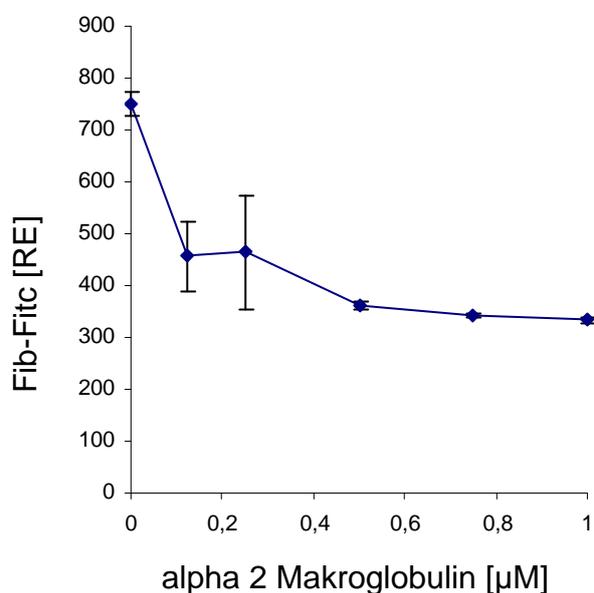


Abbildung 3-27: α_2 -Makroglobulin hemmt die mit 10 μM HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung. Gelfiltrierte Plättchen ($25000/\mu\text{l}$) wurden mit Konzentrationen von 0-1 μM α_2 Makroglobulin für 5 Minuten vorinkubiert und anschließend mit je 10 μM HNP1 aktiviert. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3)

3.2.4. Einfluß von α 1 Antitrypsin

Ein weiterer Serinproteaseinhibitor ist das α 1- Antitrypsin. Auch hier wurde der Einfluß auf die HNP induzierte Plättchenaktivierung überprüft und ebenfalls eine komplette Inhibition festgestellt.

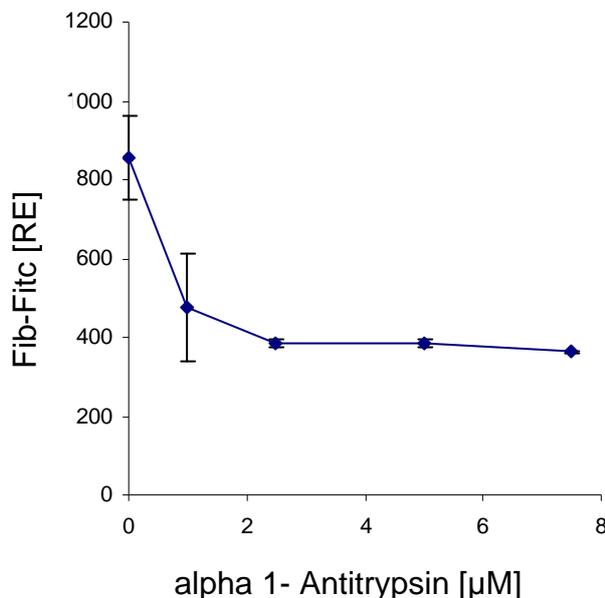


Abbildung 3-28: Die mit 10 μ M HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung wird durch α 1Antithrombin komplett gehemmt. Gelfiltrierte Plättchen (25000/ μ l) wurden 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von α 1 Antitrypsin (0-7,5 μ M) vorinkubiert und anschließend mit 10 μ M HNP-1 aktiviert. Die Fibrinogenbindung wurde nach 15minütiger Aktivierung und anschließender Zugabe von Puffer gemessen. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D.(n=3)

Die Dosisabhängigkeit dieser Inhibition wurde mittels „Schachbrettitration“ ermittelt. Dazu wurden Thrombozyten aus Citratblut gelfiltrierte und auf 25.000/ μ l eingestellt, anschließend wurden sie mit alpha 1 Antitrypsin in Konzentrationen von 0-10 μ M für 5 min vorinkubiert. Die Aktivierung mit HNP wurde für 15 Minuten im Bereich von 0-10 μ M durchgeführt und nach Zugabe von 500 μ l Puffer wurde die Fibrinogenanbindung im Durchflusszytometer gemessen.

Dabei zeigte sich (Abbildung 3-29), dass α 1-Antitrypsin die HNP Wirkung dosisabhängig hemmte. Diese Hemmung ist verglichen mit der Hemmung durch ATIII jedoch nicht vollständig.

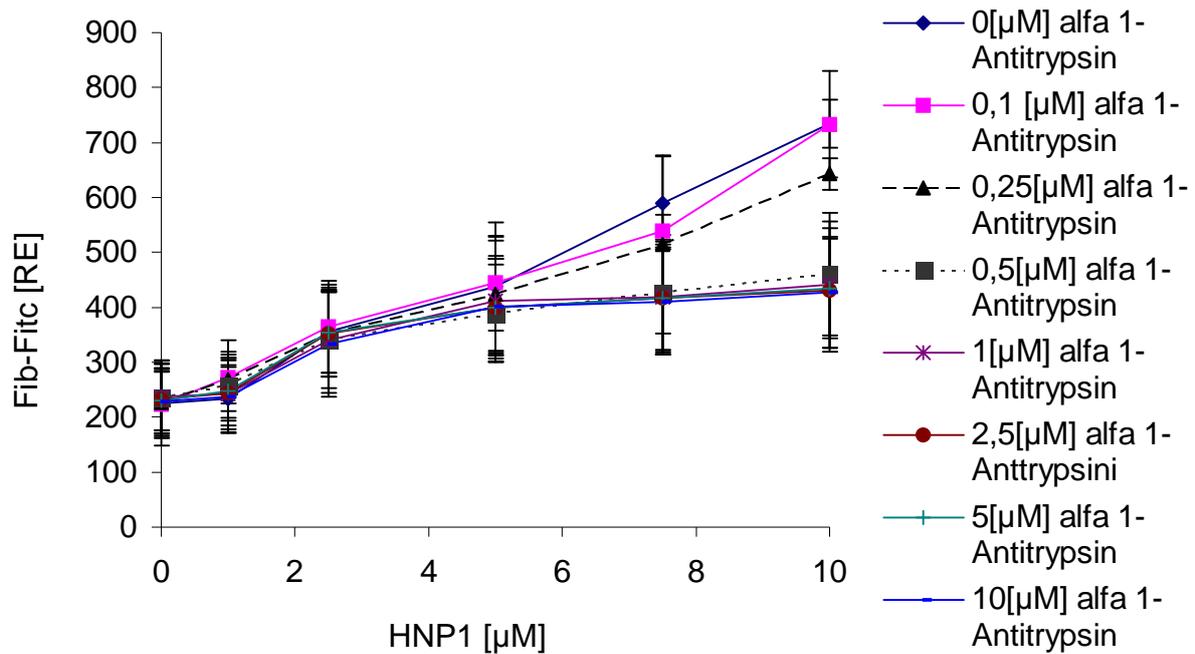


Abbildung 3-29: Schachbretttitration mit α 1-Antitrypsin. α 1-Antitrypsin hemmt dosisabhängig die HNP induzierte Fibrinogebindung an Thrombozyten. Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3)

3.2.5. Einfluß von Adhäsionsproteinen

Thrombospondin und Vitronektin sind matrixzelluläre Proteine. Sie sind unter anderem in den α Granula der Thrombozyten gespeichert und werden bei deren Degranulation sezerniert.

Der Einfluß von Thrombospondin und Vitronektin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung wurde untersucht. Dazu wurden gefilterte Plättchen mit dem entsprechenden Protein vorinkubiert und anschließend mit HNP aktiviert. Nach Zugabe von Puffer wurde die Fibrinogenanbindung im Durchflusssystem ermittelt.

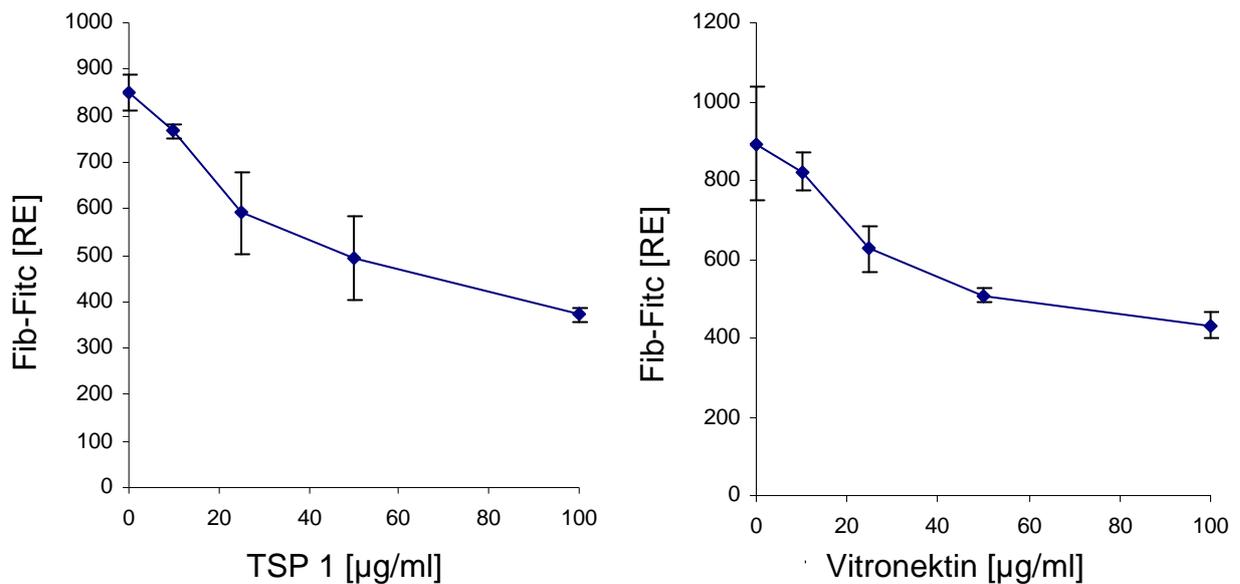


Abbildung 3-30:Thrombospondin –1 und Vitronectin hemmen die Thrombozytenaktivierung durch HNP-1. Gelfiltrierte Plättchen (25000/µl) wurden 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen TSP-1 und Vitronectin (0-1000 µg/ml) vorinkubiert und anschließend mit 7,5 µM HNP-1 aktiviert. Die Fibrinogenbindung wurde nach 15 minütiger Aktivierung und anschließender Zugabe von Puffer direkt durchflusszytometrisch gemessen. n=3

3.2.6. Einfluß von Prostaglandinen

Iloprost ist ein synthetisches Prostaglandin-Analogon. PGE-1 ist ein natürlich vorkommendes Prostaglandinderivat.

Beide induzieren durch die Aktivierung der Adenylatcyclase den intrazellulären Anstieg des second messengers cAMP/cGMP. Diese zyklischen Mononukleotide wirken durch verminderte IP3 Synthese und Calciummobilisierung inhibierend auf die Plättchenaktivierung.

Um den Einfluß dieses Signaltransduktionsweges auf die Thrombozytenaktivierung durch HNP 1 zu untersuchen, wurden gelfiltrierte Plättchen mit dem entsprechenden Prostaglandin in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert.

Es folgte die Aktivierung mit 5 μM HNP-1 und die Messung der Fibrinogenanbindung im Durchflusszytometer. Beide Prostaglandine zeigten eine dosisabhängige Inhibierung der HNP induzierten Plättchenaktivierung.

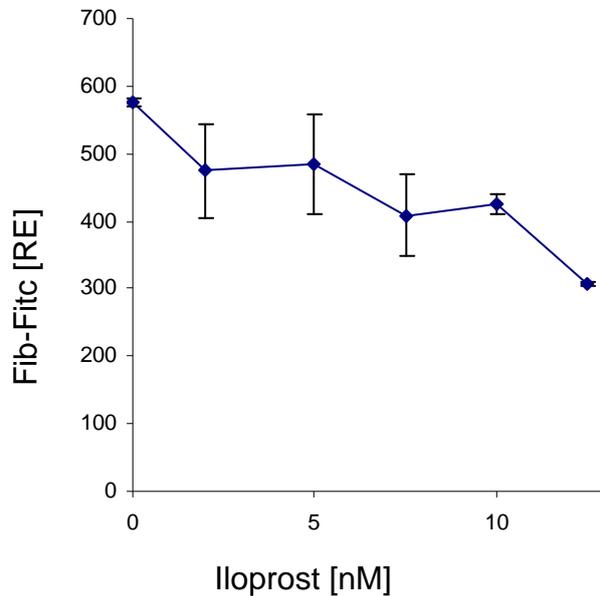


Abbildung 3-31: Iloprost hemmt die Thrombozytenaktivierung durch HNP-1. Gelfiltrierte Plättchen (25000/ μl) wurden 5 min mit Iloprost (0-12,5 nM) vorinkubiert und anschließend mit 5 μM HNP-1 für 15 min aktiviert. n=3

Abbildung 3-31 und 3-32 zeigen, wie die Fibrinogenbindung an durch HNP aktivierte Plättchen mit steigenden Konzentrationen von Iloprost und auch von PGE1 sukzessive abnimmt. Die Induktoren des cAMP Inhibitionswegs konnten die HNP1 induzierte Plättchenaktivierung dosisabhängig hemmen.

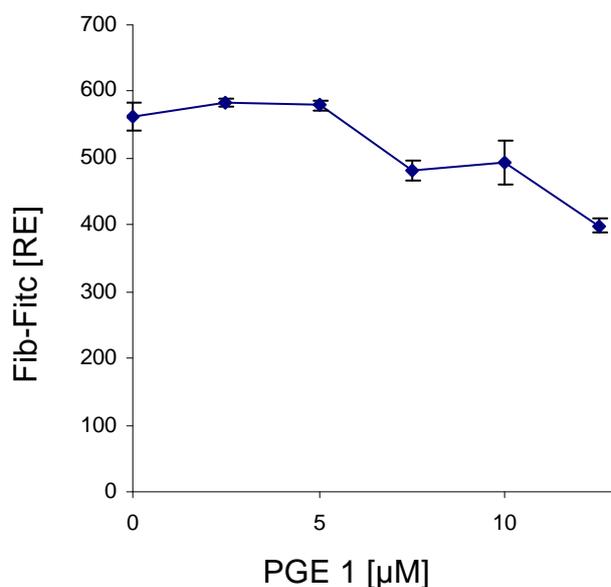


Abbildung 3-32: PGE-1 hemmt die Thrombozytenaktivierung durch HNP-1 dosisabhängig. Gelfiltrierte Plättchen (25000/ μl) wurden 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen PGE-1 (0-12,5 μM) vorinkubiert und anschließend mit 5 μM HNP-1 aktiviert. Die Fibrinogenanbindung wurde nach 15 minütiger Aktivierung und anschließender Zugabe von Puffer direkt durchflusszytometrisch gemessen. n=3

3.2.7. Einfluß von Albumin

Albumin ist das Hauptplasma protein im Blut. Der Einfluß von Albumin auf die HNP-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde nach Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Albumin und anschließender Aktivierung mit HNP-1 durchflußzytometrisch ermittelt. Auch durch diese Behandlung erfolgte eine dosisabhängige Hemmung der HNP-vermittelten Thrombozytenaktivierung.

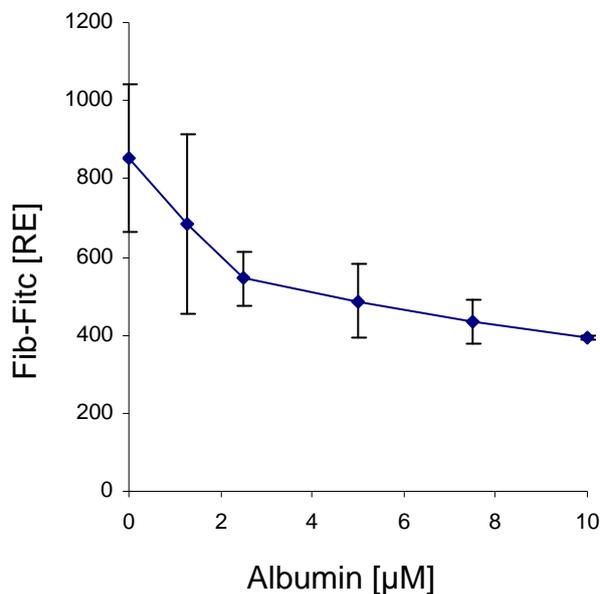


Abbildung 3-33: Albumin hemmt die Thrombozytenaktivierung durch HNP-1. Gelfiltrierte Plättchen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Albumin (0-10 μM) für 5 min vorinkubiert und anschließend 15 min mit 10 μM HNP-1 aktiviert. Die Fibrinogenbindung wurde durchflußzytometrisch gemessen. n=3

3.2.8. Einfluß von Bacitracin

Bacitracin ist ein Antibiotikum, welches aufgrund seiner starken Nephrotoxizität hauptsächlich äußerlich Anwendung findet. Es inhibiert die Protein Disulfid Isomerase (PDI). Dieses Enzym ist für die Disulfidbrückenbildung und damit auch für die Proteinfaltung essentiell. Da HNP1-3 in ihren Molekülen viele Disulfidbrücken haben und desweiteren auf der Thrombozytenoberflächen Protein Disulfid Isomerasen z.B als Affinitätsmodulatoren des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ dienen, wurde der Einfluß von Bacitracin auf die HNP induzierte Thrombozytenaktivierung untersucht.

Gelfiltrierte Plättchen wurden 5 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen Bacitracin vorinkubiert. Dann wurde 7,5 μM HNP-1 zugeführt. Auch hier wurde eine dosisabhängige Hemmung erzielt.

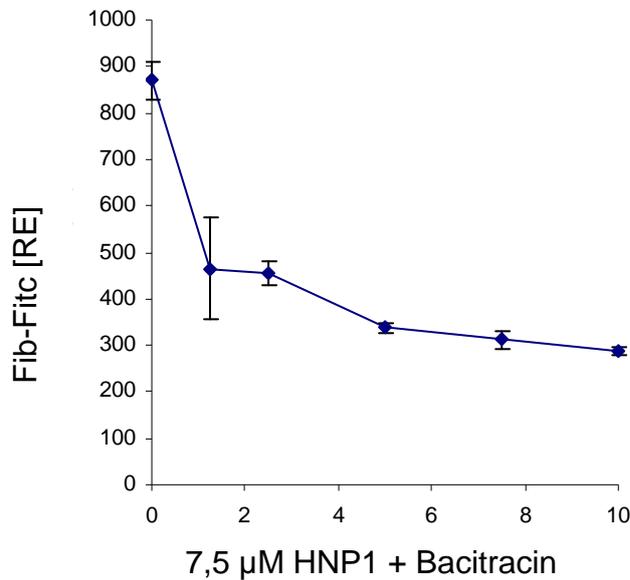


Abbildung 3-34: Bacitracin [μM] hemmt die HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung. 7,5 μM HNP-1 wurden zu gelfiltrierten Plättchen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen Bacitracin (0-10 μM) vorinkubiert wurden, zugeführt. Anschließend wurde die Fibrinogenbindung durchflußzytometrisch bestimmt. n=3

Da die Bindung von Fibrinogen an Plättchen durch Affinitätsmodulation des Integrins ebenfalls PDI abhängig ist wurde der Einfluß von Bacitracin auf die Aktivierung der Plättchen durch HNP-1 auch auf andere aktivierungsabhängige Faktoren der Plättchen wie die „alpha Granula“ und „dense body „ Sekretion sowie die Mikropartikelbildung untersucht. Es zeigte sich , dass Bacitracin auch die CD62 und CD63 Expression hemmt.

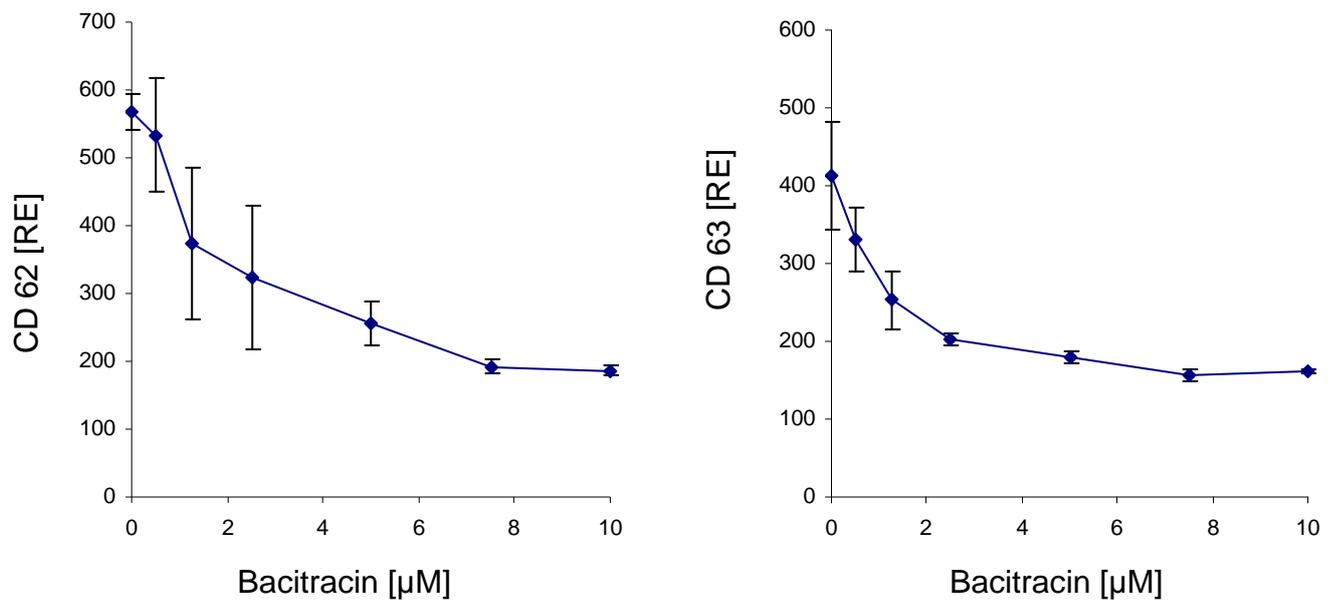


Abbildung 3-35: Die CD62- und CD63-Expression auf gelfiltrierten Plättchen (25.000/ μ l) induziert durch HNP-1 wird ebenfalls durch Bacitracin inhibiert. Nach Inkubation der Plättchen mit unterschiedlichen Konzentrationen Bacitracin (0-10 μ M) wurde für 15 Minuten mit HNP-1 aktiviert. Die durchflußzytometrische Detektion erfolgt mit Hilfe von FITC-gekoppeltem anti-CD62-bzw CD63-Antikörper. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane \pm S.D. (n=3)

α -Defensin kann Plättchen zur Bildung von Mikropartikeln veranlassen (s.o.). Es wurde untersucht, ob die Bildung dieser Partikel induziert durch HNP-1 durch Bacitracin beeinflusst werden kann. Dazu wurden gelfiltrierte Thrombozyten (25.000/ μ l) mit Bacitracin in unterschiedlichen Konzentrationen (0-10 μ M) vorinkubiert. Die gebildeten Thrombozytenmikropartikel wurden im Durchflußzytometer durch Eingrenzen der intakten Zellen und der kleineren entstandenen, spezifisch markierten Partikel prozentual bestimmt. Wie Abbildung 3-36 zeigt, wurde auch die Mikropartikelformation durch Bacitracin inhibiert.

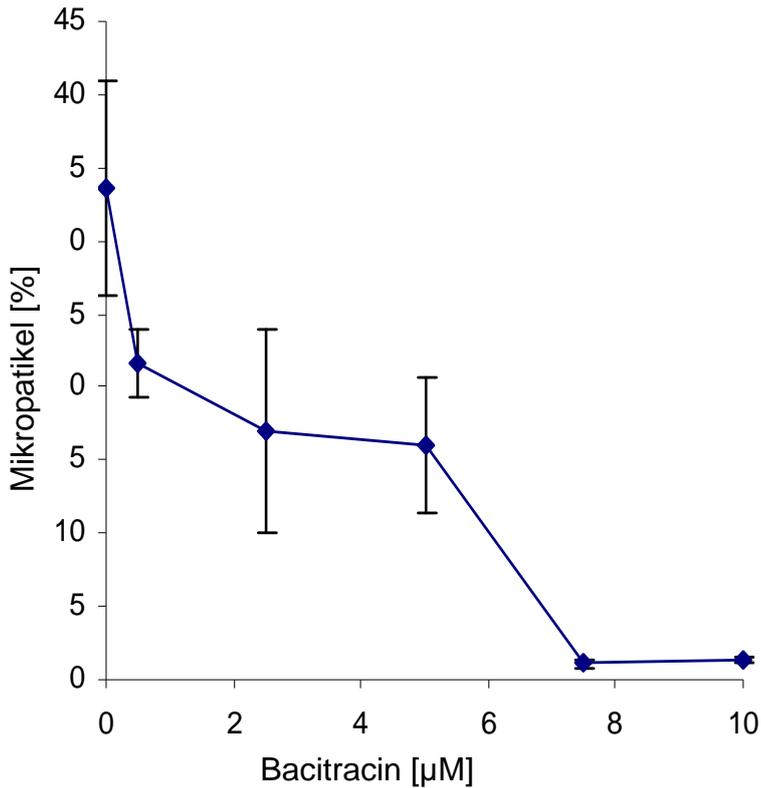


Abbildung 3-36: Bacitracin hemmt die HNP1 induzierte Thrombozyten-Mikropartikel Bildung. Nach Inkubation von gelfiltrierten Plättchen mit unterschiedlichen Konzentrationen Bacitracin (0-10µM) wurden diese für 15 Minuten mit 10 µM HNP-1 aktiviert. Durch durchflußzytometrische Detektion wurden einerseits die intakten Thrombozyten, andererseits die gebildeten spezifisch markierten Mikropartikel quantifiziert. Aufgetragen sind die gebildeten Mikropartikel in Prozent der eingesetzten intakten Thrombozyten gegen die Bacitracinmenge. n=3

3.3. Elisaverfahren

3.3.1. Abgabe von löslichem CD40L ins Plasma nach Aktivierung von Thrombozyten mit HNP-1

Plättchen können bei der Aktivierung löslichen sCD40L freisetzen. sCD40L stellt einen potenten Stimulus für T- B- und Endothelzellen dar. Welchen Einfluß HNPs auf die Freisetzung des sCD40L aus Thrombozyten haben, wurde mit Hilfe eines Elisaverfahrens untersucht und quantifiziert.

Lösliches CD40L wurde nach Behandlung von gelfiltrierten Plättchen (25000/µl) mit 0, 5 und 15 µM HNP-1 im ELISA quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Freisetzung von sCD40 L anstieg, je mehr HNP zugesetzt wurde.

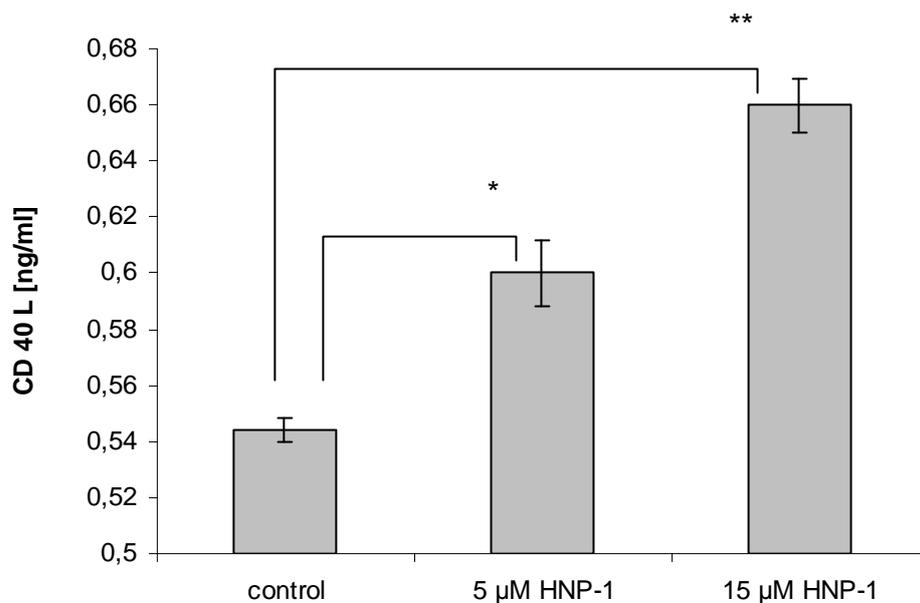


Abbildung 3-37: Die Freisetzung löslichen sCD40 L aus Thrombozyten wird durch HNP-1 verstärkt und nimmt dosisabhängig zu. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der logarithmischen Mediane +/-S.D.(n=3)*=p<0,05, **=p<0,01

3.4. Einfluß von HNP auf die Thrombinbildung in Gegenwart von Thrombozyten

Um den Einfluß von HNP-1 auf die Thrombinbildung, die während der sekundären Hämostase auf der Thrombozytenoberfläche stattfindet, zu beobachten, wurden Kontrollproben mit Thrombozyten (25000/ μ l) ohne HNP-1 sowie Proben mit Thrombozyten und HNP1 in Konzentrationen von 0-20 μ M mit 0,1 U/ml Thrombin voraktiviert. Nach unterschiedlichen Aktivierungszeiten wurde die gebildetete Thrombinmenge auf der Thrombozytenoberfläche unter Nutzung eines chromogenen Substrates quantifiziert.

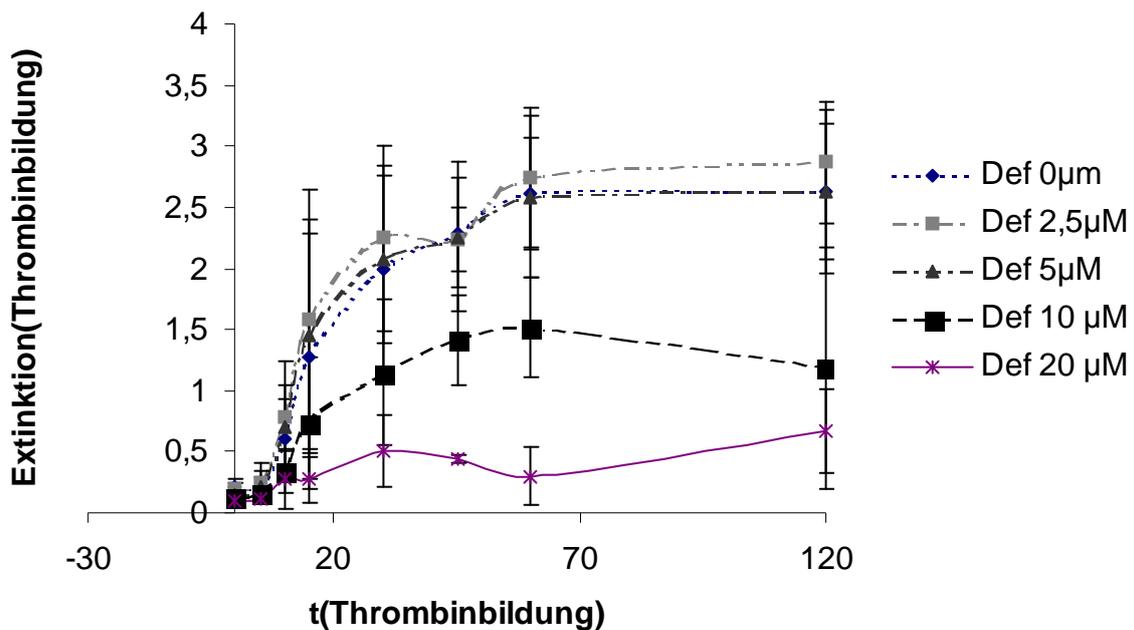


Abbildung 3-38: HNP-1 wurde Plättchen in unterschiedlichen Konzentrationen (0-20 μM) zugesetzt und die Thrombinbildung nach Thrombinvoraktivierung zu unterschiedlichen Zeiten im Assay gemessen (0-120 min). n=3

Dabei wurde, wie Abbildung 3-38 zeigt, beobachtet, dass die Thrombinbildung in Gegenwart hoher Konzentrationen von zugesetztem HNP-1 deutlich geringer ausfiel. Die Thrombinbildung auf der Plättchenoberfläche nahm in Gegenwart von HNP-1, ab einer Konzentration von 10 μM , ab.

3.5. Einfluß von HNP-1 auf Endothelzellen

Durch Mediatoren, die vom entzündeten Gewebe gebildet werden, wie Zytokine, z.B. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) und Interleukin 1 (IL 1) oder vasoaktive Substanzen (z.B. Histamin), werden Endothelzellen aktiviert, so dass sie auf ihrer Oberfläche P-Selektin und E-Selektin aus den Weibel-Palade-Körperchen exprimieren. Diese Membranproteine können mit spezifischen AK quantifiziert werden. Welchen Einfluß HNP-1 alleine und Plättchen zusammen mit HNP-1 auf Endothelzellen haben, wurde an kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. Neben einer Sekretion der Weibel-Palade-Körperchen macht sich eine Aktivierung von Endothelzellen durch einen Membran „flip flop“ bemerkbar, bei dem die negativ geladenen Phospholipide wie Phosphatidylserin auf die Außenseite der Endothelzellen gelangen. Zum Nachweis von Phosphatidylserin auf der äußeren

Schicht der Endothelzellmembran dient Annexin V, das Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserinreste bindet und ein Apoptosemarker ist.

Um den Einfluß von Thrombozyten, HNP-1 sowie von durch HNP-1 aktivierten Thrombozyten auf Endothelzellen zu beobachten, wurden diese mit den jeweiligen Substanzen bzw. Zellen inkubiert und anschließend ihre Reaktion mittels Annexin V und anti-E-Selektin-AK bestimmt. Als Positiv-Vergleich wurden 10 nM TNF α separat ebenfalls mit Endothelzellen inkubiert.

Die Endothelzellen wurden sowohl jeweils mit den Substanzen Medium; 7,5 μM HNP1; gelfiltrierte Plättchen die auf 50 000/ μl eingestellt wurden und gelfiltrierten Plättchen zusammen mit 7,5 μM HNP-1 bzw. 10 nM TNF α für 30 Minuten inkubiert und anschließend deren FITC-Annexin V Anbindung bzw. deren E-Selektin Expression mittels eines spezifischen anti-E-Selektin-Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt.

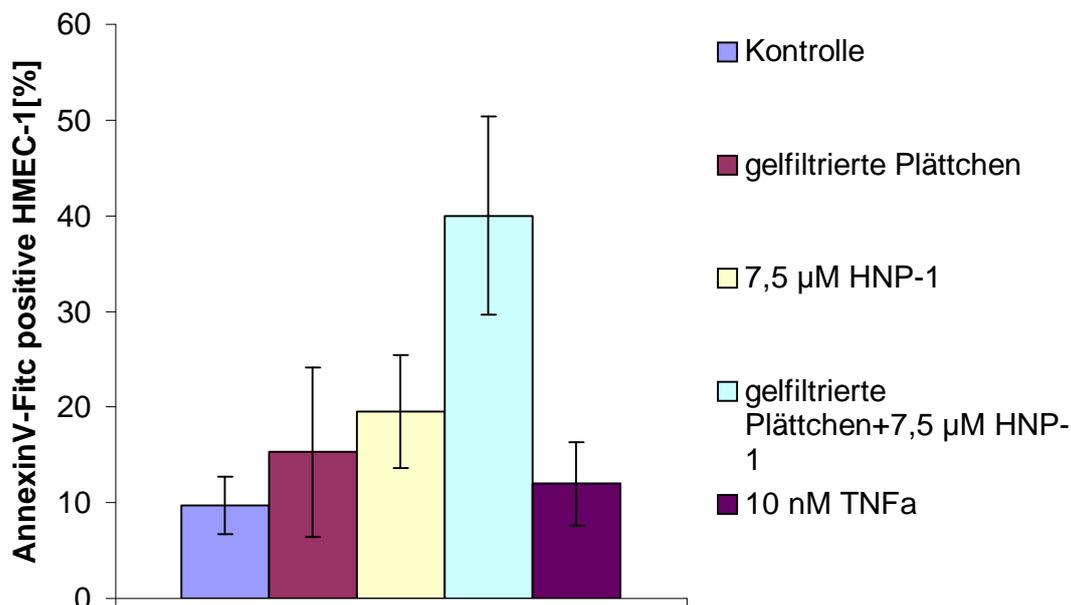


Abbildung 3-39 a): Im Vergleich zum Medium und zur positiv Kontrolle mit 10 nM TNF α kommt es durch den Einfluß von HNP-1 und gelfiltrierten Thrombozyten allein schon zu einer Steigerung der Endothelzellaktivierung, die mittels der Annexin V Bindung erfasst wurde. Wurden HNP-1 und gelfiltrierte Plättchen zusammen mit Endothelzellen inkubiert, so zeigte sich die stärkste AnnexinV Bindung. Die AnnexinV Bindung auf den HMEC-1 wurden dabei in % der gesamten gemessenen HMEC-1 angegeben.

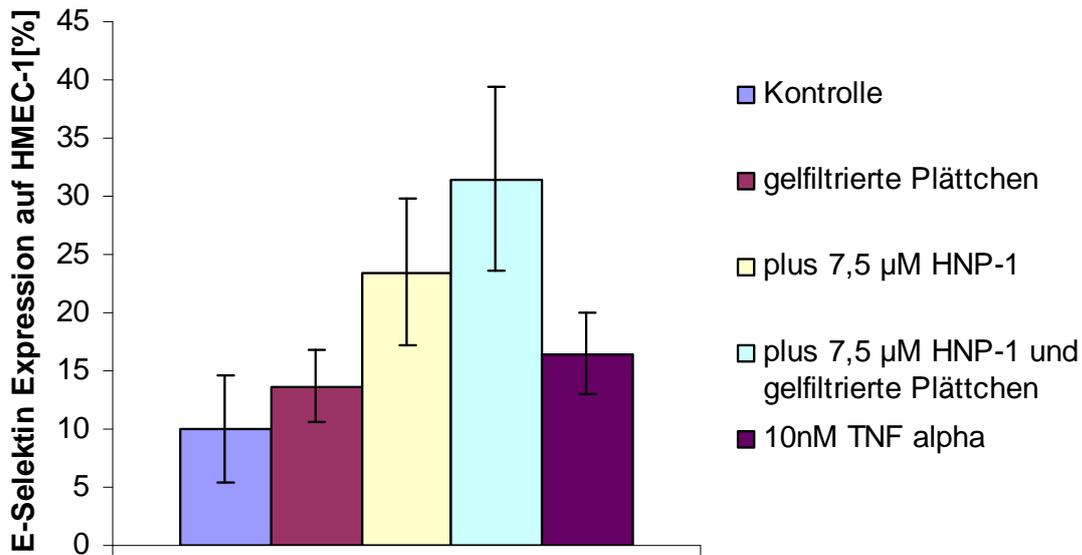


Abbildung 3-39 b): Auch die E-Selektin Expression auf HMEC-1 wird durch HNP-1 induziert. Dieser Effekt wurde mit Plättchen, die mit HNP-1 voraktiviert wurden noch weiter gesteigert. Die Endothelzellaktivierung wurde mittels eines spezifischen anti-E-Selektin-Antikörpers erfasst. Die E-Selektin Expression auf den HMEC-1 wurden dabei in % der gesamten gemessenen HMEC-1 angegeben.

3.5.1. Effekt von C-terminalem TSP-1-Peptid RFYVVMWK

Das C-terminale TSP-1-Peptid RFYVVMWK aktiviert Thrombozyten durch Membranpermeabilisierung. Es wurde untersucht, ob das TSP-1 Peptid und HNP-1 eine additive Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung haben. Es zeigte sich ein deutlich additiver Effekt der RFY Thrombozytenaktivierung durch HNP-1.

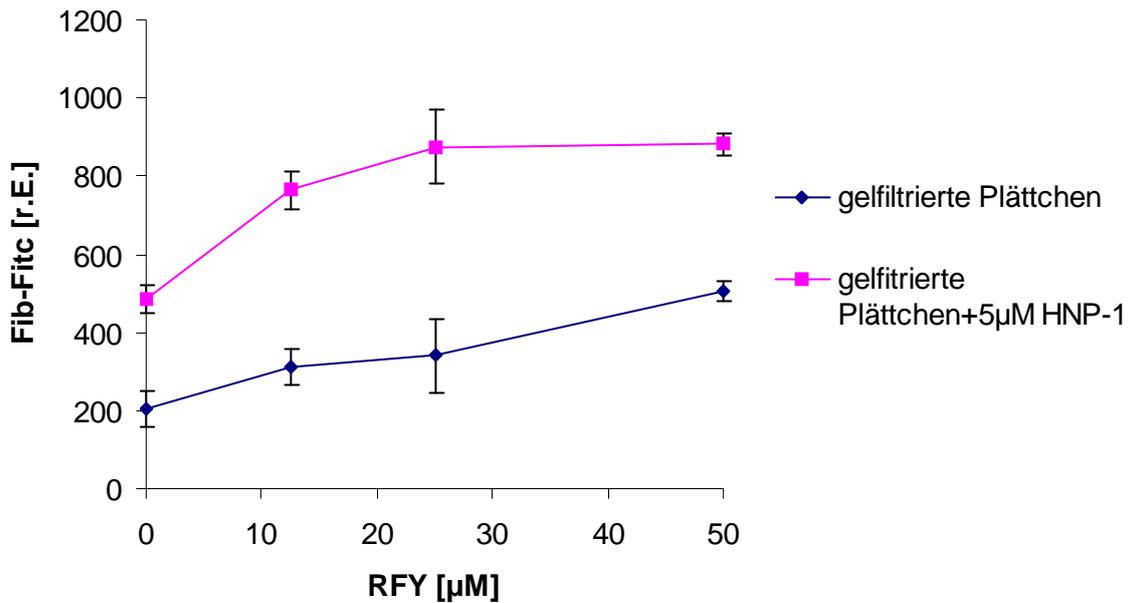


Abbildung 3-40: HNP-1 zeigt einen additiven Effekt zur Plättchenaktivierung durch RFY. Gelfiltrierte Plättchen wurden einmal mit und einmal ohne 5 μM HNP-1 für 5 min vorinkubiert. Anschließend wurde mit dem RFY-Peptid in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 50 μM für 3 min aktiviert. Die Fibrinogenbindung, als Zeichen der Aktivierung wurde nach Zugabe von Puffer durchflusszytometrisch ermittelt. n=3

3.5.2. Einfluß von HNP-1 auf die Permeabilität der Thrombozytenmembran

Mit Calcein AM wurde untersucht, ob HNP die Plättchen möglicherweise durch eine Membranpermeabilisierung aktiviert. Nicht fluoreszierendes Calcein AM passiert die Plättchenmembran problemlos. Durch eine unspezifische Esterspaltung entsteht stark fluoreszierendes Calcein erst im Inneren der Plättchen. Bei Schädigung der Zellmembran kann fluoreszierendes Calcein in die Umgebung freigesetzt werden und die Intensität des Calceinsignals in den Plättchen nimmt ab.

Plättchen wurden auf 25.000 / μl mit HEPES Tyrode verdünnt und 1h lang mit 2 μM Calcein AM bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit HNP-1(0-10 μM) aktiviert und das Calceinsignal detektiert.

Vergleichend wurde der unspezifische kalziumabhängige Plättchenagonist Calcium-Ionophor eingesetzt, der Plättchen durch eine Schädigung der Zellmembran aktiviert. Abbildung 3-41 zeigt wie die Intensität des Calceinsignals in den Plättchen dosisabhängig zu den eingesetzten Agonisten abnimmt. Unter HNP-1 Einfluß fiel das Signal noch deutlicher als durch Calcium Ionophor.

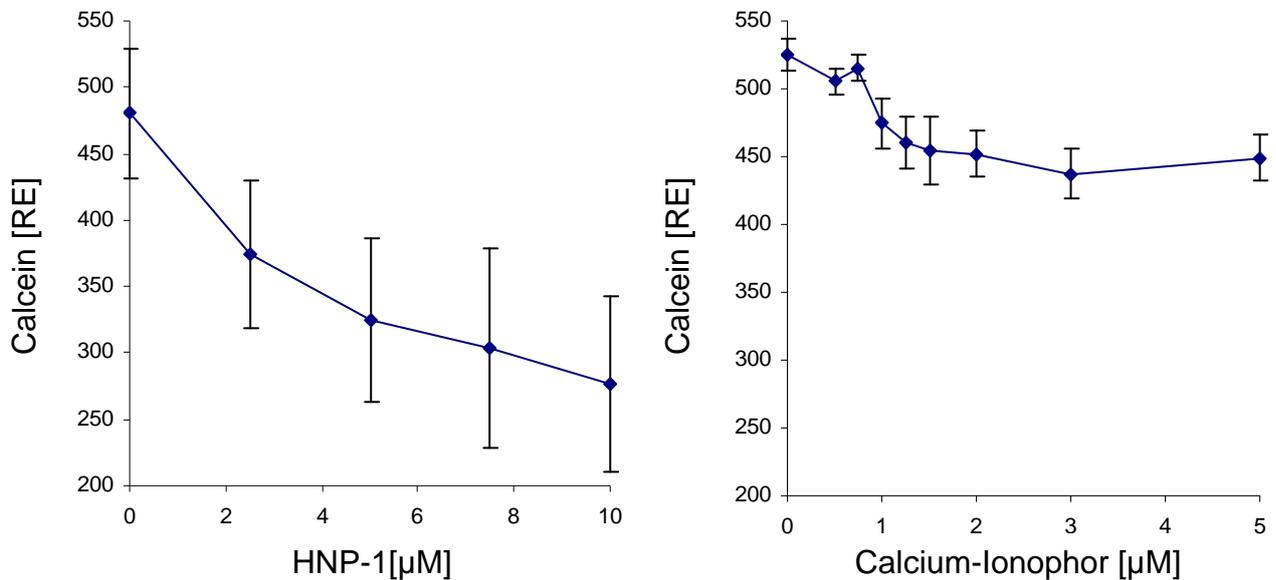


Abbildung 3–41: Calceinsignal in gefiltrierten Plättchen nach Stimulierung mit HNP1 bzw. Calcium-Ionophor. Die Plättchen wurden vor der Agonisten-Behandlung mit 2µm Calcein vorinkubiert. Die Intensität des Calceinsignals in den Plättchen nimmt dosisabhängig durch die Behandlung mit den eingesetzten Agonisten ab. Die Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert der logarithmischen Mediane +/- S.D. (n=3)

4. Diskussion

4.1. HNP1-3 sind starke Plättchen- und Endothelzellagonisten

α -Defensine sind die wichtigsten antimikrobiellen Abwehrpeptide der innaten Immunabwehr und bekämpfen zusammen mit Makrophagen, Monozyten und Granulozyten den größten Teil der Infektionen noch bevor das erworbene Immunsystem aktiv wird. Alpha-Defensine 1-3 werden hauptsächlich von Neutrophilen Granulozyten gebildet und in deren azurophilen Granula gespeichert, doch auch andere Leukozyten und Monozyten sind z.T zur Produktion von HNP 1-3 fähig (siehe Einleitung).

HNP`s sind dabei zum einen in das sauerstoffunabhängige intrazelluläre Töten von phagozytierten Mikroorganismen involviert, und zum anderen setzen aktivierte Neutrophile etwa 10 % ihres Defensingehalts während Entzündungsreaktionen in die extrazelluläre Umgebung frei^{cxliii}. Die HNP Sekretion erfolgt nicht nur durch Leukozytenaktivierung sondern auch bei Gewebsverletzungen und bei granulomatösen Entzündungen^{cxliv}. Zudem veranlassen CC Chemokine wie MIP-1alpha, MIP-beta und Rantes Leukozyten zur Freisetzung größerer Mengen alpha-Defensin in den Extrazellularraum^{cxlv}. Zheng et al zeigten, wie das Cathelcidin LL 37 durch NADPH Oxidase Aktivierung, Phosphorylierung der „mitogen-activated protein kinase“ und der Mobilisation intrazellulärer Ca^{2+} Ionen zur Freisetzung von alpha Defensinen aus Neutrophilen Granulozyten führte. Bei einigen entzündlichen Erkrankungen wurde beobachtet, dass auch das Knochenmark zur Ausschüttung von alpha Defensinen stimuliert wird^{cxlvi}. Im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten von Patienten mit Infektionen, Sepsis, bakterieller Meningitis und vielen weiteren neutrophil dominierten entzündlichen Funktionsstörungen wie ARDS, COPD, Asthma und Lungenfibrose wurden erhöhte α -Defensin-Level ermittelt^{cxlvii cxlviii}.

Bei Sepsispatienten wurden zu Beginn der Erkrankung im Plasma Defensin-Level von 900ng/ml-17.000ng/ml gemessen, während gesunde Probanden im Durchschnitt 53ng/ml aufweisen^{cxlix}.

In den letzten Jahren wurde mehr und mehr erkannt, dass Thrombozyten nicht nur Hauptakteure der Blutgerinnung sind, sondern auch maßgeblich an innate Abwehrreaktionen beteiligt sind. Sie unterstützen den Körper im Kampf gegen eine mikrobielle Invasion, können diesen aber auch durch thromboembolische Ereignisse im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen schädigen.

Die Thrombozyten interagieren direkt mit Mikroorganismen und sind zudem indirekt an der Abwehr beteiligt, indem sie mit Gefäßwand- und professionellen Abwehrzellen wechselwirken^{cl}. Zu diesen professionellen Abwehrzellen zählen unter anderem die neutrophilen Granulozyten, die in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Thrombozyten gemeinsam mit diesen die Blutbahn durchströmen. Daher wurde der Effekt von den aus neutrophilen Granulozyten freigesetzten α - Defensinen, in Konzentrationen wie sie im Plasma von Sepsis Patienten gefunden wurden, auf verschiedene Plättchenfunktionen untersucht.

Es zeigte sich, dass die alpha Defensine HNP1-3 starke Plättchenagonisten sind. Sie induzieren dosis- und zeitabhängig eine Fibrinogenbindung, die verglichen mit anderen „klassischen“ Agonisten wie Thrombin, Kollagen und ADP massiv ist (Abb.:3-1-3-7). Beta Defensine konnten im Gegensatz zu den Alpha Defensinen keine Fibrinogenanbindung induzieren und die Thrombozyten nicht aktivieren (Abb.: 3-12). Die Thrombozytenaktivierung durch HNP-1-3 konnte sowohl an humanen Plättchen, als auch an Plättchen von Haussäugetieren gezeigt werden (Abb.:3-7-3-8) Auffällig ist hier, dass die Thrombozyten der Schafe erst bei deutlich höheren Konzentrationen reagieren. Die Plättchen der Katze reagieren bereits bei sehr geringen HNP-1 Konzentrationen, dicht gefolgt von denen der Kaninchen und der Hunde. Bei den Kaninchen zeigt sich wie bei humanen Plättchen eine stärkere Aktivierung durch HNP-1 im Vergleich zu anderen „klassischen“ Agonisten wie Thrombin, Kollagen und ADP, die auch hier mittels Fibrinogenbindung quantifiziert wurde (Abb.:3-9-3-10). Thromboembolische Erkrankungen gerade im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen sind bei Katzen, Kaninchen, Hunden und Pferden im Gegensatz zum Wiederkäuer häufiger zu beobachten^{cli}. Sepsis wird bei diversen Spezies beobachtet, ist aber in der Tiermedizin größtenteils noch nicht gut charakterisiert^{clii}. Bei den bestehenden tierartlichen Unterschieden konnte an Hundemodellen bisher am besten gezeigt werden, dass die kardiopulmonare Antwort in der Sepsis bei Hunden vergleichsweise mit der des Menschen ist.

Parallel zum Humanen Syndrom führt Sepsis bei dieser Spezies zur hyperdynamischen kardiovaskulären Antwort, Koagulopathy, Multiorganversagen, ARDS und Tod^{cliii}.

Die tierartlich unterschiedliche Neigung zur Entstehung thromboembolischer Erkrankungen im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen könnte unter anderem durch deren in dieser Arbeit in vitro untersuchten unterschiedliche Reaktion auf alpha Defensine zu erklären sein, jedoch ist dies in vivo noch nicht analysiert worden. Falco et al zeigten aber kürzlich an Regenbogenforellen, dass die in vitro getestete antivirale Aktivität gegen Fisch-Rhabdoviren von HNP-1 und die Modulation einiger Immunaktivitäten im Blut der Regenbogenforellen durch HNP-1 auch in vivo stattfanden^{clv}. Und so wäre neben den Beobachtungen, dass HNP-1 speziesübergreifend Immunreaktionen moduliert und, wie in dieser Arbeit gezeigt, zusätzlich auch die Hämostase speziesübergreifend aktiviert, weiter von Interesse, welchen Einfluß die spezieseigenen alpha Defensine auf die Hämostase und Immunreaktionen der jeweiligen Spezies selber nehmen. Da die alpha Defensine phylogenetisch alt und analog aufgebaut sind, ist es jedoch nicht unwahrscheinlich, dass die im Folgenden nur an humanen Plättchen, Leukozyten und Endothelzellen untersuchten Einflüsse von HNP-1 bei den Tieren in gleicher Art und Weise vorkommen könnten.

Neben der Fibrinogenbindung stimulieren HNP-1-3 bei den humanen-Plättchen deren Granula Sekretion. Dabei zeigt die induzierte CD 62 Expression (Abb.:3-15) eine deutliche alpha-Granula Sekretion und die induzierte CD63 Expression (Abb.:3-16) eine ebenso deutliche Sekretion der „dense bodys“. HNPs veranlassen somit die Plättchen zur Freisetzung ihrer Granulainhaltstoffe. Die freigesetzten Substanzen der aktivierten Plättchen z.B. ADP, PDGF und Serotonin verstärken die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten^{clvi} und haben zum Teil auch selber, wie beispielsweise die Thrombocidine, antimikrobielle Fähigkeiten. So kommt es durch die Aktivierung und Sekretion der Thrombozyten bis zu einem gewissen Grad zum „antimikrobiellen Arbeitssynzythium“ zwischen Granulozyten und Plättchen. Nach erfolgreicher Rekrutierung potenzieren sie ihre antimikrobielle Funktion.

Durch die Exozytose der Granula kommt es auf der Plättchenoberfläche zur Exposition von P-Selektin. P-Selektin ist ein wichtiger Glykoproteinrezeptor und stellt

einen Brückenpfeiler für den innigen Kontakt der Thrombozyten mit anderen Zellen dar. Neben seiner Lokalisation in den alpha Granula ruhender Thrombozyten, kommt es in den Weibel-Palade-Körperchen von unstimulierten Endothelzellen vor und wird auch hier nach Stimulierung durch Exozytose auf der Zelloberfläche präsentiert^{clvii}.

Auf aktivierten Plättchen fungiert P-Selektin als Glykoproteinrezeptor, der mit Leukozyten direkt über den primären Leukozytenrezeptor P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) interagiert.^{clviii} PSGL-1 ist ein stark O-glykosyliertes Mucin, das auf Monozyten, PMNL und Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird^{clxcix}.

Es konnte gezeigt werden, dass P-Selectin durch HNP-1 Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird (Abb.:3-15). Da P-Selektin ein Brückenprotein zwischen aktivierten Plättchen, Monozyten, Endothelzellen^{clxii} und neutrophilen Granulozyten ist, wurden in dieser Arbeit die HNP-1 aktivierungsbedingten Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten im peripheren Vollblut untersucht. Die Adhäsion zwischen Plättchen und Leukozyten hängt dabei vom Aktivierungsgrad der Zellen ab. Es zeigte sich, dass die Anzahl Plättchen-positiver Monozyten nach HNP-1 Stimulierung im Vollblut dosisabhängig deutlich anstieg (Abb.:3-22), Plättchen-positive PMNLs ließen sich hingegen nach Aktivierung mit HNP-1 kaum feststellen. Diese Beobachtung geht mit den Untersuchungen von Rinder und Jurk et al konform, die auch nach maximaler Aktivierung mit Thrombin feststellten, dass Monozyten signifikant mehr Plättchen binden als PMNLs^{clxiii}. Die Untersuchungen im citratantikoagulierten Vollblut wurden unter möglichst nativen Bedingungen durchgeführt: Die Zellen wurden innerhalb einer Stunde nach Blutabnahme aktiviert und präpariert. Ein Nachteil der Vollblutmethode ist jedoch, dass nach Stimulierung mit HNP-1 nicht sicher festgestellt werden kann, ob die Bildung der Assoziate durch die initiale Aktivierung der Plättchen, der Leukozyten oder durch beide Zelltypen bedingt ist. Hierzu wären weitere Koinkubationsversuche mit isolierten Zellen erforderlich. Interessant wären auch noch zu klären, ob die HNP-1 induzierte Assoziation zwischen Monozyten und Thrombozyten wirklich auch durch P-Selektin vermittelt wird oder ob andere Glycoproteine diese Assoziation hervorrufen. Um dies näher zu untersuchen, wären z.B noch Versuche mit monoklonalen Antikörpern erforderlich, die die Bindung von CD62P an Leukozyten blockieren.

Es lässt sich jedoch sicher die Aussage treffen, dass sich unter dem Einfluß von HNP-1 im Vollblut deutliche Assoziate zwischen Monozyten und Plättchen bilden. Funktionell zeigten Misuno et al zusätzlich, dass HNP-1 Monozyten zur Produktion von TNF-alpha stimuliert^{clxiv} und Diacovo^{clxv}, dass die Bindung von Plättchen an Monozyten eine niedrig affine Adhäsion ans Gefäßendothel bewirkt und über ein Signal, welches durch Quervernetzung von P-Selektin zustande kommt, eine feste Adhäsion über beta1- und beta2-Integrine vermittelt wird, die für die Transmigration in entzündetes Gewebe notwendig ist. Alpha Defensine wirken chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und Dendritische Zellen^{clxvi} und verbinden innate und adaptive Immunität.

Im pathophysiologischen Sinne ist dagegen von zirkulierenden Plättchen–Monozyten-Aggregaten u.a. bekannt, dass sie die Bildung atherosklerotischer Plaques fördern. Desweiteren wurde die Entstehung von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten bei Myeloproliferativen Erkrankungen^{clxvii}, Fortschreiten der Sepsis^{clxviii} oder Reperfusionsschäden bei Myokardinfarkt und Schlaganfall^{clxix} beobachtet. HNP beeinflusst wahrscheinlich auch diese pathologischen Prozesse.

Fibrinogen und Thrombospondin-1 sind ebenfalls bedeutende Mediatoren beim „cross talk“ zwischen Plättchen, Leukozyten und Endothelzellen, da sie auch Adhäsionsbrücken bilden.

Fibrinogen ist das bisher am intensivsten untersuchte Brückenmolekül. Es ist im Blutplasma lokalisiert und wird von aktivierten Plättchen aus den alpha Granula sezerniert^{clxx}. Aktivierte Plättchen binden lösliches Fibrinogen über den Glykoproteinkomplex IIb-IIIa. Auch die HNP-1 Aktivierung führt zur Expression des GP IIb/IIIa und damit zur Fibrinbindung (Abb:3-1-3-3). GPIIb/IIIa kann außer Fibrinogen noch Adhäsionsmoleküle wie Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin-1 und den von Willebrand Faktor binden^{clxxi}. Aktivierte Monozyten und PMNL können ebenfalls Fibrinogen über Integrine binden. Die beta 2 Integrine, der MAC-1-Komplex und das CD11c/CD18 sind in der Lage, im aktivierten Zustand Fibrinogen durch einen RGD-unabhängigen Mechanismus zu binden^{clxxii}. Durch Konformationsänderungen in der I-Domäne, einer Region von 190 Aminosäureresten, wird der funktionelle Aktivierungszustand der Integrine und damit die Bindungsavidität zu den Liganden reguliert^{clxxiii}. Ruhende Leukozyten können Fibrinogen über einen RGD-abhängigen

Mechanismus binden^{clxxiv}. Aktivierte Plättchen können Fibrinogen-vermittelt über das Integrin CD11c/CD18 die Produktion von Sauerstoffradikalen in PMNL triggern, wodurch wiederum die Plättchenaktivierung verstärkt werden kann^{clxxv}. Auch Thrombospondin-1, ein „response to injury“ Protein, welches u.a. von Endothelzellen, Monozyten und Thrombozyten selbst freigesetzt wird, kann an GPIIb/IIIa oder aber an GPIb, welches sonst vornehmlich auf den Plättchen als von Willebrand Faktor Rezeptor dient, binden^{clxxvicixxvii}. TSP-1 wirkt auf der Ebene der Regulation bzw. Modulation sowie als Vermittler von Zell-Zell-Interaktionen und wird zur Gruppe der matrixzellulären Proteine gezählt. Jedes Modul im TSP-1 Molekül kann spezifische Liganden wie Proteine der extrazellulären Matrix, Adhäsionsmoleküle aus dem Plasma, Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren und Proteasen binden, wodurch die Multifunktionalität von TSP-1 erklärt wird. Eine Zell-bindende Domäne stellt der globuläre C-Terminus dar, der über die Sequenz RFYVVMWK das Integrin-assoziierte Protein (CD47) auf Zellen binden kann. Durch diese Interaktion soll TSP-1 den Aktivierungsstatus von Integrinen beeinflussen und somit Zellfunktionen mediieren^{clxxviii}. CD36 (Glycoprotein IV) ein z.B. auf Plättchen, mikrovaskulären Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen vorkommendes 88kDa integrales Membranglykoprotein fungiert als „scavenger“-Rezeptor und auch als TSP-1 Rezeptor^{clxxix}. Die Interaktion von TSP-1 mit CD36 auf Plättchen soll eine Rolle bei der Plättchenaggregation spielen und auch bei der Bindung von Plättchen an Monozyten über TSP-1 soll CD36 als TSP-1 Rezeptor beteiligt sein^{clxxx}. Die multiplen Interaktionen von TSP-1 mit Makromolekülen bedingen eine Vielfalt an Zellfunktionen. TSP-1 spielt nicht nur eine Rolle bei der Plättchenaggregation während der Blutgerinnung, es vermittelt auch v.a. bei hohen Scherkräften die Plättchenadhäsion an das Subendothel^{clxxxicixxxii}. Außerdem vermittelt es die Plättchenadhäsion an Monozyten und PMNL, wodurch Leukozytenfunktionen wie die Produktion von Superoxidantien, Hapto- und Chemotaxis, Phagozytose- und Migrationsprozesse gefördert werden, die bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. TSP-1 ist zudem in Prozesse des Tumorwachstums bzw. der Metastasierung sowie in Wundheilungsprozesse bzw. Angiogenese involviert^{clxxxiii}.

Es konnte gezeigt werden, dass durch HNP-1 aktivierte Plättchen neben Fibrinogen auch Thrombospondin-1 dosisabhängig binden können (Abb.:3-17). So sind HNP-1 aktivierte Thrombozyten auch in der Lage mit diesen Adhäsionsproteinen Brücken zu

anderen Immunzellen und dem Endothel aufzubauen und funktionell Immunreaktionen zu modulieren.

Es zeigte sich weiter, dass CD40L durch den Einfluß von HNP-1 auf der Plättchenoberfläche präsentiert wird (Abb.:3-18). CD40L (CD154) ist strukturell mit dem Zytokin TNF α verwandt. Es bindet an das Glycoprotein CD40, welches u.a. auf Endothelzellen lokalisiert ist. Dies kann wiederum zur Freisetzung von IL8 und MCP-1 und damit zur chemotaktischen Anlockung von Monozyten und Neutrophilen führen und bedeutet eine entzündlichen Antwort des Endothels^{clxxxiv}. Darüber hinaus führt die Vernetzung von CD40 auf dendritischen Zellen durch CD40L aus Plättchen zur Reifung dieser Antigen präsentierenden Zellen. Auf B-Lymphozyten bewirkt dieser Vorgang den Wechsel der Klasse der produzierenden Immunglobuline von IgM zu IgG^{clxxxv}. T-Lymphozyten werden über die CD40L-CD40 Brücke aktiviert. So triggern HNP aktivierte Thrombozyten adaptive Immunabwehrreaktionen über CD40- bzw. CD40L-abhängige Interaktionen mit Lymphozyten und dendritischen Zellen und modellieren so auch die erworbene Immunität.

Plättchen, die durch HNPs aktiviert wurden, zeigten neben der Expression des CD40L auf der Plättchenoberfläche zusätzlich auch die Freisetzung des löslichen sCD40L (Abb.:3-37), welcher einen potenten Stimulus für T-Zellen, B-Zellen und Endothelzellen darstellt und zudem für die Stabilität arterieller Thromben wichtig zu sein scheint^{clxxxvi}. Im Tierexperiment führte lösliches CD40L zur Abstoßung von Allografts^{clxxxvii}. Lösliches CD40L verstärkt die Plättchenaggregation, die Assoziation zwischen Plättchen und Leukozyten und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten aus Thrombozyten^{clxxxviii}. An T-Zellen gebundener löslicher CD40L kann in einer Verstärkungsschleife weitere Blutplättchen aktivieren. Diese setzen dann das Chemokin RANTES frei, welches T-Zellen weiter aktiviert und zu Gefäßentzündungen und Arteriosklerose beitragen kann^{clxxxix}. CD40L-CD40 Wechselwirkungen und sCD40L spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen^{cxc}.

Ein weiterer Schlüsselprozess bei Entzündungsreaktionen ist die Wanderung der Leukozyten aus der Zirkulation durch das Endothel, der durch Zelladhäsionsmoleküle und durch Zellaktivierungsprozesse reguliert wird^{cxc}. Monozyten und PMNL, die im Körper primär als Phagozyten fungieren, sind in der Lage aus dem Blutgefäß durch

das Endothel zu wandern, um pathogene Organismen im entzündeten Gewebe zu beseitigen. Das klassische vier-Stufen-Modell der Wanderung der Leukozyten durch das Endothel berücksichtigt dabei Interaktionen zwischen den Leukozyten und Endothelzellen in Venen und Venolen mit geringem Scherstress. Der erste Schritt führt über einen Selektin-vermittelten Prozess zur sog. „schwachen Adhäsion(1)“ von zirkulierenden Leukozyten am aktivierten Endothel. Durch Mediatoren, die vom entzündeten Gewebe gebildet werden wie Zytokine , z.B. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und Interleukin 1 (IL 1), oder vasoaktive Substanzen (z.B. Histamin) werden Endothelzellen aktiviert, so dass sie auf ihrer Oberfläche P-Selektin und E-Selektin aus den Weibel-Palade-Körperchen exprimieren^{cxcii}. Es ließ sich in dieser Arbeit beobachten, dass Endothelzellen in Übereinstimmung zu der Arbeit von Schluesener et al ^{cxci} auch durch den Einfluß von HNP-1 aktiviert werden können. Es zeigte sich aber zusätzlich, dass diese Aktivierung sich noch durch HNP-1 aktivierte Thrombozyten deutlich steigern ließ (Abb.:3-39). Nach Inkubation der Endothelzellen mit HNP-1 , Thrombozyten allein und durch HNP-1 aktivierte Thrombozyten sowie als Positiv-Vergleich 10 nM TNF α und Medium zur Negativkontrolle wurde ihr Reaktion mittels FITC-Annexin V Anbindung bzw. deren E-Selektin Expression mittels eines spezifischen anti-E-Selektin-Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt. Während die FITC-Anexin V Anbindung dabei eher die Schädigung und den Zelltod des Endothels anzeigt (Apoptosemarker), bedeutet die E-Selektin Expression eine Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen und damit eine Aktivierung des Endothels. Es zeigte sich mit beiden Markern, dass HNP-1 schon allein zu einer deutlichen Endothelzellaktivierung führte, die bereits stärker ausfiel als die Aktivierung durch 10 nM TNF- α . Eine weitere Steigerung der Aktivierung bzw. Apoptose ließ sich erzielen, wenn die Endothelzellen mit durch HNP-1 aktivierte Thrombozyten inkubiert wurden. (Abb:3-39 a)und b)). Dass auch Thrombozyten allein eine Endothelzellreaktion hervorriefen, könnte an einer leichten Voraktivierung der Thrombozyten gelegen haben, da aktivierte Thrombozyten bekanntermaßen spezifisch am Endothel adhären^{cxci} ^{cxci} und so eine Aktivierung hervorgerufen haben könnten.

Wenn das Endothel aktiviert ist, können zirkulierende Leukozyten über entsprechende Rezeptoren, z.B. CD66, L-Selektin oder P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) mit Selektinen der Endothelzellen über Sialyl-Lewis-Gruppen interagieren und ermöglichen somit durch reversible Kontaktbildung zwischen den

Adhäsionsmolekülen ein „Rollen(2)“ der Leukozyten auf dem Endothel^{cxvii} und damit den 2. Schritt der Wanderung der Leukozyten durch das Endothel. Während die Leukozyten entlang des Endothels rollen, werden sie durch verschiedene Signale aktiviert, z.B. durch das vom Endothel sezernierte chemotaktische Interleukin-8 (IL 8), durch den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-Stimulierungsfaktor (GM-CSF), durch das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP-1), durch den Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) oder durch direkte Signale mittels Adhäsionsrezeptoren. Als Folge der Stimulierung werden Integrine vermehrt an der Leukozytenoberfläche exprimiert und die Bindungsaffinität wird durch Veränderungen der Integrinkonformation erhöht. Durch die erhöhte Affinität wird auch die Bindung des aktivierten Mac-1-Komplexes an lösliches und immobilisiertes Fibrinogen ermöglicht. Durch zyklisches Aktivieren und Deaktivieren des Mac-1-Komplexes kommt es zu einem gerichteten Wandern der Leukozyten auf den Kontaktstellen des Endothels. P-Selektin auf den Endothelzellen und das Plättchen-Endothelzelladhäsionsmolekül-1 (PECAM-1), welches sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen lokalisiert ist, modulieren dabei die Wandergeschwindigkeit^{cxviii}. Durch die Interaktion der aktivierten Leukozytenintegrine mit dem Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) auf Endothelzellen werden die Leukozyten fest an das Endothel arretiert^{cxviii}. Bei der „festen Adhäsion (3)“ an das Endothel spielt Mac-1 eine dominierende Rolle. Die Leukozyten stoppen an der Kontaktstelle der Endothelzellen ab und breiten sich aus, um durch die „tight junctions“ der Endothelzellen zu wandern. Der letzte Schritt, die „Transmigration(4)“ der Leukozyten durch die „tight junctions“ des Endothels, wird durch PECAM-1 und das Integrin-assoziierte Protein CD47 gesteuert^{cxix}. Aktivierte Plättchen können den Rollprozess der Leukozyten via P-Selektin auf der Oberfläche sowie die feste Bindung der Leukozyten durch eine Interaktion mit CD11b/CD18 über noch unbekannte Plättchenliganden unterstützen^{cc}.

Die in dieser Arbeit gezeigte Endothelzellaktivierung durch HNP-1 bzw. durch HNP-1 voraktivierte Thrombozyten im Sinne einer entzündlichen Endothelzellreaktion triggert folglich eine Migration von Entzündungszellen. An Leukozyten anhaftende Plättchen, wie die z.B. in dieser Arbeit gezeigten HNP1 induzierten Assoziante zwischen Plättchen und Monozyten (Abb.3-22), können dann „huckepack“ von diesen mit durch das aktivierte Endothel extravaskulär in entzündetes Gewebe getragen werden und nehmen auch dort Einfluß auf die Funktion der Leukozyten^{cci}. Auf der anderen Seite adhären auch aktivierte Thrombozyten spezifisch am Endothel und stellen dabei

einen idealen Kleber zum Einfangen von zirkulierenden Leukozyten dar und modulieren so deren Extravasation in entzündliches Gewebe^{ccii cciii}.

Funktionell können aktivierte Plättchen dann P-Selektin-vermittelt die Produktion von Tissue-Faktor in Monozyten und von Superoxidanionen bei PMNL und Monozyten^{cciv} induzieren. Über die P-Selektin-Brücke können Plättchen die Expression von Zytokinen und Chemokinen wie IL-1 β , IL-8 und Monozyten-chemotaktisches Protein-1(MCP-1) in Monozyten und PMNL hervorrufen^{ccv}. PSGL-1 Quervernetzungen induzieren ein „Clustern“ und damit eine Signaltransduktion von „Lymphocyte function-associated antigen-1“ (LFA-1) auf Th1-Lymphozyten^{ccvi} und von Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten^{ccvii}. HNP1 und HNP-1 aktivierte Thrombozyten aktivieren also zum einen das Endothel und zum anderen stellt die HNP-1 induzierte P-Selectin Exprimierung diverse Abwehrinteraktionen zwischen Plättchen und Leukozyten bereit.

Die HNP-1 induzierte Migration von Entzündungszellen ins Gewebe spielt bei Abwehrreaktionen gegen Erreger eine entscheidene Rolle. Sie könnte aber auch z.B. bei der Formierung arteriosklerotischer Plaques mitverantwortlich sein, indem Leukozyten aus dem Blut in die arterielle Intima auswandern und darüber hinaus auch Teile der Pathogenese von Erkrankungen wie Vaskulitiden, Allergien, Asthma, Sepsis etc. erklären.

HNP-1-3 sind starke Plättchenagonisten, sie induzieren deren Aggregation, Aktivierung und Sekretion. Des weiteren veranlassen sie die Plättchen zur Expression von Adhäsionsproteinen und Mediatoren, welche entscheidende Einflüsse auf ihre Interaktion mit Leukozyten und Endothelzellen nehmen. HNP und noch deutlicher HNP aktivierte Plättchen aktivieren das Endothel, und unter dem Einfluss von HNP-1 bilden sich im Vollblut deutliche Assoziate zwischen Monozyten und Plättchen.

Es wurde weiter untersucht, welchen Einfluss HNP-1 als Plättchenagonist auf die sekundäre Hämostase nimmt.

Viele Plättchenagonisten vermögen die Anbindung von Fibrinogen zu induzieren und können die Granula-Sekretion hervorrufen, aber nur starke Agonisten, wie Thrombin oder Kollagen, können Thrombozyten prokoagulant machen und die Bildung von Mikropartikeln hervorrufen. Um alle Plättchen stark genug zu aktivieren, bedarf es einer Aktivierung durch Kollagen plus Thrombin^{ccviii}.

Überraschenderweise ist nun, dass HNP-1 wie hier gezeigt, schon allein eingesetzt ein ausreichend starker Agonist ist, der die Plättchen so verändert, dass ein „Flip-Flop“ der Phospholipide in der Thrombozytenmembran stattfindet und die Gerinnungsfaktoren des Xa- und Prothrombinasekomplexes anbinden können. Die Abb. 3-19 zeigt, dass das HNP-1 die Membran so verändern kann, dass Annexin V über Ca^{2+} an negativ geladene Phospholipide anbindet. Dies ist eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für die Anbindung von Gerinnungsfaktoren^{ccix}. Auch die Zellrezeptoren für die Gerinnungsfaktoren werden möglicherweise durch HNP-1 aktiviert, so dass, wie in Abb. 3-19-3-20 gezeigt, die Faktoren Va und VIII binden können. Die prokoagulatorische Aktivität im Bereich eines Thrombozytenaggregates kann durch Mikropartikel gesteigert werden. Dies sind abgeschnürte Membranvesikel, die eine hohe Bindungsaktivität für Faktor V und VIIIa aufweisen und eine hohe prokoagulatorische Aktivität besitzen.

Die prokoagulatorische Aktivität im Bereich eines Thrombozytenaggregates wird durch die Bildung von Mikropartikelbildung gesteigert, da es durch diese Membranabschnürungen zu einer deutlichen Zunahme von dem Blut zugänglichen Plättchenmembranoberflächen^{ccx} kommt. HNPs induzieren diese Membranabschnürungen (Abb.: 3-21), was sonst nur sehr starke Agonisten wie Kollagen in Kombination mit Thrombin vermögen. Dieser Prozess führt über eine Kalziumionen-abhängige Aktivierung von Calpain zu einer Mikropartikelbildung aus den Plättchen und führt so zur verstärkten Freisetzung intrazytoplasmatischer Substanzen und durch die Oberflächenvergrößerung auch zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen. Es ist bekannt, dass Plättchenmikropartikel an aktivierte Leukozyten und Endothelzellen binden und Leukozyten untereinander bzw. mit Endothelzellen verbinden. Diese Bindungen finden auch mittels PSGL1-P-selectin, P-selectin- PSGL1 und CD40L/CD40 statt^{ccxi}

Plättchen, die Mikropartikel freigesetzt haben, wurden vermehrt im Blut von Sepsispatienten und nach Bypass Operationen gefunden und es wird ein starker Zusammenhang zwischen Mikropartikelproduktion und thrombotischen Erkrankungen vermutet^{ccxii}. Möglicherweise spielt auch hier die Interaktion von Defensin mit Thrombozyten, Leukozyten und dem Endothel eine wichtige Rolle.

Es konnte gezeigt werden, dass HNPs Plättchen in einen prokoagulanten Membranzustand versetzen und Mikropartikel abschnüren. Sie veranlassen Plättchen dazu, negativ geladene Phospholipide durch einen „Membran Flip-flop“ auf die Außenseite ihrer Membran zu exponieren und eine erhöhte Bindungsaktivität für plasmatische Gerinnungsfaktoren zur Verfügung zu stellen, was in Abb.:3-20 an Faktor Xa und VIII gezeigt werden konnte.

Während Thrombozyten früher nur als Vermittler der primären Hämostase galten, so werden sie heute als Zentralzellen angesehen, auf deren aktivierter Oberfläche sich Gerinnungsfaktorenkomplexe bilden, die hocheffizient arbeiten und zu einer explosionsartigen Vermehrung des Thrombins führen, der Protease, welche für die Fibrinbildung verantwortlich ist ^{ccxiii}^{ccxiv}. Durch die Fibrin-Polymerisation kommt es dann schließlich zur Gerinnsel-Stabilisierung.

Der Einfluss von HNP-1 auf die Thrombinbildung in der sekundären Hämostase in Gegenwart von Thrombozyten wurde im Thrombinbildungsassay beobachtet. Überraschenderweise wurde wie Abbildung 3-38 zeigt, ersichtlich, dass die Thrombinbildung im Thrombinbildungsassay bei hohen Konzentration an zugesetztem HNP-1 deutlich abnimmt. HNP-1 verändert folglich zwar die Membran, führt aber nicht zu einer vermehrten Thrombinbildung, sondern bewirkt im Gegenteil in hohen Konzentrationen einen deutlich verringerten bis nicht vorhandenen „Thrombinburst“. Dies könnte bedeuten, dass durch hohe HNP-1 Konzentrationen die Plättchenmembran so verändert oder zerstört wird, dass sich keine geordneten Gerinnungsfaktorkomplexe mehr auf der Membranoberfläche bilden, welche Prothrombin zu Thrombin umsetzen könnten. Dies würde die Untersuchungen von Lichtenstein et al unterstreichen, die eindrucksvoll zeigten, dass Defensine unter speziellen Bedingungen auch eine Zytotoxizität gegen eukaryotische Zellen zeigen ^{ccxv}. Aus dem Blickwinkel der Körperabwehr ist es darüber hinaus zwar sinnvoll eine Plättchenaktivierung und Sekretion zu initiieren, nicht aber gesundheitsgefährdende Thromben zu schaffen.

Unsere Ergebnisse sind die erste Beschreibung dass Peptide des innate Abwehrsystems Plättchen und Endothelzellen aktivieren und die Bildung von Plättchen-Monozyten-Assoziaten hervorrufen. Diese neu entdeckten Effekte sind möglicherweise wichtige Pathomechanismen, die für die Bildung von Thromben bei

entzündlichen Prozessen mitverantwortlich sein könnten. So wurde weiter untersucht, ob die Plättchen aktivierende Wirkung von HNP1-3 gehemmt werden kann.

4.2. Hemmung der Defensinwirkung

Die Aktivierung im PRP lässt vermuten, dass gewisse Plasmaproteine die HNP Wirkung inhibieren. Wie Abbildung 3-12 zeigt, werden bei der Aktivierung im PRP höhere Defensinkonzentrationen benötigt als im von Plasmaproteinen befreiten Gelfiltrat. Daher wurden theoretisch infrage kommende Proteine auf eine inhibitorische Aktivität getestet.

Unserer Ergebnisse komplementieren Ergebnisse aus vielen vorherigen Studien, die zeigten, dass HNPs an verschiedene Plasmaproteine binden. Speziell von α_2 Macroglobulin, α_1 -Antitrypsin und Antithrombin III wurde gezeigt, dass sie alpha Defensin binden^{ccxvi}. Ganz et al. zeigten weiter, dass Defensin und Serpine Komplexe bilden und sich so gegenseitig inaktivieren^{ccxvii}. HNP-1 bindet sogar an Serumalbumin und verliert durch Serum bzw. Serumalbumin seine antivirale Aktivität^{ccxviii}. Es wurde daher untersucht, ob die Serpine und Albumin auch dazu fähig sind, die von HNP induzierte Aktivierung der Hämostase zu hemmen.

Da eine Plättchenaktivierung sekundär zur Thrombin-Bildung führt, wurde die HNP-1 Aktivierung in einem Vorversuch in Gegenwart des Thrombin-Inhibitors Hirudin durchgeführt, um sekundär entstehendes Thrombin weitgehend abzufangen. Hirudin geht mit Thrombin einen 1:1 stöchiometrischen Komplex ein. Es zeigte sich, dass Hirudin, selbst in Konzentrationen von 5 U/ml, die HNP induzierte Plättchenaktivierung nicht hemmte (Abb.3-26). Damit ist auszuschließen, dass die Plättchenaktivierung durch HNP-1 durch eine aktivierte Thrombinbildung umgesetzt wird. Diese Ergebnisse gehen mit den Untersuchungen im Thrombinbildungsassay konform, die zeigen, dass hohe HNP-1 Konzentrationen die Thrombingeneration herabsetzten(Abb.3-38).

Von den Serpinen wurde dann zunächst der Einfluß des ATIII auf die HNP-1 aktivierende Wirkung auf Plättchen untersucht. AT III ist der wichtigste Inhibitor der Serinproteasen und hat eine besonders starke Affinität zum Thrombin. Obwohl durch den Vorversuch mit Hirudin eine HNP-1 vermittelte Thrombozytenaktivierung über den

Thrombinweg ausgeschlossen wurde, zeigte sich überraschenderweise eine deutlich hemmende Wirkung der HNP-1 Aktivierung auf Thrombozyten durch ATIII (Abb.:3-23). AT III inhibiert die HNP –1 Wirkung auf Thrombozyten dosisabhängig im äquimolaren Bereich zur HNP-1 Konzentration, wie die Schachbretttitration (Abb.:3-24) zeigt. Die Hemmung durch ATIII ist dabei nicht heparinabhängig, der hemmende Effekt kann durch Heparin jedoch noch gesteigert werden (Abb.:3-25). Vermutlich zeigt Heparin allein auch eine hemmende Wirkung.

Da die Schachbretttitration mit ATIII eine so deutliche Hemmung im äquimolaren Bereich zu HNP-1 zeigte (Abb.3-24), ist der Mechanismus, den Ganz et al zeigten, dass Antithrombin III Defensin bindet^{ccxxix} und Defensin und Serpine Komplexe bilden und sich so gegenseitig inaktivieren^{ccxxx} hier wahrscheinlich, und so wurde in dieser Arbeit der Einfluß weiterer Serpine auf die HNP induzierte Plättchenaktivierung untersucht. Es zeigte sich, dass auch alpha 1 Antitrypsin und alpha 2 Makroglobulin die HNP Wirkung dosisabhängig inhibieren, jedoch zeigt die Schachbretttitration mit alpha1 Antitrypsin im Gegensatz zu der mit ATIII, trotz hoher alpha 1 Antitrypsinkonzentration eine Restaktivierbarkeit durch HNP-1(Abb.:3-29). Die Fähigkeit, durch Serpine gebunden bzw. inaktiviert zu werden, könnte erklären, warum HNP1-3 durch die Präsenz von Serum Säugerzellen nicht lysiert^{ccxxxi}.

Bei erheblichen Entzündungsreaktionen kann dieses Gleichgewicht jedoch aus den Fugen geraten. So wurde beispielsweise bei Hunden während der disseminierten intravasalen Gerinnung eine fallende ATIII Konzentration im Vergleich zum Citratplasma normaler Hunde gemessen. In einer Studie von Feldmann et al hatten Hunde mit einer gesicherten DIC zu 85 % (35 von 41) erniedrigte ATIII Konzentrationen im Plasma^{ccxxii}. Der beobachtete Effekt von ATIII könnte das antithrombotische und antiinflammatorische Potential erklären, welches in Tierstudien mit ATIII beobachtet wurde. Mit erniedrigten ATIII Konzentrationen fällt die hemmende Komponente weg und es kann zu krankhaften hämodynamischen Veränderungen kommen. ATIII könnte dabei möglicherweise u.a durch die Komplexbildung mit Defensin verbraucht werden. Ähnliche Beobachtungen machten Spencer et al bei Individuen mit einem alpha 1 Antitrypsin Mangel. Diese haben signifikant höhere HNP Spiegel im Plasma und Sekreten des unteren Respirationstraktes und haben ein erhöhtes Risiko, Defensin induzierte obstruktive Lungenerkrankungen zu entwickeln^{ccxxiii}. HNP stimuliert in alveolaren Makrophagen die Produktion von LTB4

und IL-8 und führt so zu Gewebszerstörung und Amplifikation der entzündlichen Reaktion. Dieser Effekt wird durch adäquate alpha 1 Antitrypsin Konzentrationen inhibiert. So zeigt sich auch hier, wie die Defensinaktivität durch alpha 1 Antitrypsin inhibiert wird, was in dieser Arbeit auch im Falle der Thombozytenaktivierung gezeigt werden konnte.

Mit 6 Cystein-Gruppen bilden die Defensine drei charakteristische intramolekulare Cystein- Disulfidbrücken (Lehrer R, Ganz T)^{ccxxiv}, durch die diese Peptide u.a ihre 3D-Struktur erlangen. Die meisten Protein Disulfid Brücken dienen dieser Stabilisierung der Tertiär und Quartärstruktur. Ein kleinerer Anteil von Disulfid-Brücken übernehmen jedoch auch funktionelle Rollen^{ccxxv}.

Es gibt zwei Typen funktioneller Disulfide, die katalytischen und allosterischen. Die katalytischen Disulfid-Brücken liegen typischerweise im aktiven Zentrum von Enzymen und katalysieren den Thiol/Disulfid Austausch in anderen Proteinen^{ccxxvi}. Die allosterischen Disulfid-Brücken regulieren dagegen die Proteinfunktion in nichtenzymatischer Weise, indem sie die intra- und intermolekularen Strukturen modifizieren^{ccxxvii}. Durch Reduktion oder Oxidation der allosterischen Disulfid-Brücken kommt es zu einem Konformatioswandel und damit zur funktionellen Veränderung im Protein. Der Redoxstatus der allosterischen Disulfide wird durch Thiol-Isomerasen kontrolliert und somit stehen allosterische und katalytische Disulfide in einer funktionellen Verbindung untereinander^{ccxxviii}. Zur Familie der Thiol Isomerasen zählen u.a die Protein Disulfid Isomerasen (PDIs).

Bacitracin ist ein Polypeptid-Antibiotikum, welches die Zellwandsynthese einiger Bakterienarten hemmt. Zusätzlich hemmt es die Protein Disulfid Isomerase (PDI) und hat damit auch Einfluß auf die allosterischen Disulfide. Posttranslationale Proteinmodifikationen durch allosterische Disulfide tragen auch wesentlich zur Plättchenfunktion bei. Zudem wurde auf der Plättchenoberfläche ein System von Protein Disulfid Isomerasen gefunden. Austauschreaktionen an Thiol-disulfidbrücken sind entscheidend für eine stabile Adhäsion und Aggregation der Plättchen^{ccxxix}.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Oberflächen-assoziierte Proteindisulfidisomerase (PDI) als Affinitätsmodulator des Integrins α IIb β 3 dient. Die Modulation der Affinität von Integrinen für ihre Liganden stellt eine Schlüsselrolle für Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen dar. Affinitätsveränderungen, die zur

Integrinaktivierung und somit zur Ligandenbindung führen, sind durch enorme Konformationsänderungen innerhalb der Integrin-Domänen geprägt, die von spezifischen, redoxabhängigen Bindungsumlagerungen begleitet sind. In Aggregationsexperimenten konnte mit Hilfe von Membran-impermeablen Thiol-Blockern und spezifischen Inhibitoren der PDI gezeigt werden, dass durch PDI-bedingte Umlagerung freier Cysteinreste auf der Thrombozytenoberfläche die irreversible stabile Bindung des α IIb β 3-Liganden Fibrinogen an aktivierten Thrombozyten ermöglicht wird. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit den oben genannten Inhibitoren ergaben, dass nicht nur die stabile Bindung des Liganden Fibrinogen, sondern auch durch Ligandenbindung neu induzierte Epitope/Konformationen im α IIb β 3-Integrin, sowie dessen Aktivierung selbst durch enzymatisch/PDI katalysierten Thiol-Redoxreaktionen auf der Thrombozytenoberfläche reguliert werden konnten^{CCXXX}.

Tissue factor war das erste Hämostaseprotein, von dem gezeigt wurde, dass dessen Konformations- und Funktionszustand über allosterische Disulfid Brücken gesteuert wird^{CCXXXI}. So war in dieser Arbeit von Interesse, ob auch HNP-1 Affinitätsmodulationen von PDI abhängigen allosterischen Disulfiden unterliegen könnte. Es wurde gezeigt, dass der Einfluß von Bacitracin die HNP-1 induzierte Fibrinogenbindung hemmt (Abb.:3-34). Damit weiter untersucht werden konnte, ob der hemmende Einfluß von Bacitracin auf die HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierung nicht nur an der gehemmten Affinitätsmodulation des Integrins α IIb β 3 liegt, wurde der Bacitracineinfluss auf die HNP-1 induzierte Thrombozytenaktivierungen ebenfalls vergleichend mit Antikörpern gegen CD62, CD63 und der Mikropartikelbildung quantifiziert (Abb.:3-35-3-36).

Bacitracin zeigte auch hier einen deutlich inhibierenden Effekt. Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass es auch hier zu einer Hemmung der Affinitätsmodulation von P-Selektin bzw. Granulophysin durch Bacitracin kommt. Dies ist aber nach Lahav et al nicht der Fall, da im Gegensatz zur Integrin-Ligandenbindung die Agonisten-induzierte Plättchenaktivierung (z.B. P-Selektin Expression) Ectosulphydryl-unabhängig erfolgt. Daher ist es eher denkbar, dass auch alpha-Defensine selbst über allosterische Disulfid Brücken kontrolliert werden könnten, indem diese Epitope bzw. Konformationen und Funktionszustände der α – Defensine modulieren. Die Reduktion und Oxidation allosterischer Disulfide von alpha

Defensinen scheint von der PDI kontrolliert zu werden, da Bacitracin, wie hier gezeigt, die Hämostase aktivierende Funktion von HNP-1 hemmt.

Die Existenz und Funktion von allosterischen Disulfiden in alpha Defensinen könnte eine Erklärung dafür sein, dass auch Thrombospondin-1 über Thiolinteraktionen mit alpha Defensinen reagiert, deren Konformation ändert und damit ihre plättchenaktivierende Wirkung hemmt. Detwiler et al zeigten dass TSP-1 mit Thrombin und Antithrombin III über Disulfidbrücken Komplexe bildet ^{ccxxxii} und vermuteten bereits, dass der Austausch von intermolekularen Thiol-disulfiden der hauptsächlich Mechanismus sein könnte, mit dem TSP-1 mit anderen Proteinen interagiert. Ganz et al zeigten, dass aktiviertes alpha 2 Macroglobulin HNP-1 über einen Thiol Disulfidaustausch bindet und konstatierten, dass diese Reaktion ein entscheidender Mechanismus in der Regulation von Entzündungen sei ^{ccxxxiii}. Und so war es nicht überraschend, dass, wie Abb.3-27 zeigt, auch alpha 2 Makroglobulin die HNP-1 induzierte Plättchenaktivierung hemmt. Auch alpha 1 Antitrypsin, ATIII, Vitronectin und Albumin verfügen über freie Thiolgruppen ^{ccxxxiv ccxxxv ccxxxvi ccxxxvii} und könnten auf gleiche Art und Weise Defensine binden, zumal mit all diesen Proteinen ebenfalls eine deutliche Hemmung der HNP-1 induzierten Plättchenaktivierung gezeigt werden konnte (Abb.:3-23-3-30).

Der Einfluss von intrazellulär wirksamen Aktivierungs-Antagonisten auf die HNP-1 bedingte Plättchenaktivierung wurde untersucht. Die Aktivierung der Adenylat Cyclase führt zur Bildung von cAMP. cAMP bewirkt eine Inhibierung der Ca^{2+} -Mobilisation in den Plättchen, welche durch verschiedene Agonisten ausgelöst wird und für verschiedene Plättchenfunktionen von zentraler Bedeutung ist (siehe Einleitung).

Die Inhibition der Plättchenaktivierung durch klassische Agonisten, wie Kollagen und Thrombin mit cAMP, wird unabhängig davon, ob extern Ca^{2+} zugeführt wird, beobachtet. Daher gilt es als gesichert, dass sowohl interne Calcium-Mobilisation, als auch Ca^{2+} -Influx gehemmt werden. Zwei Aktivatoren der Adenylat Cyclase standen zur Verfügung, das stabile Prostacyclin-Analogon Iloprost und Prostaglandin E1 (PGE1). Während Iloprost irreversibel die Ca^{2+} Mobilisation durch klassische Agonisten hemmt, ist die Wirkung von PGE1 nur begrenzt (Abb.:3-31-3-32). Die Prostaglandinabkömmlinge wurden in Konzentrationen eingesetzt, welche die Plättchenaggregation mit klassischen Agonisten gerade vollständig hemmen. Beide

Adenylat Cyclase Aktivatoren zeigten eine deutliche, aber nicht vollständige Hemmung der HNP-1 induzierten Plättchenaktivierung. Der irreversibel wirkende Inhibitor Iloprost zeigte dabei eine stärkere Wirkung als PGE1.

Eine Aktivierung der Adenylatcyclase durch die Prostaglandine führte zu einer verminderten Plättchenaktivierung durch HNP-1 und lieferte uns Hinweise über die durch HNP-1 ausgelösten Signaltransduktion in Plättchen.

4.3. Spekulationen über den Wirkmechanismus der Plättchenaktivierung durch HNPs

Die Blutgerinnung ist mit dem angeborenen Immunsystem eng verzahnt. Immunzellen der innaten Abwehr können Tissue factor präsentieren, der mit im Blut vorhandenem Faktor VIIa einen Komplex bildet und so eine Faktoraktivierung starten kann, die zu einer geringen ersten Thrombinbildung führt (siehe Einleitung). Dieses Thrombin aktiviert dann sekundär Thrombozyten und kann unter besonderen Bedingungen der Sepsis eine disseminierte intravasale Gerinnung verursachen^{ccxxxviii}.

Von HNP, dem hauptsächlichen Peptid der innaten Immunabwehr, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es Plättchen direkt aktiviert und nicht indirekt über eine induzierte Thrombinbildung. Hirudine, die mit Thrombin einen 1:1 stöchiometrischen Komplex bilden, zeigten auch in hohen Dosen keinen hemmenden Effekt auf die HNP induzierte Plättchenaktivierung (Abb.:3-26).

Die direkte HNP induzierte Plättchenaktivierung könnte entweder Rezeptor gekoppelt sein oder durch eine Membranpermeabilisierung erfolgen- ähnlich dem zytotoxischen Effekt, den alpha Defensine auf Mikroorganismen ausüben (siehe Einleitung).

Von ihren strukturellen Charakteristiken ähneln Defensine kleinen Toxinen (z.B Schlangen-, Skorpionen- und Spinnengifte), die über spezifische Rezeptoren (wie Acetylcholin Rezeptoren) wirken^{ccxxxix}.

Gewisse Defensine entfalten bekanntermaßen ihre Wirkung auch durch die Anbindung an Rezeptoren. Beispielsweise bindet alpha Defensin direkt an isolierten sowie auf humanen Koronararterien und umbilikalen Venen vorkommenden

LRP/alpha2 –macroglobulin Rezeptoren und bewirkt eine Kontraktion der glatten Muskulatur^{ccxi}. Eine derartige Aktivierung wäre auch für die Thrombozyten denkbar, nur konnten Riddell et al zeigen, dass Plättchen nicht über diesen Rezeptor verfügen^{ccxi}.

Beta Defensine binden an TLR4 und TLR2 sowie den Chemokinrezeptor CCR6^{ccxlii}. Der TLR4 wurde kürzlich auf Thrombozyten gefunden und dient unter bestimmten Umständen u.a der LPS-Bindung an Thrombozyten^{ccxliii}. Nicht bekannt ist jedoch bislang, ob auch α -Defensine an diesen Rezeptor binden. Grigat et al zeigten dass alpha und beta Defensine bei Immunmodulationen die gleichen Rezeptoren benutzen^{ccxliv}. Sie zeigten weiter, dass alpha Defensine Galphai Proteine und MAPK als Signalüberträger benutzen und so also an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden können. Sowohl die Aktivierung und Hemmung der Adenylatcyclase als auch der PKC wird über G-Proteine reguliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Adenylatcyclase die HNP-1 induzierte Plättchenaktivierung hemmt (Abb.:3-31-3-32) und Salvatore et al zeigten am Influenza Virus, dass HNP-1 die Protein Kinase C in infizierten Zellen hemmt und so auch der PKC-Transduktionsweg Einfluss auf die HNP Aktion nimmt^{ccxlv}. So wäre es möglich, dass HNP zelluläre Signaltransduktionswege moduliert. Desweiteren wirken PDI-Blocker, wie am Beispiel des Bacitracins gezeigt (Abb.:3-34-3-36) hemmend auf die HNP-1 induzierte Plättchenaktivierung. Diese Hemmung könnte durch fehlende Affinitätsmodulation eines möglichen alpha Defensin Rezeptors auf Plättchen hinweisen.

Da die Defensine evolutionsgemäß einem häufigen Sequenzwechsel unterliegen, sind sie in der Regel keine Liganden mit hoher Affinität. Folglich ist ihre Interaktion mit spezifischen Rezeptoren schwächer als die ihrer primären Liganden. In hohen Konzentrationen nimmt Ihre Bindung jedoch einen biologisch wichtigen Platz ein^{ccxlvii}. Da sie hoch variable kationisch amphipathische Peptide sind, ist es auch möglich, dass sie an komplementäre Taschen anderer Proteine binden und gemeinsam einen Rezeptor –Liganden bilden. Ein Aktivierungsmechanismus über einen spezifischen alpha Defensin Rezeptor auf Thrombozyten ist denkbar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ebenso ist es jedoch möglich, dass das Ziel der HNPs die Lipiddoppelmembran der Plättchen ist. Hinweisend hierfür haben alle Defensin sensiblen Organismen eine

Hüllmembran und das breite Spektrum der Defensininteraktion lässt vermuten, dass kein spezifischer Rezeptor sondern die Lipiddoppelmembran das Hauptziel des Defensinangriffes ist.

Durch den hohen Anteil des Neuraminsäureabkömmlings Sialinsäure (N-acetyl neurominic acid) ist die Oberflächenladung der Plättchen negativer als die anderer Blutzellen. Diese negativ geladene Oberfläche schützt die Thrombozyten vor einem zu engen gegenseitigen Kontakt sowie gegen einen zu engen Kontakt zum ebenfalls negativ geladenen Endothel^{ccxlvii ccxlviii}. Sie könnte aber auch eine elektrostatische Anziehung zwischen dem stark kationischem Defensin und den anionischen Membranbestandteilen der Plättchen begünstigen und zu einer selektiven, elektrostatischen Annäherung führen.

Bei den Blutplättchen sind die Phospholipide über die Doppelschicht nicht homogen verteilt und so besteht auch hier ein Membranpotential, welches im prokoagulantem Zustand durch den Membran „flip flop“ weiter verstärkt wird und eine elektrostatische Anziehung zwischen α - Defensin und Plättchen weiter begünstigen könnte.

Nach erfolgter elektrostatischer Anziehung könnte es dann zu Wechselwirkung der Plättchen mit HNP kommen. Es ist bekannt, dass α -Defensine die Zellmembran von Mikroorganismen permeabilisieren können, teilweise unklar ist jedoch der Mechanismus dieser Permeabilisierung und ob die Permeabilisierung auch der entscheidende Schritt bei der Thrombozytenaktivierung sein könnte.

Lehrer et al beobachtete 1989, wie Defensine bei Bakterien zunächst ein Durchsickernlassen von kleinen Ionen bewirkten, welches dann von einem Einstrom größerer Moleküle gefolgt wurde. An *Escherichia coli* zeigte er, dass Defensine beide, die äußere und die innere Membran permeabilisieren und dass es mit der Permeabilisierung der inneren Membran zum Zelltod kommt^{ccxlix}. Ob die letale Aktivität der Defensine durch einen Ausstrom vitaler zellulärer Bestandteile (z.B. K^+ , Mg^{2+} etc.) oder durch einen Einstrom toxischer Ionen wie Ca^{2+} , oder Wasser, oder anderer membranassoziierter „Pathways“ begründet ist, bedarf weiterer Studien.

Kagan und Wimley zeigten, dass alpha Defensin (NP-1 (Kaninchen) und HNP-1) spannungs-abhängige, schwach anionenselektive Kanäle in Lipiddoppelmembranen formt^{cci} und HNP-2 multimerische Poren in unilamellare Vesikel mit einem

Durchmesser von ungefähr 25 Å bildet, wobei der Anteil an anionischen Lipiden (Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol (POPG)) besonders wichtig ist^{ccli}.

Zusätzlich beobachteten sie, dass die Kanäle durch Defensin-Multimere, bestehend aus 2-6 Molekülen, entstehen und eine Kristallstruktur Studie über HNP3 erkannte ein amphiphiles Dimer^{cclii}. Dieser amphiphile Charakter ermöglicht eine biphasische Bindungskinetik. Als erstes kommt es zu einer elektrostatischen Anziehung zwischen dem stark kationischem Defensin und anionischen Membranbestandteilen. Der zweite Schritt ist dann hydrophober Natur, da die hydrophobe Dimeroberfläche mit Lipidschwänzen interagiert und die Lipiddoppelschicht lockert. Es lagern sich dann bis zu sechs Dimere zusammen und binden in ihrem hydrophoben Pol an die Lipidschichtdoppelschicht und mit ihrem hydrophilen Pol formen sie eine wasserdurchlässige annuläre Pore^{ccliii}.

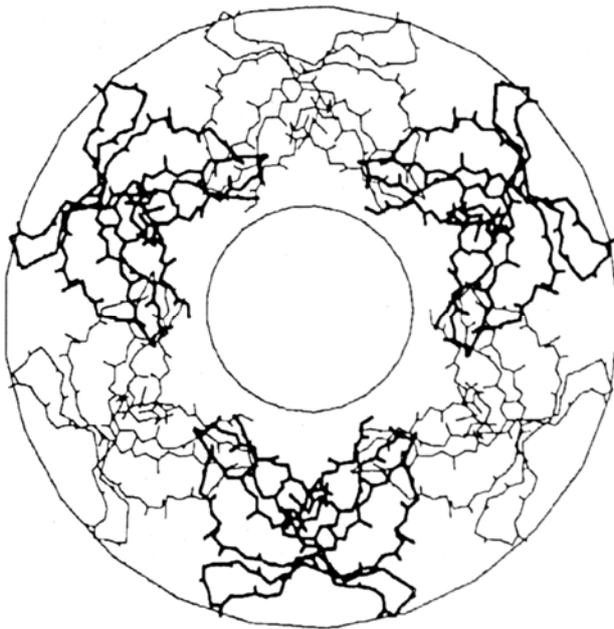


Abbildung 4-1: Aufsicht auf ein spekulatives Modell einer Defensin Pore, die aus Defensin Dimeren bzw. Multimeren formiert wird.

So ist es vorstellbar, dass nach elektrostatischer Anziehung zunächst Defensindimer an die Zellmembran bindet und dann eine Formation von Multimeren erfolgt, die schließlich zur Bildung größerer Poren führt. Dies würde mit den weiter oben beschriebenen Beobachtungen von Lehrer et al an Bakterien einher gehen, die zeigten wie Defensine zunächst ein Durchsickernlassen von kleinen Ionen bewirkten und dann einen Einstrom größerer Moleküle hervorriefen. Der Schritt zur Multimerbildung könnte durch die auf der Thrombozytenoberfläche lokalisierte PDI katalysiert werden, was auch erklären könnte, warum PDI Hemmer wie Bacitacin auch

wirken könnten (Abb.:3-34-3-36), wenn kein spezifischer Rezeptor auf Plättchen existieren würde. Diese Vorstellungen werden von Untersuchungen an Fibronectin unterstrichen, welches sich über freie Sulfhydryle von Dimeren zu Multimeren umwandelt^{ccliv} und die von White et al gezeigten Thiolinteraktionen, die bei der Dimerisation und Multimerisation von alpha Defensinen aktiv sind^{cclv}.

Es ist bekannt, dass auch Säugerzellen von alpha Defensinen permeabilisiert werden können. Lichtenstein et al zeigten wie Tumorzellen konzentrationsabhängig durch HNP 1-3 lysiert werden^{cclvi}. In einer funktionellen Studie untersuchten Albrethsen et al fluoreszenzmikroskopisch wie HNP1-3, aufgereinigt aus Colontumorzellen, in caninen Nierenzellen calceindurchlässige Poren bildeten^{cclvii}. Mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays wurde in dieser Arbeit analog gezeigt, dass die Aktivierung mit HNP-1 an gefilterte Plättchen einen deutlichen Ausstrom von Calcein AM hervorrief, der noch stärker war als der der positive Kontrolle Calcium Ionophor (Abb.:3-41). Da fluoreszierendes Calcein nur bei Schädigung bzw. Porenbildung in der Zellmembran in die Umgebung freigesetzt werden kann, wäre es möglich das HNP-1 eben diese Schädigung oder Porenbildung bei der Plättchenaktivierung initiiert. Diese Vorstellung könnte auch weiter erklären, dass es auf Plättchen, die mit hohen Konzentrationen HNP-1 aktiviert wurden, nicht zum „Thrombinburst“ kommt (Abb.:3-38), da die Plättchenoberfläche möglicherweise so verändert werden könnte, dass keine Gerinnungsfaktorenkomplexe mehr gebildet werden können. Die Vermutung der Porenbildung unterstreichend konnte weiter gezeigt werden, dass HNP-1 einen deutlich additiven Aktivierungseffekt zu RFY ausübt (Abb.:3-40), von dem in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit .Prof. Dr. Horst Robenek elektronmikroskopisch gezeigt wurde, dass es die Thrombozytenmembran permeabilisiert. Die molekularen Mechanismen, die HNP an Plättchen sowie in deren Interaktion mit dem Endothel und Leukozyten auslöst, bedürfen weiteren Forschungen, um ein besseres Wissen über die engen Wechselwirkungen zwischen Entzündung und Hämostase zu bekommen.

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und Ergebnisse zur Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen durch HNP1-3, sowie die induzierte Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen eröffnet neue Fragestellungen.

Es ergaben sich durch den Permeabilisierungsversuch mit dem Marker Calcein AM Hinweise, dass HNP-1 Poren in die Plättchenmembran formt und so die Thrombozyten aktiviert. Neben diesen durchflußzytometrischen Untersuchungen wäre eine elektronenmikroskopische optische Darstellung dieser Poren von Interesse. Auch Rezeptorinteraktionen müssten weiter untersucht werden. Der TLR-4 könnte ein potentieller Rezeptor für alpha Defensine sein und wurde kürzlich auf Thrombozyten entdeckt. Blockierende Antikörper gegen TLR4 könnten eine Aktivierung über diesen Rezeptor weiter aufklären. Auch die Signaltransduktionswege über G-Protein gekoppelte weitere Rezeptoren wäre von Interesse, zumal sich in dieser Arbeit Hinweise ergeben haben, dass HNP diese Wege z.B. über die Adenylatcyclaseaktivität moduliert. Beobachtungen mit Galpqaq und Galphai defeziente Mausplättchen könnten hier weitere Aufklärung bringen. Die in dieser Arbeit im Vollblut untersuchte HNP induzierte Assoziatbildung zwischen Thrombozyten und Leukozyten sollte weiter auf ihre Spezifität in Koinkubationsversuchen mit isolierten Zellen untersucht werden. Interessant wären auch zu klären, ob die HNP-1 induzierte Assoziation zwischen Monozyten und Thrombozyten wirklich durch P-Selektin vermittelt wird oder ob andere Glycoproteine diese Assoziation hervorrufen. Um dies weiter zu untersuchen wären z.B. noch Versuche mit monoklonalen Antikörpern erforderlich, die die Bindung von CD62P an Leukozyten blockieren. Die Frage, ob Alpha Defensine allosterische Disulfide besitzen und ob deren Multimerbildung oder deren möglicher Rezeptor über die PDI moduliert werden, könnte in Aggregationsexperimenten mit Hilfe von Membran-impermeablen Thiol-Blockern und anderen spezifischen Inhibitoren der PDI, sowie weiteren Strukturstudien untersucht werden. Neben den in vitro Untersuchungen wäre der Einfluss speziesspezifischer alpha Defensine auf die Hämostase und Immunreaktionen im Tier von großem Interesse. Weiter stellt sich die Frage, welchen therapeutischen Effekt die in dieser Arbeit in vitro getesteten Inhibitoren bei Erkrankungen, die durch Entzündungen und aktivierter Haemostase verursacht werden, in vivo zeigen.

Neben den therapeutischen Möglichkeiten zeigt sich noch ein großes Potential im Bereich der klinischen Diagnostik und des klinischen Managements. Der Trend geht hier mehr und mehr zu den sog. Biomarkern. Das Ermitteln von alpha Defensinkonzentrationen in Körperflüssigkeiten könnte hier hilfreich bei der Diagnostik und im Monitoring von Krankheitsverläufen sein. So wäre beispielsweise bei der Lungenfibrose des Westis analog zu humanen Modellen von Interesse, wie die Defensinkonzentrationen im Plasma und BAL im Vergleich zu gesunden Hunden sind. Bei repräsentativen Ergebnissen könnte dies eine risikoarme Alternativen in der Diagnostik zur derzeit immer noch lebensgefährlichen Lungenbiopsie sein. Sollten die alpha Defensinkonzentrationen sehr hoch sein, so könnten versucht werden durch Serpingabe den Krankheitsverlauf zu mildern. Auch im Bereich der Allergien, Vaskulitiden, immunvermittelten Darm-, Blasen- und Lungenerkrankungen der Haussäugetiere liegt sicherlich noch ein großer unerforschter Pool an Pathomechnismen in dem alpha Defensine und Thombozyten eine Rolle spielen und deren Verstehen neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bringen könnte.

6. Zusammenfassung

Pathogene Mikroorganismen verursachen in der Blutzirkulation oft systemische Erkrankungen, die schnell zum Tod führen können. Angeborene Verteidigungsmechanismen gehören zu den effektivsten Waffen im Kampf gegen solche Infektionen. Thrombozyten sind nicht nur Hauptakteure in der Hämostase, sondern auch spezialisierte Abwehrzellen, die eine Schlüsselrolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen von Entzündungsreaktionen und bei der innate Immunabwehr spielen. Thrombozyten und Leukozyten interagieren bei der Blutgerinnung und bei Entzündungsreaktionen. Neutrophile sind die zentralen Zellen bei akuten Entzündungsreaktionen. In Sepsissituationen korreliert ihre Aktivität mit der schwere von Organdysfunktionen, die durch hämodynamische Veränderungen hervorgerufen werden.

Defensine sind, wie Thrombozyten und Leukozyten maßgeblich an der innate Immunabwehr beteiligt, sie erkennen und inaktivieren mikrobielle Erreger bevor diese den Körper infizieren und schädigen. Alpha Defensine sind kleine, kationische, cystein- und argininreiche Peptide, die mehr als 40 % der Proteinmenge neutrophiler Leukozyten ausmachen und in deren azurophilen Granula gespeichert sind. Während Entzündungsreaktionen sind sie in das intrazelluläre Töten von Bakterien, Viren und Pilzen involviert und werden von aktivierten Neutrophilen in den Blutstrom und in entzündetes Gewebe freigesetzt.

Der Effekt von alpha-Defensinen in Konzentrationen, wie sie im Blut von Sepsis Patienten gefunden wurden, wurde in dieser Arbeit auf verschiedene Thrombozytenfunktionen untersucht. Es zeigte sich, dass alpha Defensine HNP1-3 starke Thrombozytenaktivatoren sind. HNP aktiviert dabei Plättchen direkt und nicht indirekt über eine induzierte Thrombinbildung, was in Koinkubationsversuchen mit Hirudin gezeigt werden konnte.

Die Thrombozytenaktivierung wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Mit Hilfe der Expressionsmarker CD62 und CD63 konnte gezeigt werden, dass alpha-Defensine Thrombozyten zur vollständige Sekretion ihrer alpha Granula und dense bodies veranlassen. Alpha Defensine befähigen die Thrombozyten Fibrinogen, Thrombospondin-1 und verschiedene Gerinnungsfaktoren auf ihrer Oberfläche zu

binden und thrombozytäre Mikropartikel zu bilden. Von CD40L, einem Protein der TNF Familie, welches ein potenter Stimulus für T-Zellen, B-Zellen und Endothelzellen darstellt, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es auf der Oberfläche von Plättchen, die durch HNP-1 aktiviert wurden, präsentiert wird und im ELISA konnte die Freisetzung von löslichem CD40L quantifiziert werden. CD40L-CD40 Wechselwirkungen und sCD40L spielen eine zentrale Rolle bei Immunantworten und bei Entzündungsreaktionen und so stellt der Einfluss von alpha-Defensinen auf diese Funktionen ein Bindeglied zur adaptiven Immunantwort dar.

Es konnte gezeigt werden, dass alpha-Defensine die Bildung von Assoziaten zwischen Monozyten und Plättchen fördern und das Endothel der Blutgefäße in einen proentzündlichen Funktionszustand versetzen. Der Einfluss, den Thrombozyten auf die Immunabwehr und Entzündungsreaktionen nehmen, wurde lange unterschätzt. Dies ist die erste Beschreibung, dass Peptide der innate Immunabwehr Thrombozyten aktivieren. Diese neu entdeckten Mechanismen können mitverantwortlich für die Entstehung von Thrombosen in Verbindung mit Entzündungsreaktionen sein.

Es wurde nach Ansätzen gesucht diese Gefahr zu hemmen. HNP1-3 binden an Serpine, wie alpha1-Antithrombin und Antithrombin III. Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob diese Proteine auch dazu fähig sind, die Thrombozytenaktivierung durch HNP zu hemmen. Es zeigte sich, dass alpha1-Antitrypsin und Antithrombin III die Thrombozytenaktivierung dosisabhängig und vollständig zu hemmen vermochten. Antithrombin III war ein potenter Inhibitor der nicht-thrombin-bedingten Plättchenaktivierung durch HNP. Dieser beobachtete Effekt unterstreicht die antithrombotische und antientzündliche Wirkung, die in Tierstudien schon oft mit ATIII beobachtet wurden. Auch α 2 Makroglobuline hemmten die Plättchenaktivierung durch HNP-1. Von α 2 Makroglobulin weiß man, dass es über Thiole an HNP bindet. Es wurde weiter in dieser Arbeit beobachtet, dass auch Thrombospondin-1, Vitronektin und der PDI Blocker Bacitracin die HNP induzierte Plättchenaktivierung hemmten und so wurde hier eine Abhängigkeit bei der Thrombozytenaktivierung durch HNP von Thiol-Disulfid-Isomerierungen vermutet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass HNPs allosterische Disulfide beinhalten.

Die Klärung des Mechanismus, wie HNPs die Plättchen aktivieren, erfordert noch weitere Untersuchungen, es ergeben sich aber Hinweise, dass HNP die Plättchenmembran permeabilisiert, da gezeigt werden konnte, dass es Calcein AM durchlässige Poren in die Plättchenmembran formt.

Ein besseres Verstehen der Interaktionen von alpha Defensinen, Thrombozyten, Leukozyten und dem Endothel könnte Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten liefern, wenn die Abwehr Amok läuft.

7. Summary

Pathogenic micro-organisms often cause severe systemic infectious diseases if they reach the bloodstream. Innate immune defence mechanisms are very fast and one of the most effective weapons against infections. Platelets, known as primary actors in haemostasis, are specialized immune cells that play central roles in physiologic and pathologic processes of haemostasis, inflammation, tumour metastasis, wound healing and innate host defence.

Platelets and leukocytes interact in haemostasis and inflammation.

Neutrophils are the central cells in acute inflammation. The neutrophilic activation in human sepsis correlates with the severity of organ dysfunction followed by haemodynamic changes.

Defensins are like platelets and leukocytes important constituents of the innate immune system, which recognises and inactivates microbial pathogens once they attempt to infect and colonise the host tissue.

Neutrophil defensins, cationic, small cystein- and arginine-rich peptides that comprise about 40 % of the total protein content of azurophilic granules, attack bacteria, fungi, viruses and parasites. They are released upon neutrophil activation by exocytosis.

The effect of alpha defensins in concentrations, which have been found in the plasma of septic patients, on different platelet functions was examined.

We observed, that the alpha defensins HNP-1, HNP-2 and HNP-3, in concentrations that are secreted in the neighbourhood of activated neutrophils, are very strong platelet agonists and induce full platelet activation. HNP-1, HNP-2 and HNP-3 activated the platelets directly and not indirectly via thrombin formation.

The addition of hirudin had no effect on alpha-defensin induced platelet activation. Activation of platelets by HNP-1 to 3 was assessed by flow cytometry.

We analysed among other things, CD62 expression as a marker of alpha-granule secretion, CD63 expression as a marker of dense body secretion, and binding of fibrinogen, thrombospondin-1 and several coagulation factors to the platelet surface

as well as platelet microparticle formation. In addition, alpha defensin induced platelet activation led to platelet surface expression of CD40L, a protein belonging to the TNF family, that stimulates dendritic cells, B cells and endothelium cells. Soluble CD40L was quantified by ELISA. In that way alpha defensins might amplify haemostasis, inflammation and even the adaptive immune response. Further they stimulated the formation of platelet-monocyte associates and augmented the (pro)inflammatory activity of vascular cells.

Platelets are underappreciated concerning their contributions to host defence and inflammatory processes. This is the first description that peptides of the innate immune system activate platelets. This new discovered mechanism might be at least in part responsible for the formation of thrombi in connection with inflammatory processes. Possibilities to inhibit these action of the alpha defensins were studied.

HNP1 to 3 strongly bind to serpins like alpha1-antitrypsin and antithrombin III. Therefore we tested whether these protease inhibitors might have an additional function and might be able to inhibit the activation of platelets by alpha defensins. Alpha1-antitrypsin and antithrombin III inhibited platelet activation in a dose dependent manner. Antithrombin III showed to be a potent inhibitor of alpha defensin induced platelet activation. This inhibition was not dependent on heparin. These observed effect of antithrombin III might contribute to its antithrombotic and anti-inflammatory potential seen in animal studies.

The activation of haemostasis by alpha defensins was also inhibited by α 2 macroglobulin. It is known that α 2 macroglobulin binds HNP via thiols. In addition to that I observed that also thrombospondin-1, vitronectin, and bacitracin inhibit the activation of platelets induced by HNP. I therefore propose that the activation of platelets by HNP is dependent on a thiol–disulfid-isomeration.

The mechanism, how HNPs activate the platelets, requires further examinations. There are however indications that HNP permeabilises the platelet membrane as it could be shown, that they form pores permeable for calcein –AM into the platelet membrane.

A better understanding of the interaction of alpha defensins, platelets, leukocytes and the endothelium could provide new targets for the treatment, when the defence system runs amok.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ATIII	Antithrombin III
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosintriphosphat
A.dest	Aqua destillata
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CAMPs	Cationic antimicrobial peptides
Da	Dalton
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunfluoreszenz-Test (enzyme-linked immunosorbent assay)
EM	Elektronenmikroskopie
FA	Formaldehyd
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GP	Glykoprotein
GPRP	Glycin-Prolin-Arginin-Prolin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HMEC	Menschliche mikrovaskuläre Endotheltellen (human microvascular endothelialcells)
ICAM	Intercellular adhesion moleküle
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IP 3	Inositoltriphosphat
KDa	Kilo Dalton
MG	Molekulargewicht
MHCC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
MMP 9	Matrix-Metalloproteinase 9
MAC-1	Makrophagen-assoziiertes Antigen-1
MAPK	Mitogen activated Proteinkinase
MIP-1	Monocyte chemotactic protein
MODS	Multiorganversagen (multi organ dysfunction Syndrom)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotriphosphat
n.s.	nicht signifikant
OCS	offenes Kanalsystem (open canalicular system)
PAI	Plasminogenaktivator Inhibitor
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung (phosphat buffered saline)
PDGF	Wachstumsfaktor aus Plättchen (platelet derived growth factor)
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PE	R-Phycoerythrin
PECAM-1	Thrombozyten/Endothelzell Adhäsionsmolekül-1 (platelet/endothelium cell adhesion molecule-1)
PerCP	Peridin Chlorophyll
PGE-1	Prostaglandin E1
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PMNL	Polymorphkernige mononukleäre Leukozyten
PPP	plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)

PRP	plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
RANTES	regulated on activated normal T-cell expressed and secreted
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TBS	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan gepufferte Natriumchloridlösung (Tris buffered saline)
TF	Gewebefaktor (tissue factor)
TFPI	Inhibitor des Gewebefaktor Reaktionswegs (tissue factor pathway inhibitor)
TLR	Toll like receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α (tumor necrosis factor α)
t-PA	gewebsabhängiger Plasminogen Aktivator (tissuetype plasminogen activator)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
Tz	Thrombozyten
UF-Heparin	unfraktioniertes Heparin
u-PA	Urokinase Plasminogen Aktivator (urokinase plasminogen activator)
vWF	von Willebrand Faktor

9. Publikationen

9.1. Veröffentlichte Abstracts

- Horn M, Brodde M, Niemann S, Jurk K, Kehrel BE (2004). Platelet activation by alpha-defensin is inhibited by antithrombin III. *Hämostasiologie; 1: V123*.
- Horn M, Brodde M, Niemann S, Jurk K, Kehrel BE (2004) New links between inflammation and haemostasis –alpha defensins (HNP-1/2) are strong platelet agonists. *Hämostaseologie;1;V65*.
- Beide Abstracts wurden als Vorträge präsentiert auf dem Kongress der Gesellschaft für Thrombose und Haemostaseforschung in Hamburg, Februar 2004

Das erst genannte Abstract wurde auf diesem Kongress mit dem Professor-Landbeck-Preis 2004 der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung ausgezeichnet.

- Horn M, Brodde MF, Van Aken H, Niemann S, Jurk K, Kehrel BE (2005) New link between inflammation and haemostasis— Neutrophil alpha defensins activate platelets and endothelial cells *Anesthesia & Analgesia* 2005, 10: S121 Präsentiert auf dem 79th Clinical and Scientific Congress , Internattional Anesthesia Research Society, Honolulu, Hawaii
- Brodde M, Horn M, Van Aken H, Niemann S, Jurk K, Kehrel BE (2005) Prothrombotic tendency upon inflammatory conditions-alpha defensin (HNP-1/2/3) are strong platelet agonists. *J Thomb Haemost: 3Suppl 1:OR016*
- Brodde M, Horn M, Van Aken H, Niemann S, Jurk K, Kehrel BE (2005) New functions for protease inhibitors- Alpha 1 Antitrypsin and Antithrombin III inhibit the activation of platelets by alpha defensin from neutrophils. *J Thromb Haemost; 3 Suppl 1; P 1876*
- Beide Abstracts wurden auf dem internationalen Kongress der International Society on Thrombosis and Haemostasis im August 2005 in Sydney, Australien, als Vorträge präsentiert.

9.2. Manuskripte in Bearbeitung

- 1. Horn M *, Brodde MF*, Niemann S, Jurk K, Roth J, Van Aken H, Kehrel BE
Alpha defensins from neutrophils activate platelets and endothelial cells
- 2. Horn M*, Brodde MF*, Niemann S, Jurk K, Roth J, Van Aken H, Kehrel BE
The serpins alpha1 antitrypsin, antithrombin III and alpha 2 macroglobulin
inhibit proinflammatory and prothrombotic action of alpha defensins from
neutrophils.

10. Erklärung

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

Literaturverzeichnis

- ⁱ Gewirtz JN, Poncz M (1991) Megakaryocytosis and platelet function. *Hematology, Basic Principles and Practice*. Churchill-Livingstone, New York, 1991, 1148-1157
- ⁱⁱ Dodds WJ (1978) Platelet function in animals: species specificity. *J. Med. Chem* 25:197-207
- ⁱⁱⁱ Jain NC (1993) *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea and Febiger, Philadelphia
- ^{iv} Jacobs RM, Boyce JT, Kociba GJ (1986) Flow cytometric and radioisotopic determinations of platelet survival time in normal cats and feline leukaemia virus-infected cats. *Cytometry* 7:64-69
- ^v Morgenstern E, Wohn ICD, Schmidt, Kanse SM, Yutzy B, Germer M, Preissner KT (1999) *Morphologie der Thrombozyten*. Hämostaseologie Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1-14
- ^{vi} Solum NO, Hagen I, Fillion-Myklebust C, Stabaek T (1980) Platelet glycoprotein. Its membrane association and solubilization in aqueous media. *Biochem Biophys Acta* 10:235-246
- ^{vii} Crook M (1993) The determination of plasma and serum sialic acid. *Clin Biochem* 26:31-38
- ^{viii} Kehrel BE (2003) Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie* 4:1-10
- ^{ix} Plow EF, Ginsberg MH, Marguerie GA (1986) Expression and function of adhesive proteins on the platelet surface. In: Phillips D.R.: *Biochemistry of platelets*. Academic Press, Orlando, 225-256
- ^x Israelis SJ, Mc Millan EM, Robertson C, Singhory S, Mc Vicoli A (1996) The lysosomal granule membrane protein, Lamp-2, is also present in platelet dense granule membranes. *Thromb. Haemost.*, 75:623-629
- ^{xi} Weiss DJ (1999) Comparative physiology of platelets from different species. In: Rao. *Handbook of platelet physiology and pharmacology*. Kluwer Academic Publisher, Boston, London 379-393
- ^{xii} Hawiger J (1990) Platelet-vessel wall interactions. Platelet adhesion and aggregation. *Atherosclerosis Reviews* 21, 165-186
- ^{xiii} Marcus AJ (1996) Platelet activation. In Fuster V, Ross R (eds): *Atherosclerosis and coronary artery disease*, Philadelphia, 607-637
- ^{xiv} Narayanan S, Hamasaki N (1998) Current concepts of coagulation and fibrinolysis. *Advances in Clinical Chemistry* 33, 133-168

- ^{xv} Kehrel B (1999) Collagen receptors: Biologie and function. In: Rao, G.H. (ed.): Platelet structure, biology and physiology. *Kluwer Academic Publishers*, Norwell, M.A.U.S.A.
- ^{xvi} Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM (1992) Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 267, 11300-6
- ^{xvii} Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR (2002). Platelet dependent action of high-dose factor VIIa *Blood* 100:364-5
- ^{xviii} Kehrel BE, Jurk K (2005) Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie* 1, Schattauer 39-49
- ^{xix} Kehrel BE, Wierwille S, Clemetson KJ, Anderson O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ et al (1998) Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: It recognizes the platelet activation quaternary structure of Collagen, whereas CD 36, GPIIb/IIIa and vWF do not. *Blood*, 91:491-499
- ^{xx} Harbrecht U, Oldenburg J, Klein P., Weber D, Rockstroh J, Hanfland P (1998) Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. In: Müller – Berghaus, G; Pötsch, B (Hrsg.): *Hämostaseologie. Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.* Springer-Verlag, 27-35
- ^{xxi} Marguerie GA, Plow EF, Edington TS (1979) Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol. Chem* 254:5357-5363
- ^{xxii} Lüscher EF, Weber S (1993) The formation of the haemostatic plug—a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature. *Thromb. Haemost.* 70, 234-237
- ^{xxiii} Mann KG (1999) Blood coagulation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23:1111-1113
- ^{xxiv} Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 18, 37-48
- ^{xxv} McConell MF (2000) Overview of Haemostasis In: Day M, Mackin A, Littlewood J: Manual of canine and feline Haematology and transfusion medicine. BSAVA

- ^{xxvi} Bachmann F (1987): Fibrinolysis. In: Verstraete, M; Vermeylen J (eds): Thrombosis and Haemostasis, Univ. Press, Leuven :227-265
- ^{xxvii} Booth NA (1999). Fibrinolysis and thrombosis. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol. 12, 423-33
- ^{xxviii} Nachum R, Watson SW, Sullivan JD (Jr), Siegel SE (1980) Antimicrobial defense mechanisms in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* : preliminary observation with heat derived extracts of *Limulus amoebocyte lysate* . *J Intervent Pathol* 32:51-8
- ^{xxix} Tocantins LM (1938). The mammalian blood platelets in health and disease. *Medicine* 17:155-260
- ^{xxx} Janeway CA Travers P, Walport M, Shlomchik M (eds) (2001): Immunobiology. New York, Churchill Livingstone
- ^{xxxi} Weksler BB (1992) Platelets. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (eds) Inflammation: basic principles and clinical correlates. 2nd ed. New York: Raven
- ^{xxxii} Bennett D, Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, Stein CS, Nieswandt B, Wang Y, Davidson BI, Ratliff TL (2003) Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity: A Communication Link between Innate and Adaptive Immune Compartments. *Immunity* 19,9-19
- ^{xxxiii} Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O (2005) Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 83:196-8
- ^{xxxiv} Diacovo TG, de Fougerolles AR, Bainton DF, Springer TA (1994) : A functional integrin ligand on the surface of platelets: Intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 94:1243-1251
- ^{xxxv} Ahmad R, Menezes J, Knafo L, Ahmod A (2001) Activated platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J Leukoc Biol* 69:123-128
- ^{xxxvi} Colman RW (1991). Receptors that activate platelets. *Proc Soc Exp Biol Med* 197:242-248
- ^{xxxvii} Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Capron A (1986) rat resistance to schistosomiasis: platelets –mediated cytotoxicity induced by C-reactive Protein : *Science* 231:153-156
- ^{xxxviii} Joseph M, Auriault C, Capron A (1983) A new function of platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810-812

- ^{xxxix} Ockenhouse CF, Magowan C, Chulay JD(1984).Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD 36 surface receptor in vitro *J Clin Invest* 84:468-475
- ^{xi} Peng J, Friese P, George JN, Dale GL, Burstein SA (1994) .Alteration of platelets function in dogs mediated by interleukin-6 *Blood* 83:398-403
- ^{xlii} del Conde T, Cruz MA, Zhang H, Afshar-Kharghan V (2005) Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system.*Journal of Experimental Medicine* Vol 201,871-879
- ^{xliii} Zimmermann TS, Kolb WP, Human platelet-initiated formation and uptake of the C5-C9 complex of human complement.*J Clin Invest* 57 ;203-211
- ^{xliiii} Weksler BB(1992) Platelets.In:Gallin JI,Goldstein IM, Syndermann R (eds)Inflammation: basic principles and clinical correlates.2nd ed.New York:Ravan
- ^{xliv} Clawson CC, White JG(1971)Platelet interaction with bacteria.*AM J Pathol* 65:367-380
- ^{xlvi} Zucker-Franklin(1995) Platelets in viral infections. In Joseph Med Immunopharmacology of platelets.London:Academic Press Seiten:
- ^{xlvi} Maisch PA ,Calderone RA(1980).Adherence of of candida albicans to a fibrin platelet matrix formed in vitro.*Infect Immun* 27:650-655
- ^{xlvi} Verwaerde C, Joseph M, Capron M , Pierce RJ, Damonville M, Velge F, Auriault C, Capron A (1987):Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for Schistosoma mansoni.*J Immunol* 138 4441-4446
- ^{xlvi} Yeaman MR, Tang YQ,Shen AJ,Bayer AS, Selsted ME.(1997)Purification and in vitro activities of rabbit platelets microbicidal protein . *Infect Immun* 65:1023-1031
- ^{xlvi} Zasloff M(2002)Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395
- ⁱ Azizi N, Li C, Shen AJ, Bayer AS, Yeaman MR (1996) Staphylococcus aureus elicits release of platelet microbial protein in Vitro In:Program and abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.(New Orleans)Washington DC:American Society for Microbiology

- ⁱⁱ Bayer AS, Ramos MD, Yeaman MR, Shen AJ, Cheking AL, Menzies BE (1997) Hyperproduction of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis—a host defense role for platelet microbial proteins. *Infect Immun* 65
- ^{lii} Fowler (jr) VG, McIntyre LM, Yeaman MR, Peterson GE, Barth Reller L, Corey GR, Wray D, Bayer AS (2000) In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbial protein in isolates of *Staphylococcus aureus* from endocarditis patients correlates with an intravascular device source. *J Infect* 182:1251-1254
- ^{liii} Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A (1991) Platelet-neutrophil interaction. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica* 76:491-499
- ^{liv} De Gaetano G, Evangelista V, Ratjar G, Del Maschio A, Cerletti C (1990) Activated polymorphonuclear leukocytes stimulate platelet function. *Thromb Res* 11:25-32
- ^{lv} Nachman RL, Weksler B. (1972) The platelet as an inflammatory cell. *Ann NY Acad Sci* 201:131-137
- ^{lvi} Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S (1986) Platelet-leukocyte interaction selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes and related cell lines *Blood* 67:629-636
- ^{lvii} Springer T.A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 501-514
- ^{lviii} Wagner DD (2005) New links between inflammation and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25:1321
- ^{lix} Jurk K, Strey A, Janning A, Gerke V, Van Aken H, Kehrel BE (2004) Platelets associated with monocytes modulate monocytic extravasation. *Hämostaseologie* P70
- ^{lx} Jurk K, Strey A, Van Aken H, Janning A, Gerke V, Kehrel BE (2005): Crosstalk between haemostasis and inflammation: Platelets modulate the adhesion and transmigration process of monocytes. *Anesth Analg*, 100 Suppl S:S-59
- ^{lxi} Bizzozero J (1882) Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol Klein Med* 90:261-332
- ^{lxii} Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 112:491-499

- ^{lxiii} Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9:866-873
- ^{lxiv} Gresham HD, Adams SP, Brown EJ (1992) Ligand binding specificity of the leukocyte response integrin expressed by human neutrophils. *J. Biol. Chem* 267:13895-13902
- ^{lxv} Kieffer N, Phillips DR (1990): Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu. Rev. Cell Biol* 6,329-357
- ^{lxvi} Silverstein RL, Nachman RL (1987). Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 79:867-874
- ^{lxvii} Christin L, Wysong D, Meshulam T, Hasty R, Simons ER, Diamond RD (1996) Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and potentiate killing by neutrophils. In: *Program and abstracts of the 34th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (New Orleans)*. Alexandria, Virginia: Infectious Diseases Society of America
- ^{lxviii} Schröder JM, Sticherling M, Persoon N, Christophers E (1990) Identification of a novel platelet-derived neutrophil-chemotactic polypeptide with structural homology to platelet factor-4. *Biochem Biophys Res Comm* 172:898-904
- ^{lxix} Pancre V, Monte D, Delanoye A, Capron A, Auriault C (1990). Interleukin 6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur Cytokine Netw* 15-19
- ^{lxx} Mandell GL, Hook EW (1969) The interaction of platelets, *Salmonella* and mouse peritoneal macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* 132:757-759
- ^{lxxi} Boogaerts MA, Yamada O, Jacob HS, Moldow CF (1982). Enhancement of granulocyte-endothelial cell adherence and granulocyte-induced cytotoxicity by platelet release products. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7019-7023
- ^{lxxii} Lehrer RI, Ganz T (2002) Defensins of vertebrate animals. *Opin. Immunol.* 14:96-102
- ^{lxxiii} Selsted M.E., Szklarek D, Lehrer RI (1984) *ibid.* 45:150
- ^{lxxiv} Greenwald G.I. and Ganz T. (1987) *Infect. Immun.* 55:1365
- ^{lxxv} Lehrer RI, Szklarek D, Ganz T, Selsted ME (1985) *ibid.* 49:207

- ^{lxxvi} Lehrer RI, Daher K, Ganz T, Selsted ME et al (1985)*J. Virol.*54:467
- ^{lxxvii} Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ(2002)Mammalian defensin in immunity:more than just microbials. *Opin.Immunol.*23:291-296
- ^{lxxviii} Lichtenstein A, Ganz, T, Selsted ME, Lehrer RJet al (1986)In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407-1410
- ^{lxxix} Zhang L, Biragyn A, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmaso EA, Fu S, Pham T, Mei J, Ho JJ, Zhang W, Lopez P, Ho DDet al(2002),*Science* 298,995-1025
- ^{lxxx} Lehrer R, Ganz T,(1999)Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Opin.Immunol.*11,23-27
- ^{lxxxi} Zeya HI, Spitznagel JK:Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. *Bacteriol* 1966,91:750-762
- ^{lxxxii} Bruhn O, Regenhard P, Michalek M , Paul S, Gelhaus C, Jung S, Thaller G, Podschun R, Leippe M, Grötzinger J, Kalm E A novel horse alpha defensin (2007) *Biochem J*, 15:407(2):267-76
- ^{lxxxiii} Lynn, DJ Bradley DG (2007)Discovery of alpha-defensin in basal mammals.*Dev Comp Immunol März* 2 17367857
- ^{lxxxiv} Ganz T, Lehrer RI,(1998)Antimicrobial peptides of vertebrates. *Opin.Immunol.* 10,41-44
- ^{lxxxv} Ganz T (1987)Extracellular release of antimicrobial defensin by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.*55:568-571.
- ^{lxxxvi} Panyutich AV, Szold O, Poon PH, Tseng Y, Ganz T(1994).Identification of defensin binding to C1 complement. *FEBS Lett* 356:169-173
- ^{lxxxvii} Panyutich AV, Himstra PS, van Wterling S, Ganz T(1995)Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol* 12:351-357
- ^{lxxxviii} Ganz T (2002) Versatile Defensins. *Science* 298:977-978
- ^{lxxxix} Rodriguez-Garcia M, Oliva H, Climent N, Garcia F, Gatell JM, Gallert T (2007):Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3: *J Leukoc Biol* 82:1143-5

- ^{xc} Qu XD, Lloyd KC, Walsh JH, Lehrer RI(1996): Secretion of type II phospholipaseA2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells. *Infect Immun* 1996, 64:5161-5165
- ^{xcⁱ} Linzmeier R, Ganz T, Ho CH, Hoang BV, Ganz T, :A 450-kb contig of defensin genes on human chromosom 8p23. *Gene* 1999, 233:205-211
- ^{xcⁱⁱ} Wilson CL, Quelette AJ, Satchell DP, Ayabe T, López- BoadoYS, Stratman JL, Hultgren SJ, Parks WC, Matrisian LM(1999):Regulation of intestinal defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286:113-117
- ^{xcⁱⁱⁱ} Diamond G , Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevinz CL(1991):Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptidefrom mammalian tracheal mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA*,88:3952-3956
- ^{xc^{iv}} Zhao C ,Lehrer RI, Wang I (1996)Widespread expression of beta-defensin HBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*,396:319-322
- ^{xc^v} Russell JP, Diamond G, Tarver AP, Scanlin TF, Bevins CL(1996) Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* ,64:1565-1568
- ^{xc^{vi}} Tang Y-Q Yuan J, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ovelette AJ, Selsted ME(1999):A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha defensins .*Science* 286:498-502
- ^{xc^{vii}} Lohner K, Latal A, Lehrer RI, Ganz T, (1997)Differential scanning microcalorimetry indicates thathuman defensin,HNP-2,interacts specifically with biomembrane mimetic systems.*Biochemistry*36:1525-1531
- ^{xc^{viii}} Kagan BL, Selstedt ME, Ganz T, Lehrer RI (1990)Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*: 87:210-214
- ^{xc^{ix}} Wimley WC, Selsted ME, White SH(1994)Interactions between humandefensins and lipid bilayers:evidence for the formation of multimeric pores. *Protein Sci* 3:1362-1373
- ^c Zasloff M (2002)Antimicrobial peptides of multicellular organisms.Nature 415:389-395

- ^{ci} Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI(1986)In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407-1410
- ^{cii} Misuno N, Kolesnikova TS, Lehrer RI, Ganz T, Voitenok NN(1992)Effects of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor alpha by human human blood monocytes in vitro.*Biull Eksp Biol Med* 113:524-527
- ^{ciii} Ichinose M, Asai M, Imai K, Sawada M(1996)Enhancement of phagocytosis by corticostatin(CSI) in cultured mouse peritoneal macrophages *Immunopharmacology* 35:103-109
- ^{civ} Fleischmann J et al (1985) Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages.*Diagn.Microbial.Infect.Dis.*3:233-242
- ^{cv} Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Solomon S, Bateman A(1999)Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells:mechanisms of action. *J.Immunol.*163:947-953
- ^{cvi} Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I(2001)Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensin-1/2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D2 production from mast cells.*Eur.J.Immunol.*31:1066-1075
- ^{cvi} Baggiolini M(1998)Chemokines and leukocyte traffic.*Nature* 392:565-568
- ^{cvi} Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN(2000)Neutrophil alpha –defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells.*Eur.Cytokine Netw.*11:257-260
- ^{cix} Zhu Q, Solomon S(1992)Isolation and mode of action of rabbit corticostatic (antiadrenocorticotropin)peptides *Endokrinologie* 130:1413-1423
- ^{cx} Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ(2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naïve T and immature dendritic cells.*J.Leukozyte Biol.*68:9-14
- ^{cx} Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen O, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ(1999) beta-defensin :linking innate and adaptive immunity through dendritic and T-cell CCR6.*Science* 286:525-528
- ^{cxii} Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW(2002)Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by beta Defensin 2 *Science* 298 :1025

- ^{cxiii} Barker E, Mackewicz CE, Reyes- Teran G, Sato A, Stransford SA, Fujimura SH, Christopherso C, Chang SY, Levy JA(1998)*Blood* 92:3105
- ^{cxiv} Lillard,JW, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, Mc Ghee JR(1999) Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins.*Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*96:651-656
- ^{cxv} Marshall JC, Creery D(1998)Pre-clinical models of sepsis.*Sepsis* 2:187-197
- ^{cxvi} Ogura H, Kawasaki T, TanakaH,Koh T, Tanaka R, OzekiY, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H:Activated platelet s enhance microparticale formation ans platelet –leukocyte interaction in severe trauma and sepsis.*J Trauma* 2001;50:801-809
- ^{cxvii} Pitchford SC, Yano H, Lever R, Riffo-Vasquez Y, Ciferri S, Rose MJ, Giannini S, Momi S, Spina D, Gresele P, Oconnur B; Page CP(2003)Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation .*J Allergy Clin Immunol* 112:109-118
- ^{cxviii} Tschoepe D, Rauch U, Schwippert B(1997)Platelet –leukocyte –cross-talkin diabetes mellitus.*Horm Metab Res* 29:631-635
- ^{cxix}Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Mogahadam S, Daniel WG, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeisser A, Yilmaz A, Ludwig J, Neundörfer B (2003)Upregulation of CD40-CD40 ligand in patients with acute cerebral ischemia.*Stroke* 34:1412-1418
- ^{cxx} Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Michelson AD, Goldberg AJ, Shilale E, Lessard DM, Marchese P, Frehniger AIL (3rd)Goldberg RJ (2001)Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction .*J AM coll Cardiol* 38:1002-1006
- ^{cxixi} Idell S, Maunder R, Fein A, Switalska H, Niewiarowski S(1989)Platelet –specific alpha granule proteins and thrombospondin in bronchoalveolar lavage in the adult respiratory distress syndome and cardiac surgery.*J Clin Invest* 78:340-348
- ^{cxixii} Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C,Neumann FJ, Fateh- Moghadam S (1997)Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrom.*Intensive Care Med* 23 :379-385
- ^{cxixiii} Kehrel B, Jurk K(2005)Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase.*Hämostaseologie* 1,Schattauer 39-49
- ^{cxixiv} Schluesener H, Meyerman R(1995)Neutrophilic defensins penetrate the blood brain barrier.*J Neurosci Res* 42:718-723

^{cxxv} Panyutich AV, Panyutich EA, Krapividin VA, Ganz T, Baturevich EA (1993) Plasma defensin concentrations are elevated in patient with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* 122(2):202-207

^{cxxvi} Zhang H, Porro G, Orzech N, Mullen B, Slutsky AS, Lim M (2001) Neutrophil defensins mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose related fashion. *Am J Physiol. Lung Cell. Mol Physiol.* 280:L947-L954

^{cxxvii} Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin Va, Baturevich EA, Ganz T. (1993) Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med. Aug 122:202-207*

^{cxxviii} Timmons S, Hawiger J (1987) Isolation of human platelets by albumin gradient and gelfiltration. In: Hawiger (Hrsg.): *Methods in Enzymology Platelets: Receptors, adhesion, secretion, part A*; Academic Press, Orlando, 11-21

^{cxxix} Kurnick JT, Ostberg L, Stegagno M, Sjöberg, Kimura AK, Orn A (1979): A rapid method for separation of functional lymphoid cell populations of human and animal origin on PVP-silica (Percoll) density gradients. *Scand. J Immunol.*, 10, 563-573

^{cxxx} Rauterberg J, Kühn K (1968) The renaturation behaviour of modified collagen molecules. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 611-22

^{cxxxi} Chung J, Gao AG, Frazier WA. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin alpha IIb beta3. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 14740-6

^{cxxxii} Dorahy DJ, Thorne RF, Fecondo JV, Burns GF. Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 1323-30

^{cxxxiv} Xia Z, Wong T, Liu Q, Kasirer-Friede A, Brown E, Frojmovic MM. Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* (1996) 93, 204-14

^{cxxxv} Peters JH, Baumgarten H (1990) *Monoklonale Antikörper* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

- ^{cxxxvi} Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck R(1998) A CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-4
- ^{cxxxvii} Bornstein P(2001) Thrombospondins as extracellular matrix modulators of cell function. *J. Clin. Invest.* 107, 929-34
- ^{cxxxviii} Kehrel BE, Flicker E, Wigbels B, Osterfeld M, van de Loo J, Lüscher EF(1996) Thrombospondin measured in whole blood--an indicator of platelet activation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7, 202-5
- ^{cxxxix} Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reihel F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP (2002) Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat. Med*8, 349-357
- ^{cxl} Engvall E, Jonsson K, Perlmann P(1971) Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta.* 251, 427-34
- ^{cxli} Avrameas S, Guilbert B(1971) A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur. J. Immunol.* 1, 394-6
- ^{cxlii} Ofuso FA, Modi GJ, Smith LM, Blajchman MA, Hirsch J, Cerskus AL (1984):Heparan sulphate and dermatan sulphate inhibit the generation of thrombin activity in plasma by complement pathways. *Blood*,64:742-747
- ^{cxliii} Ganz T (1987)Extracellular release of antimicrobial defensin by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.*55:568-571.
- ^{cxliv} Pak V, Budikhina A , Pashenkov M , Pinegin B (2007) Neutrophil activity in chronic granulomatous disease *Adv Exp Med Biol* 601:69-74
- ^{cxlv} Jan MS, Huang YH, Shieh B, Teng RH, Yan YP, Lee YT, Li C, Liao KK (2006) CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation and alpha-defensin release *Acquir Immune Defic Syndr* 1;41:6-16
- ^{cxlvi} Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H (2007) Cathelicidin LL 37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensin from neutrophils. *BR J Dermatol.* Dez 157, :1124-31

- ^{cxlvii} Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Ganz T, Baturevich EA (1993) Plasma defensin concentrations are elevated in patient with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* 122(2):202-207
- ^{cxlviii} Zhang H, Porro G, Orzech N, Mullen B, Slutsky AS (2001) Neutrophil defensins mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose related fashion. *Am J Physiol. Lung Cell. Mol Physiol.* 280:L947-L954
- ^{cxlix} Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin Va, Baturevich EA, Ganz T (1993) Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med. Aug 122:202-207*
- ^{cl} Kehrel BE, Jurk K (2008) Platelets –cinderella of blood cells :Their role in haemostasis, thrombosis and arteriosklerosis, innate and adaptive immune defense as well as inflammation . *in press*
- ^{cli} Weiss DJ (1999) Comparative physiologie of platelets from different species .In: Rao. Handbook of platelet physiology and pharmacology. Kluwer Academic Publisher, Boston, London 379-393
- ^{clii} Otto CM (2007) State of the Art Review: Clinical trials in spontaneous disease in dogs: a new paradigm for investigation of Sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17 (4) 359-367
- ^{cliii} Natanson C, Fink MP, Ballantyne HK, et al. (1986) negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J. Clin Invest*, 78:259-270
- ^{cliv} de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, et al. (2003) Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med* 17 (5):674-679
- ^{clv} Falco A, Brocal I, Perez L, Coll JM, Estepa A, Tafalla C, (2007) In vivo modulation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response by the human alpha defensin 1, HNP-1: *Fish Shellfish Immunol* Oct 5
- ^{clvi} Tzeng DY, Deul TF, Hang JS, Senior RM, Boxer La, Huang JS, Senior RM, Devell TF, Baehner RL (1984): Platelet-derived growth factor promotes polymorphonuclear leukocyte activation. *Blood* 64 1123-1128
- ^{clvii} Bevilacqua M.P. und Nelson R.M. (1993): Selectins *J. Clin. Invest.* 91, 379-387

- ^{clviii} Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, Mc Ever RC (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin (CD62) on myeloid cells *J. Cell Biol.* 112:491-499
- ^{clix} Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9:866-873
- ^{clx} Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, Mc Ever RC (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin (CD62) on myeloid cells *J. Cell Biol.* 112:491-499
- ^{clxi} Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9:866-873
- ^{clxii} Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel BE, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD (2000) P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* 191, 1413-22
- ^{clxiii} Jurk K, Droste DW, Dörmann D, Ritter MA, Schriek C, Kemeny V, Ringelstein EB, Kehrel BE (1998): Platelet-leukocyte aggregate formation in blood of patients with acute ischemic stroke. *Ann Hematol*, 76
- ^{clxiv} Misuno NI, Kolesnikova TS, Lehrer R, Ganz T, Voitenok NN (1992): Effect of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor alpha by human blood monocytes in vitro. *Biull Eksp Biol Med* 113:524-527
- ^{clxv} Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH (1996) Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science*; 273:252-5.
- ^{clxvi} Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007) Chemoattraction of macrophages, T-Lymphocytes and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J Immunol.* Sep 15; 179:3958-65
- ^{clxvii} Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. (2001) Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur. J. Haematol* 66, 143-51
- ^{clxviii} Heffner JE. (1997) Platelet-neutrophil interactions in sepsis--platelet guilt by association? *Intensive Care Med.* 23, 366-8

- ^{clxxix} Hayward CS, Kalnins WV, Rogers P, Feneley MP, Macdonald PS, Kelly RP (1999) Left ventricular chamber function during inhaled nitric oxide in patients with dilated cardiomyopathy. *J.Cardiovasc. Pharmacol* 34, 749-54
- ^{clxxx} Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS (1979): Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J. Biol.Chem.*254, 5357-5363
- ^{clxxxi} Kieffer N, Phillips DR (1990): Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu.Rev.Cell Biol.*6, 329-357
- ^{clxxxii} Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JL, Detmers PA, Wright S, Silverstein SC (1991): CD 11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N-terminus of the A alpha-chain of fibrinogen. *Proc.Natl Acad Sci USA* 88,1044-1048
- ^{clxxxiii} Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. (1993): the I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1. *J Biol Chem* 120, 1031-1043
- ^{clxxxiv} Gresham HD, Adams SP, Brown EJ (1992): Ligand binding specificity of the leukocyte response integrin expressed by human neutrophils. *J.Biol.Chem.*267,13895-13902
- ^{clxxxv} Ruf A, Patscheke H (1995): Platelet-induced neutrophil activation : platelet –expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18. *Br.J.Haematol.*90,791-796
- ^{clxxxvi} Kieffer N, Phillips DR (1990): Platelet membrane glycoproteins : functions in cellular interactions. *Annu.Rev.Cell Biol* 6,329-357
- ^{clxxxvii} Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Kehrel BE (2003) Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb) : an alternative backup mechanism to von Willebrand factor *FASEB J*:17:1490-2
- ^{clxxxviii} Gao G, Lindberg FP, Dimitry JM, Frazier WA, Brown EJ (1996): Thrombospondin modulates functions through integrin-associated protein. *J. Cell Biol* 135, 533-544
- ^{clxxxix} Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL (1987): Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J.Clin.Invest* 79, 1054-1061
- ^{clxxxx} Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL (1989): Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J.Clin.Invest.*84, 546-552

- ^{clxxxix} Kehrel BE, Flicker E(1993): Thrombospondin in relation with disease process. In Lahav,J(ed):thrombospondin.CRC Press, Boca Raton 199-207
- ^{clxxxii} Jurk K, Clemeston KJ, de Groot PG , Kehrel BE, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear conditions
- ^{clxxxiii} Roberts DD(1996): Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1.FASEB J,10,1183-1191
- ^{clxxxiv} Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller- Berghaus G, Kroczeck RA(1998)CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.Nature.391:591-594
- ^{clxxxv} Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, Stein CS, Nieswandt B, Wang Y, Davidson BL, Ratliff TL(2003) Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*:19:9-19
- ^{clxxxvi} Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD(2002)CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism.Nat Med 8:247-252
- ^{clxxxvii} Xu H, Zhang X, Mannon RB, Kirk AD (2006) Platelet-derived or soluble CD 154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD 154. *J Clin Invest*:116:769-74
- ^{clxxxviii} Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE(2005) CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;25:2428-34
- ^{clxxxix} von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C(2001)RANTES desposition by platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation . *Am J Pathol*. 103: 1772:7
- ^{cx} Freedman JE (2003) CD40-CD40L and platelet function: beyond hemostasis. Comment on: *Circ Res*. 92, 1041-8
- ^{cxci} Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell* 76, 501-514

- ^{cxcii} McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marschall-Carlson L, Bainton DF (1989): GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84, 92-99
- ^{cxci} Schluesener H, Meyermann R(1995)Neutrophilic defensins penetrate the blood brain barrier.*J Neurosci Res* 42:718-723
- ^{cxci} Wagner DD(2005)New links between inflammation and thrombosis.*Arteriosclerosis,Thrombosis,and Vascular Biology* 25:1321
- ^{cxcv} Jurk K, Strey A, Janning A, Gereke V, Van Aken H, Kehrel BE(2004)Platelets associated with monocytes modulate monocytic extravasation.*Hämostaseologie* P70
- ^{cxvii} Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, Mc Ever RP (1992): Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin on myeloid cells. *J.Cell.Biol.* 118, 445-456
- ^{cxviii} Rainger GE, Buckley C, Simmons DL, Nash GB (1997): Cross-talk between cell adhesion molecules regulates the migration velocity of neutrophil *Curr.Biol.*, 7, 316-325
- ^{cxviii} Diamond MS, Staunton DE, Stracker SA., Hibbs ML, Springer TA, Garcia- Aquilar, de Fongrolles AR (1990): ICAM-1(CD54) : A counter receptor for Mac-1 *J Cell. Biol.* 111, 3129-3139
- ^{cxix} Brown EJ, Lindberg FP (1996): Leukozyte adhesion molecule in host defence against infection . *Ann. Med.* 28, 201-208
- ^{cc} Sheikh SJ, Nash GB (1996): Continuous activation and deactivation of integrin CD11b/CD18 during de novo expression enable rolling neutrophils to immobilize on platelets. *Blood* 87, 5040-5050
- ^{cci} Jurk K, Strey A, Van Aken H, Janning A, Gereke V, Kehrel BE (2005): Crosstalk between haemostasis and inflammation :Platelets modulate the adhesion and transmigration process of monocytes. *Anesth Analg*, 100 Suppl S:S-59
- ^{ccii} Wagner DD(2005)New links between inflammation and thrombosis.*Arteriosclerosis,Thrombosis,and Vascular Biology* 25:1321
- ^{cciii} Jurk K, Strey A, Janning A, Gereke V, Van Aken H, Kehrel BE(2004)Platelets associated with monocytes modulate monocytic extravasation.*Hämostaseologie* P70

- ^{cciv} Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T (1993) Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J. Immunol* 151:3267-3273
- ^{ccv} Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schöming A (1997) Induction of cytoxin expression in leukocytes by binding of thrombin stimulated platelets. *Circulation* 95:2387-2394
- ^{ccvi} Atarashi K, Hirata T, Matsumoto M, Kanemitsu N, Miyasaka M (2005) Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. *J Immunol*;174:1424-32
- ^{ccvii} Ma YQ, Plow EF, Geng JG (2004) P-Selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood*.104:2549-56
- ^{ccviii} Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L (2002) Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* 415, 175-9
- ^{ccix} Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. (2002) Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1381-9
- ^{ccx} Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS (1997) Shear induce platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,17:646-53
- ^{ccxi} Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller –Berghaus G, Koroczek RA, (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391:591-594
- ^{ccxii} Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Hack CE, Sturk A, Eysman L (1997) Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 96:3534-3541
- ^{ccxiii} Jurk K, Kehrel BE (2005): Platelets and the new comprehension of haemostasis. *Haemostaseologie*; 25: 39-49

- ^{ccxiv} Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR (2002): Platelets and thrombin generation . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 22: 1381-9
- ^{ccxv} Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI(1986)In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407-1410
- ^{ccxvi} Panyutich AV, Ganz T, Szold O, Poon PH, Tseng Y (1994)Activated alpha 2 Makroglobulin is a principal defensin-binding protein .*Am Jrespir Cell Mol Biol* 5(2):101-106
- ^{ccxvii} Panyutich AV, Hiemstra PS, van Wetering S, Ganz T(1995)Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am.J.Respir. Cell Mol.Biol.,Vol 12,No.3,03, 351-357*
- ^{ccxviii} Daher KA, Selsted ME, Lehrer R(1986):Direct interaction of viruses by human granulocyte defensins.*J Virol* 60(3):1068-1074
- ^{ccxix} Panyutich AV, Ganz T, Szold O, Poon PH, Tseng Y (1994)Activated alpha 2 Makroglobulin is a principal defensin-binding protein .*Am Jrespir Cell Mol Biol* 5(2):101-106
- ^{ccxx} Panyutich AV , Hiemstra PS, van Wetering S , Ganz T (1995)Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am.J.Respir. Cell Mol.Biol.,Vol 12,No.3,03, 351-357*
- ^{ccxxi} Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI (1986)In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407-1410
- ^{ccxxii} Feldman BF, Madewell BR ,O' Neill S (1981):Disseminated intravascular coagulation :antithrombin,plasminogen and coagulation abnormalities in 41 dogs.*Journal of the American Veterinary Medical Association* 179, 151-154
- ^{ccxxiii} Spencer LT, Paone G, Krein PM, Rouhani FN, Rivera-Nieves J, Brantly ML(2004)Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*:514-520
- ^{ccxxiv} Lehrer R, Ganz T (1999)Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Opin.Immunol.*11,23-27
- ^{ccxxv} Schmidt B, Ho L, Hoog PJ (2006) Allosteric Disulfid Bonds. *Biochemistry* 45, 7429-7433
- ^{ccxxvi} Nakamura H update 2005 : Thioredoxin and its related molecules. *Antioxid Redox Signal* 7: 823-828

- ^{ccxxvii} Schmidt B, Ho L, Hogg PJ (2006) Allosteric Disulfide Bonds. *Biochemistry* 45, 7429-7433
- ^{ccxxviii} Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W (2006): Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13932-13937
- ^{ccxxix} Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, Kehrel BE (2002). Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryl and enzymatically catalysed disulfid exchange. *Blood* ; 100: 2472-8
- ^{ccxxx} Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, Kehrel BE (2002) Sustained integrin ligation involves extracellulare free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood* 100 (7) : 2472-2478
- ^{ccxxxi} Chen VM, Hogg PJ (2006) Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis. *J Thromb , Haemost.* 4:2533-41
- ^{ccxxxii} Danishefsky KJ, Alexander RJ, Detwiler TC (1984) *Biochemistry* 23, 4984-4990
- ^{ccxxxiii} Panyutich A, Ganz T (1994) Activated alpha 2- Makroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5(2):101-106
- ^{ccxxxiv} Kolarich D, Weber A, Turecek PL, Schwarz HP, Altmann F (2006) Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics* 11:3369-80
- ^{ccxxxv} Tanaka Y, Ueda K, Ozawa T, Morita M, Yokota S, Imanaka T, Kitajima I (2005) Mutation study of antithrombin : the role of disulfide bonds in intracellulare accumulation and fomation of russell body-like structures. *J Biochem* 137 :273-85
- ^{ccxxxvi} Dahlbäck B, Podack ER (1985): Characterization of human S protein , an inhibitor of the membrane attack complex of complement. Demonstration of free reactive thiol group 24: 2368-74
- ^{ccxxxvii} Koopman J, Haverkate F, Grimbergen J, Engesser L, Novakova I, Kerst AF, Lord ST: Abnormal fibrinogens Ijmuiden (B beta Arg 14----Cys) and Nijmegen (B beta Arg 44---Cys) form disulfide-linked fibrinogen-albumin complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 15,89: 3478-82
- ^{ccxxxviii} Weigand MA, Hörner C, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Bouchon A (2004) Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist* 53:10-28

- ^{ccxxxix} Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. (1991) Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilisation. *Science* 251(5000):1481-1485
- ^{ccxi} Nassar T, Akkawi S, Bar-Shavit R, Haj-Yehia A, Bdeir K, Al-Mehdi AB, Tarshis M, Higazi AA (2002) Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Blood* 100:4026-4032
- ^{ccxii} Riddell DR, Siripurapu V, Vinogradov DV, Gliemann J, Owen JS (1998) Blood platelets do not contain the low-density receptor-related protein (LRP). *Biochem Soc Trans* 26(3):244
- ^{ccxiii} Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shokho VA, Certov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW et al. (2002) Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by beta-Defensin 2. *Science* 298:1025
- ^{ccxiiii} Montrucchio G, Bosco O, Del Sorbo L, Lupia E, Goffi A, Fascio Pecetto P, Omede P, Emanuelli G, Camussi G (2005): Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopoly-saccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thrombosis and Haemostasis* 90:774-966
- ^{ccxlv} Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007): Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J Immunol* 15:3958-65
- ^{ccxlv} Salvatore M, Garcia-Sastre A, Ruchala P, Lehrer RI, Chang T, Klotman ME (2007): alpha-Defensin inhibits virus replication by cell-mediated mechanism. *J Infect Dis* 15:835-43
- ^{ccxlv} Ganz T (2002) Versatile Defensins. *Science* 298:977-978
- ^{ccxlvii} Solum NO, Hagen I, Filian-Myklebust C, Stabaek T (1980) Platelet glycolipin. Its membrane association and solubilization in aqueous media. *Biochem Biophys Acta* 10;597(2):235-246
- ^{ccxlviii} Crook M. (1993) The determination of plasma and serum sialic acid. *Clin Biochem* 26:31-38
- ^{ccxlix} Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME (1989) *J. Clin. Invest.* 84:553
- ^{cccl} Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer R (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:210-214

- ^{ccli} Wimley WC, Selsted ME, White SH(1994)Interactions between human defensins and lipid bilayers:evidence for the formation of multimeric pores. *Protein Sci* 3:1362-1373
- ^{cclii} Hill CP,Yee J, Selsted ME,Eisenberg D(1991)Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer:mechanisms of membrane permeabilisation. *Science* 251(5000):1481-1485
- ^{ccliii} Hill CP,Yee J, Selsted ME, Eisenberg D(1991)Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer:mechanisms of membrane permeabilisation. *Science* 251(5000):1481-1485
- ^{ccliv} Mosher DF, Johnson RB (1983) In vitro formation of disulfide-bonded fibronectin multimers J Biol Chem 258(10) 6595-601
- ^{cclv} White H,Wimley C, Selsted ME (1995) Structure, funktion and membran integration of Defesin Current Pinion in Structural Biology 5: 521-527
- ^{cclvi} Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI(1986)In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407-1410
- ^{cclvii} Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H (2005): Upregulates expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study BMC Cancer

édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5311-7



9 17 8 3 8 3 5 19 5 3 1 1 6